

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Ботаника и физиология растений

Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

«СПОСОБЫ ПРЕОДОЛЕНИЯ ПОКОЯ СЕМЯН И ОСОБЕННОСТИ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *FRITILLARIA RUTHENICA* WIKSTR. В УСЛО-
ВИЯХ *IN VITRO*»

Студент М.Р. Голубева Голубева Марина Николаевна

Руководитель С.А. Солдатов Солдатов С.А.

Нормоконтролер С.В. Клыченков Клыченков С.В.

Рецензент В.В. Кошеляев Кошеляев В.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 19.05.23 № 12)

Заведующий кафедрой Г.А. Карпова Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 24.06.23 № 1)

Секретарь ГЭК С.В. Клыченков Клыченков С.В.

Пенза, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Биологические особенности вида <i>Fritillaria ruthenica</i> Wikstr.	6
1.2 Техника культивирования растительного материала на искусственных питательных средах.....	10
1.3 Фитогормоны в условиях <i>in vitro</i>	15
1.4 Покой семян и способы его преодоления.....	21
1.5 Способы сохранения редких растений	25
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	35
3.1 Особенности проращивания семян рябчика русского <i>Fritillaria ruthenica</i> Wikstr.	35
3.2 Техника культивирования рябчика русского <i>Fritillaria ruthenica</i> Wikstr. в условиях <i>in vitro</i>	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	57

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Сохранение биоразнообразия – это одна из важнейших задач человечества. Это особенно актуально для растений, которые находятся в Красных книгах. То, что растение редко встречается в природе, может быть обусловлено естественными или антропогенными факторами. Первая группа включает в себя небольшие площади обитания с необходимыми условиями или недолговременной пригодностью места обитания. Также причины небольшого количества особей могут скрываться в самом растении – недостаточное количество эндосперма в семенах, небольшое количество пыльцы и др. Вторая группа включает в себя распашку полей, выбросы заводами ядовитых веществ и др. [26].

Некоторые виды с трудом размножаются в естественных условиях, поэтому нуждаются в сохранении в генетических банках. Защитить генофонд можно с помощью использования техники *in vitro*. Она представляет собой выращивание растения в стерильных условиях. Состав питательной среды подбирается индивидуально для каждого сорта растения. Изменения в наборе и количестве гормональных и минеральных компонентов позволяет корректировать рост, развитие и устойчивость к неблагоприятным условиям.

У системы *in vitro* есть множество преимуществ, по сравнению с традиционными методами сохранения биоразнообразия:

- экономия площадей;
- независимость от абиотических факторов;
- возможность использования минимального количества эксплантов для получения стерильных проростков [13].

Технология клонального микроразмножения позволяет полностью контролировать условия, в которых выращивается культура (температуру, влажность, освещенность и др.). Это позволяет точно отследить, как условия окружающей среды влияют на культуру.

Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. нуждается в разработке технологий увеличения численности. Культура *in vitro* позволяет за небольшой промежуток времени получить большое количество особей. Полученные растения отличаются генетической однородностью и отсутствием вирусов. С помощью этой технологии можно ускорить переход растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития [34].

Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. – это многолетнее травянистое растение семейства лилейных (*Liliaceae*). Данный вид можно встретить в лесостепных регионах Европейской части, Предкавказье и Западной Сибири. В Пензенской области отмечен в некоторых районах. Растет, как правило, на плодородных почвах. Не обитает в тенистых местах, а также не выдерживает задернения почвы.

Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. способен в течение недлительного времени переносить засуху. Использует атмосферную влагу. Он размножается двумя способами – вегетативным (с помощью дочерних луковиц) или генеративным (с помощью семян). После посадки семян первые всходы можно ждать через два года, но проростки в земле могут повреждаться различными насекомыми. Если семена не были повреждены, то побеги образуются ранней весной.

Вид включен не только в Красную книгу РФ, но и Красную книгу Пензенской области. В нашей области охраняется в заповеднике «Приволжская лесостепь» на участках «Кунчеровская лесостепь», «Попереченская степь», «Островцовская лесостепь» и памятниках природы: «Присердобинская дубрава», «Урочище Лысая гора», «Урочище Шуро-Сиран». Рябчик русский нуждается в постоянном контроле за состоянием популяций [13].

Особенное внимание необходимо уделить половому размножению растения, т.к. из семян образуются особи с новым генетическим материалом. Половое размножение всегда выгоднее, чем бесполое.

Цель и задачи исследований. Цель работы: изучить особенности биологии и экологии рябчика русского, а также возможности культивирования данного растения в условиях *in vitro*.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

1. ознакомиться с распространением, особенностями биологии и экологии рябчика русского;
2. исследовать покой семян рябчика и способы его преодоления;
3. освоить метод культивирования растений в условиях *in vitro*;
4. рассмотреть возможность выращивания рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. в условиях *in vitro*;
5. дать рекомендации по особенностям культивирования рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. в искусственных условиях.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биологические особенности вида *Fritillaria ruthenica* Wikstr.

Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. – представитель семейства Лилиевые *Liliaceae* (рис.1). Это многолетнее растение широко представлено в нескольких ареалах – Сибири, Предкавказье и Европейской части России. В остальных регионах, в том числе и в Пензенской области, вид занесен в Красную книгу. Также данную культуру можно встретить в Красной книге Российской Федерации [12].



Рисунок 1. Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr.

Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. относится к группе луковичных эфемероидов, т.е. к растениям с коротким вегетационным периодом [15]. Эфемероиды способны приостанавливать свое развитие на время засухи, чтобы затем снова начать жизнедеятельность в благоприятное время. В

летний период такие наземную вегетативную часть растения встретить невозможно, т.к. они находятся под землей в виде луковиц [2].

У рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. тонкий стебель длиной 30-50 см. Листья имеют линейно-ланцетную форму. Верхние листья сужаются и образуют спиральную форму. Листорасположение очередное. Крупные цветки смотрят вниз и собраны в редкую кисть. Лепестки имеют бордовый или темно-фиолетовый окрас. Плод – коробочка (рис. 2).



Рисунок 2. Плод рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr.

Размножается Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. двумя способами – вегетативным и генеративным. Первый путь заключается в образовании дочерних луковиц, а второй – в образовании семян. Первые ростки после посева семян можно увидеть только через два года. Луковицы (рис. 3), как и любой другой вегетативный способ, позволяет увидеть взрослое растение через более короткий период [15].



Рисунок 3. Луковицы Рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr.

Изучением распространения данной культуры долгое время не занимались из-за высокой стоимости исследований, поэтому постепенно вид начал исчезать. Самый большой ареал распространения был обнаружен на берегах озера Аслы-куль [12].

В Пензенской области вид Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. можно обнаружить в следующих районах (рис. 4):

- 1) Белинский,
- 2) Городищенский,
- 3) Колышлейский,
- 4) Малосердобинский,
- 5) Неверкинский,
- 6) Никольский,
- 7) Пачелмский,
- 8) Пензенский,
- 9) Сердобский,
- 10) Тамалинский,
- 11) Шемышейский [13].

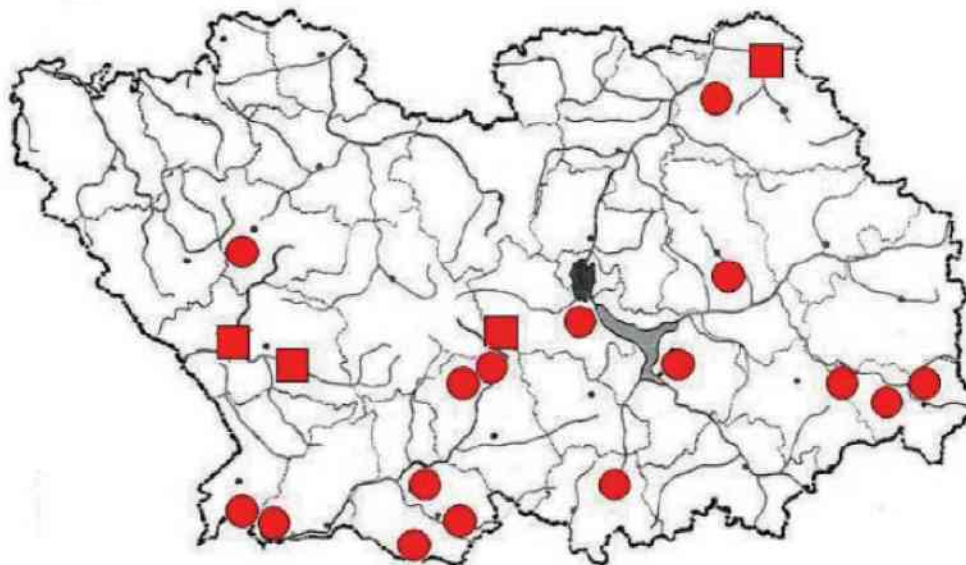


Рисунок 4. Местонахождения Рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. в Пензенской области

- – находки, сделанные в последние 20 лет;
- – находки, зафиксированные в литературе и гербариях

Данный вид относится к ксеромезофитам – пограничное растение между сухолюбами и влаголюбивыми [24]. Встречается в кустарниковых и разреженных лесных сообществах. Растет только на плодородных почвах, при этом при близком залегании карбонатов. Растение можно встретить в защищенных от ветра местах, т.к. тонкий стебель из-за сильных порывов может ломаться [13].

Сокращение популяций Рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. можно связать с двумя основными естественными и антропогенными причинами – ухудшение экологической обстановки и неправильная работа природоохранных сообществ [12].

1.2 Техника культивирования растительного материала на искусственных питательных средах

Микроклональное размножение – это способ искусственного вегетативного размножения, появившийся во второй половине прошлого столетия. Основателем данной методики стал французский исследователь Жорж Морель. Он отметил, что полученное в результате микроклонального размножения растения были свободными от вирусных инфекций. В нашей стране узнали о выращивании клеток на искусственных питательных средах благодаря исследованиям на базе Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева АН СССР в 60-х годах XX века [21].

Методика *in vitro* имеет ряд преимуществ:

- 1) ускорение селекционных работ (новые сорта можно получить за 2-3 года),
- 2) получение здорового материала за короткие сроки,
- 3) отсутствие контакта с внешней средой,
- 4) получение большого количества растений с единицы площади,
- 5) исключение вредных биогенных и абиогенных факторов развития,
- 6) длительное хранение клеток в искусственных условиях [18, 39].

Методика *in vitro* – методика выращивания клеток и тканей в стерильных условиях на искусственных питательных средах. Полученный материал особенен, т.к. может образовывать специфические вещества и стимулирует рост регенератов. Данная методика имеет широкое практическое значение.

Микроклональное размножение – это один из способов искусственного вегетативного размножения. Схема микроклонального размножения изображена на рисунке 5. С помощью активации существующих меристем можно размножать различные культуры, в том числе Рябчик русский (*Fritillaria ruthenica* Wikstr.).

Микроклональное размножение растений

Суть метода

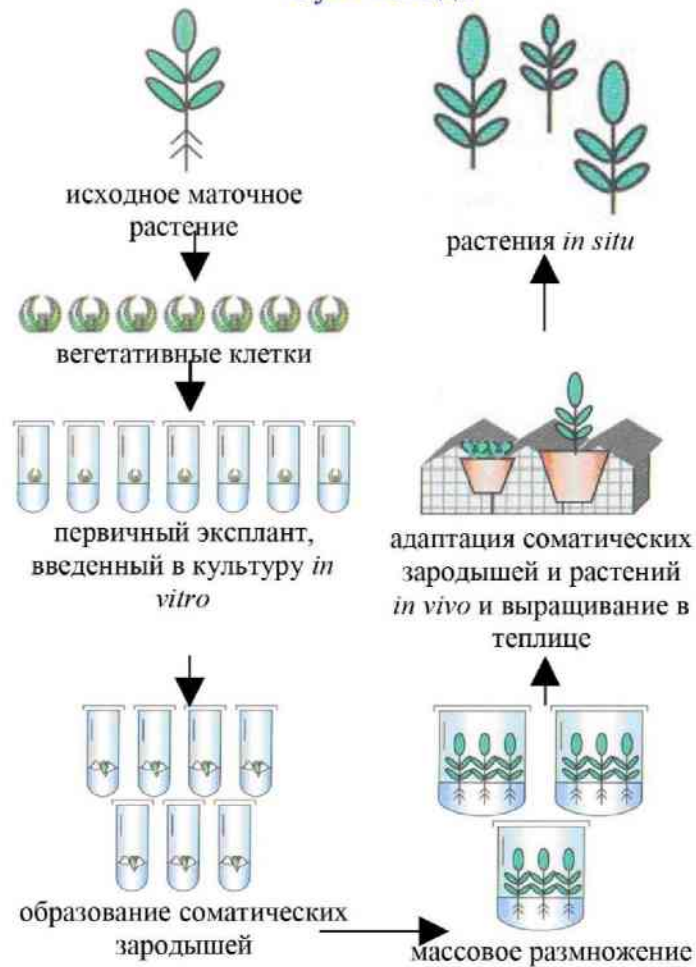


Рисунок 5. Схема микроклонального размножения растений

Все манипуляции с питательной средой и растением необходимо проводить в ламинар-боксе под действием ультрафиолетовых ламп. Прежде чем помещать меристемы в среду, необходимо подготовить растительный материал (семя, узел, луковицы и др.).

На поверхности растения находятся микроорганизмы, которые при попадании на среду потребляют питательные вещества и выделяют свои продукты жизнедеятельности. Поэтому перед проведением работы необходимо стерилизовать растительные эксплантаты. Для качественной обработки необходимо проводить стерилизацию в несколько этапов. Обеззараживание проводят с помощью различных веществ. Важно учитывать

не только состав вещества, но и время нахождения растения в растворе. При недостаточном времени пребывания уничтожаются не все микроорганизмы, а при избыточном – повреждается само растение.

Чтобы ламинар-бокс был стерильным, необходимо все поверхности обработать 70%-ным раствором этанола. Все используемые приборы и руки необходимо также обрабатывать. В ламинар-бокс необходимо внести:

- 1) стакан с обеззараженными растениями,
- 2) пинцет,
- 3) скальпель,
- 4) спиртовку,
- 5) пробирки с питательной средой.

Пинцеты и скальпели можно стерилизовать с помощью пламени спиртовки. Растительные эксплантаты вертикально помещают в пробирки с питательной средой с помощью пинцета. Пробирки закрываются с стерильными ватными пробками. Работу рекомендуется выполнять быстро, чтобы внутрь не проникли споры грибов и бактерий.

Методика *in vitro* основывается на выращивании растения на питательной среде, которая представляет собой раствор минеральных солей, органических веществ, витаминов и фитогормонов. По агрегатному состоянию их можно классифицировать на жидкие и твердые. По составу они практически не отличаются, но для образования твердой среды добавляют агар-агар [1].

Для нормального развития растению необходимы различные элементы. В природе организм получает азот, фосфор, серу из органических соединений. Из минеральных веществ растение получает железо, цинк и другие элементы для синтеза хлорофилла. Некоторые другие ионы используются для поддержания нормального физиологического состояния.

При использовании методики *in vitro* клеткам необходимо обеспечить доступ ко всем химическим элементам. Азот растение получает в составе нитратов, нитритов, аммония, фосфор – в фосфатах, серу – в сульфатах и т.д.

Также организму необходимы углеводы, находящиеся в органических соединениях. Как правило, в питательных средах используются моно- и дисахариды.

Для нормального метаболизма растений в питательную среду необходимо добавлять витамины. Биологические катализаторы используются для стимуляции биохимических реакций. В питательной среде должно быть как минимум три витамина – В₁, В₆, РР. Тиамин (витамин В₁) необходим для нормального протекания углеводного обмена. Пиридоксин (витамин В₆) участвует в белковом метаболизме. Никотиновая кислота (витамин РР) необходим для изъятия катиона водорода от органических молекул.

Обязательными компонентами любой питательной среды являются фитогормоны. Они положительно влияют на рост и развитие клеток, а также способствуют изменению проницаемости мембран. Ауксины и гиббереллины обеспечивают переход протонов из цитоплазмы, в результате чего связи между полисахаридными фибриллами практически разрывается. Таким образом, под действием фитогормонов клеточная стенка размягчается и становится более эластичной. В питательных средах, как правило, используется несколько видов фитогормонов.

Ауксины провоцирует рост и развитие изолированных клеток. Данный вид фитогормонов размягчает клеточные стенки, что позволяет клеткам активно делиться. Цитокинины позволяют тканям организма разрастаться путем деления клеток. Гиббереллины увеличивают активность цитокининов и ауксинов, а также стимулируют деление клеток меристемы. Этилен и абсцизины замедляют рост и развитие растения, поэтому в методике *in vitro* не используется.

Современной науке известны разнообразные составы питательных сред для культивирования питательных сред клеток, тканей и органов методики *in vitro*. Например, к ним относятся среды Мурасиге и Скуга, Гамборга, Уайта, Блейдза и т.д. Наиболее часто используется питательная среда Мурасиге и Скуга.

Среда Мурасиге и Скуга включает в себя компоненты в различных концентрациях. Маточные растворы должны содержать макроэлементы в десятикратной концентрации, а также микроэлементы в стократной концентрации. При приготовлении питательной среды необходимо все компоненты точно взвешивать. Каждую соль нужно растворять в дистиллированной воде, т.к. все вещества усваиваются растениями только в растворенном виде [1].

Питательную среду изготавливают при расчете на 1 л. Она включает в себя ряд компонентов (табл. 1).

Таблица 1 – Компоненты питательной среды Мурасиге-Скуга

Компонент	Объем, мл
Макросоли	100
Микросоли	1
Хелатное железо	5
Компонент	Масса, мг
Мезоинозит	100
Тиамин	1
Пиридоксин	1
Никотиновая кислота	0,5
Сахароза	30000
Агар-агар	7000

Чтобы вырастить растение в асептических условиях, необходимо простерилизовать питательную среду в чашках Петри или в пробирках. Автоклавирование – обработка паром под давлением. Клетки бактерий и грибов уничтожаются за 10 минут при температуре 60°, а споры – за 145 минут при 120°С. Питательная среда после автоклавирования должна оставаться прозрачной. Помутневший раствор не подходит для проведения работы.

Помимо того, что необходимо обрабатывать питательную среду от вирусов, бактерий и грибов, также нужно обеззараживать растительные материалы. Для стерилизации используются, как правило, различные вещества – хлорамин, сулема, перекись водорода, перманганат калия и т.д.

Необходимо не только удалить микробы, но при этом не повредить материал. После стерилизации необходимо промыть растение дистиллированной водой в течение 10-20 минут.

1.3 Фитогормоны в условиях *in vitro*

На рост и развитие растения оказывают влияние различные фитогормоны. Они подразделяются на несколько видов, которые отличаются по функциям.

Ауксины латерально передвигаются по стеблю и корню. Формула ауксинов представлена на рисунке 6. С помощью света ауксины перемещаются из затемненной части в освещенную. Сила тяжести определяет латеральное перемещение ауксинов [7, 8].

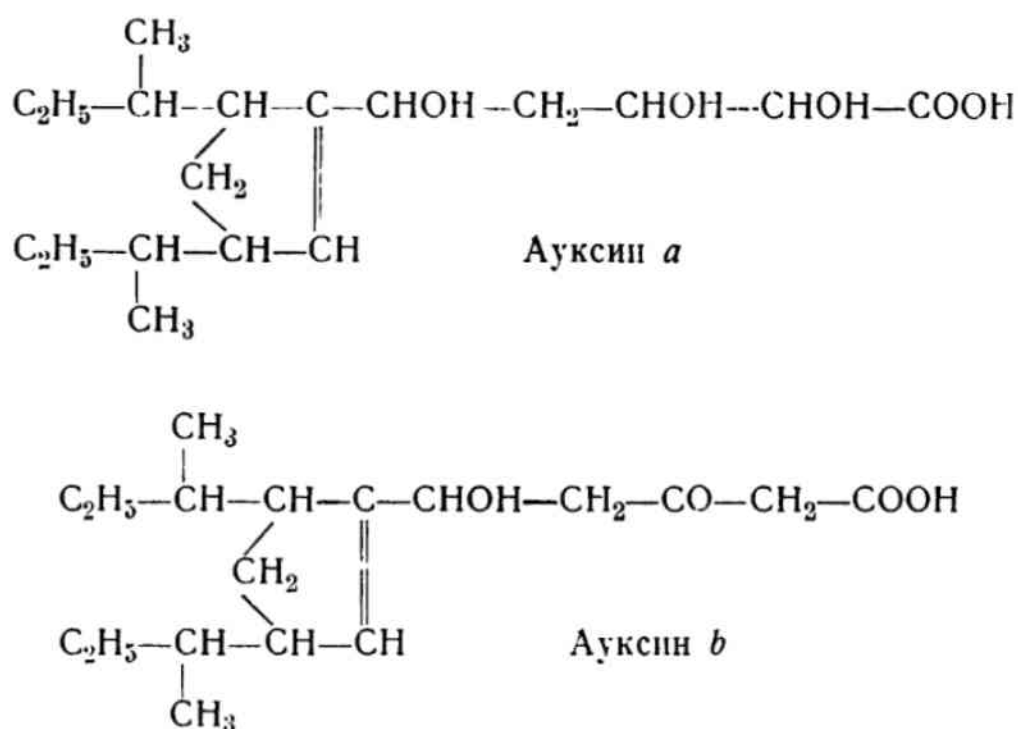


Рисунок 6. Структура ауксина *a* и ауксина *b*

В высших растениях в камбии, почках, листьях, семенах и пыльце находится ИУК. Максимальный синтез ауксина происходит в верхушке побега [20] и в прорастающих семенах [17].

Ауксины необходимы для деления, дифференциации и растяжения клеток [5, 8, 11, 16, 19, 28, 29]. Они участвуют в регенерации растений. Также было доказано, что ИУК увеличивает толщину стебля за счет активного деления клеток основной ткани [6].

Но избыток ауксина может превратиться в ингибитор. Также следует учитывать то, что разные ткани растений требуют разной концентрации ауксинов. При высокой концентрации ауксинов выделяет этилен, который является ингибитором [8]. Ауксины используются для развития корневой системы черенков, для борьбы с сорными растениями, а также для развития плодов [14].

Гиббереллины включают в себя множество соединений. Самое известное соединение этого фитогормона – гибберелловая кислота GA_3 . Формула данной молекулы представлена на рисунке 7.

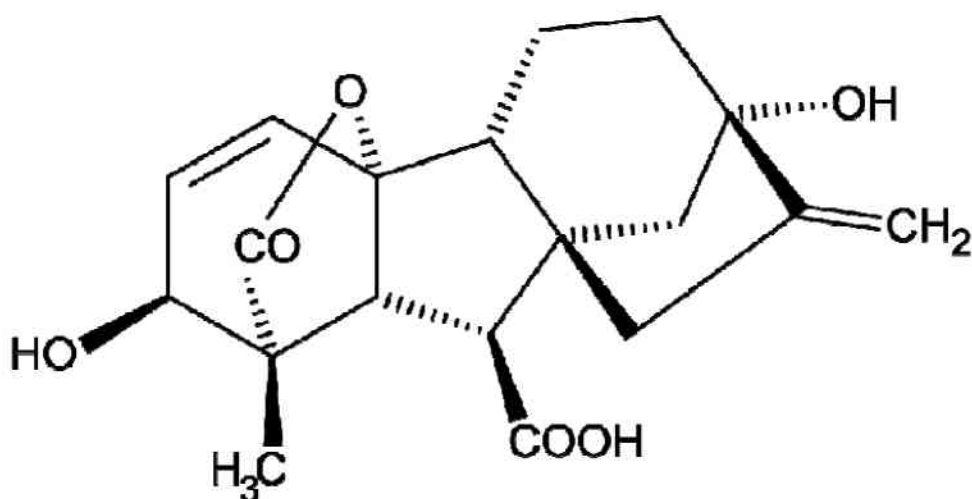


Рисунок 7. Структура гибберелловой кислоты GA_3

У высших растений гиббереллины содержатся в незрелых семенах. Также они образуются в корнях и листьях [20]. Гиббереллины перемещаются по ситовидным трубкам и сосудам. Им не свойственна полярность [8].

Действие гиббереллинов направлено на рост стебля, которое достигается с помощью растяжения клеток [8, 16]. С помощью этого фитогормона длина междоузлий увеличивается. Также гиббереллин способен выводить семена из состояния покоя, замедляет старение однолетних органов, поддерживает состояние фотосинтетического пигмента, белков и рибонуклеиновых кислот [7].

Гиббереллин оказывает влияние на сексуализацию растений. Были проведены эксперименты, доказывающие, что под действием гиббереллина на женских растениях образовывались мужские цветки, а на мужском – формировались женские.

При обработке гибберелловой кислотой образуются, как правило, одностолбчатые растения [33]. У некоторых сортов винограда этот фитогормон может формировать плоды без семян [32]. Также это вещество используется для образования гибридных семян [40].

Цитокины образуются в корнях, а затем переходят в надземные органы. Они необходимы для нормального деления клеток. Формула цитокининов представлена на рисунке 8.

Цитокинины в большем количестве содержатся молодых семенах и плодах [28]. Они подразделяются на две группы – активные и неактивные. Также эффекты от этого фитогормона можно разделить на два типа – стимулирование деления клеток и замедление процессов старения [8, 16]. К первому типу относятся стимуляция формирования почек, прорастания семян. Второй тип включает в себя изменения в листьях [8].

Цитокинины влияют на испарение лишней влаги листа. Этот процесс осуществляется с помощью устьиц. Они также активизируют синтез хлорофилла [3].

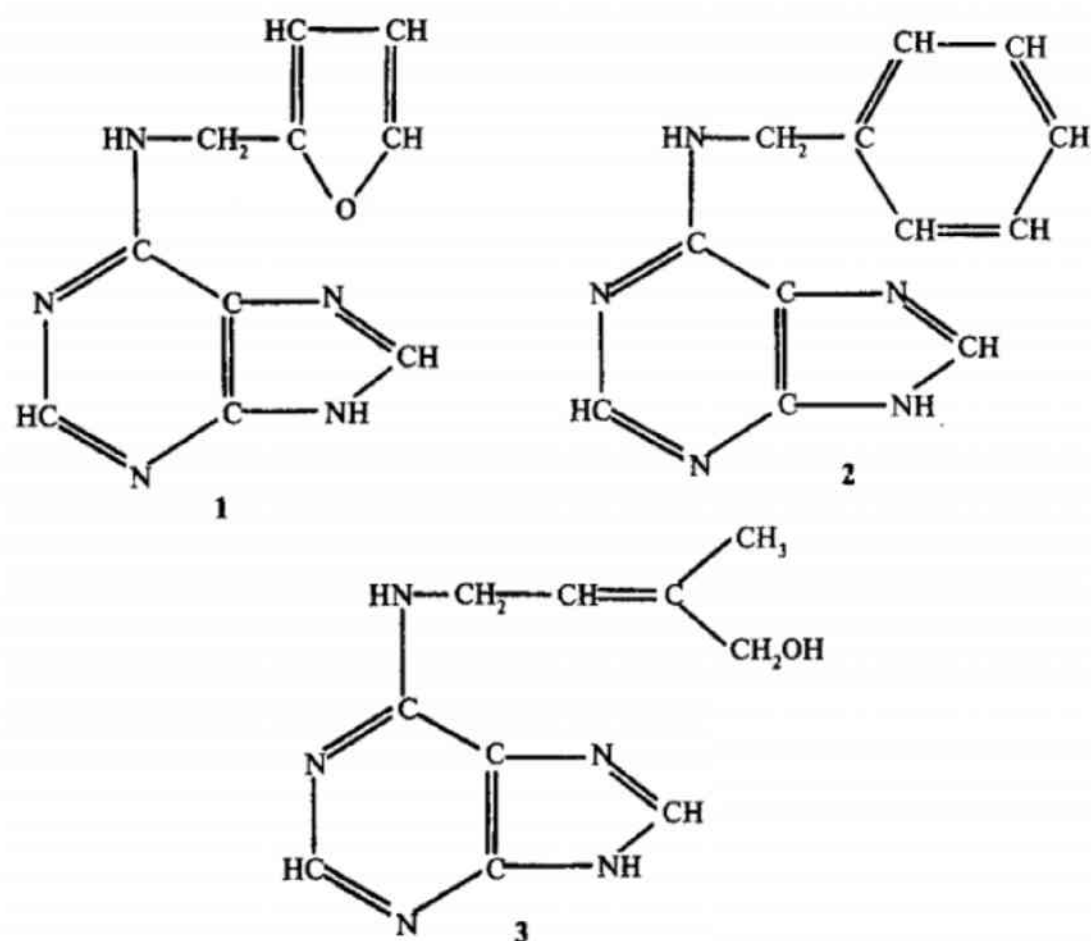


Рисунок 8. Структура цитокининов. 1 – кинетин, 2 – 6-БАП, 3 – зеатин

Цитокинины необходимы для нормального развития однолетних органов растения. Если воздействовать цитокинином при разных температурах воздуха, то можно отметить, что активизируется работа аппарата биосинтеза белка. Благодаря этому образуются благоприятная внутриклеточная среда растения [25].

Цитокинины применяются при образовании обоеполых цветков, а также при формировании цветков на мужских растениях винограда. Они нарушают покой клубней [14].

Некоторые фитогормоны, наоборот, замедляют рост и развитие растения. Например, к этой группе относится этилен. Он представляет собой бесцветный газ с эфирным запахом. Он легче воздуха. Формула этилена представлена на рисунке 9 [8].

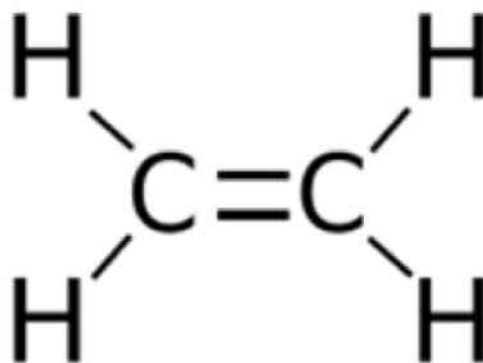


Рисунок 9. Структура этилена

Этилен образуется в результате реакций многих соединений [20]. Его можно получить из представителей всех отделов растений [8, 20]. Стареющие ткани и незрелые ткани представители отдела Цветковые синтезируют данный фитогормон [14].

Этилен оказывает множество действий на растения:

- 1) замедление роста в высоту,
- 2) угнетение роста корня,
- 3) утолщение органов,
- 4) потеря геотропизма,
- 5) опадание листьев раньше срока,
- 6) ускорение роста боковых корней,
- 7) ускорение созревания плодов [8, 20].

Этилен также может определять пол растения. Он оказывает влияние на формирование женских цветков и угнетает образование мужских цветков у некоторых видов растений.

Этилен часто используют для ускорения образования плодов. Он останавливает полярный транспорт ауксина и способствует синтезу конъюгатов. Именно поэтому этилен способствует опаданию листьев и запуску процессов старения [20].

Абсцизовая кислота (АБК) находится в разных органах растения – побегах, семенах, плодах, корнях. Ее можно обнаружить во всех растениях, кро-

ме водорослей [8, 14]. Она проходит по тканям и, таким образом, распределяется по всему растению, но данный процесс не полярен. Формула АБК представлена на рисунке 10.

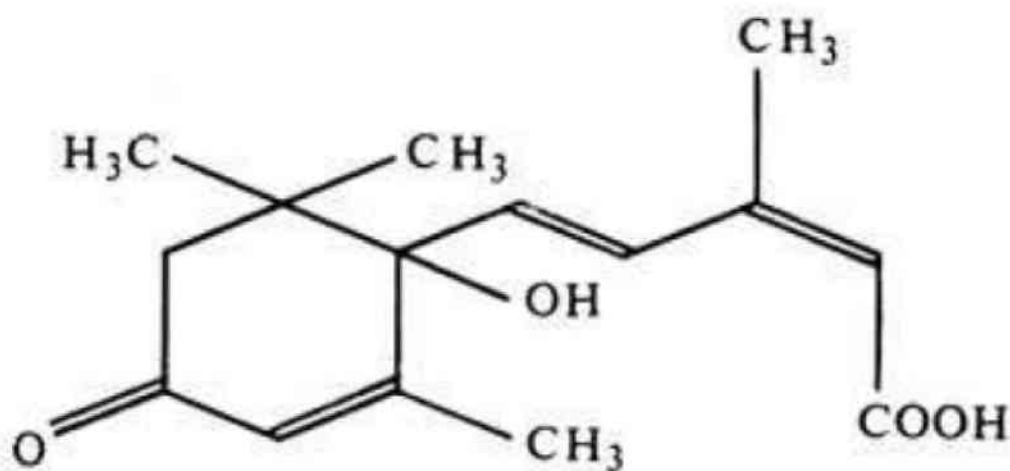


Рисунок 10. Структура абсцизовой кислоты

Абсцизовую кислоту можно обнаружить в старых плодах, листьях, семенах в состоянии покоя и почках [14, 20]. АБК, также как и этилен, является ингибитором. В мужских цветках данного фитогормона больше, чем в женских. АБК повышает устойчивость растения к неблагоприятным условиям, но это зависит от специфики патогена [25].

Но, как правило, абсцизовая кислота тормозит рост растения [20]. Также в некоторых источниках уточняется, что АБК влияет на положительный геотропизм корня и закрывание устьиц [8].

Многим наземным растениям необходимо выстраивать собственные механизмы защиты от влагопотери. Один из основных механизмов заключается в том, что давление паров воды больше, чем в межклетниках, и устьица закрываются. Также у некоторых растений в защите от потери воды участвует АБК. Данный фитогормон обеспечивает быстрое закрывание устьиц и, таким образом, уменьшаются транспирация листьев [8]. АБК обеспечивает распад нуклеиновых кислот, белков и фотосинтезирующих пигментов, поэтому

данный фитогормон оказывает влияние на старение однолетних органов и созревание плодов [20].

АБК часто используют при повышении устойчивости к засухе. У клубневых растений данный фитогормон ускоряет формирование клубней [14]. Также данное вещество способно замедлять образование дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), рибонуклеиновой кислоты (РНК) и аминокислот [23].

Таким образом, на растение могут оказывать огромное влияние на рост и развитие растения. Есть фитогормоны катализаторы и ингибиторы, которые оказывают различное влияние на жизнь организма. При проращивании семян и взрослых растений необходимо использовать все нужные вещества.

1.4 Покой семян и способы его преодоления

Покой – свойство, которым наделены многие растения. Оно подразумевает под собой остановку в развитии. Покой для растения характерен до тех пор, пока на организм не воздействуют определенные факторы. Это состояние позволяет растению пережить неблагоприятные условия. Покоящиеся семена не прорастают даже при наличии достаточного количества воды и воздуха [4].

Семя – орган полового размножения растений. С его помощью распространяются все цветковые растения. Семена часто используют при получении проростков в условиях *in vitro*. Но у них есть один существенный недостаток – им свойственно состояние покоя, которое иногда не дает тронуться в рост на протяжении нескольких лет. Но с другой стороны, данному состоянию характерно замедление процессов метаболизма. В этот период растение не тратит энергию и питательные вещества на метаболические процессы – это преимущество состояния покоя.

В зависимости от вида растений им свойственны разные виды покоя (табл. 2).

Таблица 2 – Классификация типов органического покоя

Формула покоя	Тип покоя	Причины покоя	Условия нарушения покоя
Типы экзогенного покоя (А)			
A ₁	слабый	слабое замедляющее влияние околоплодника	повреждение околоплодника, помещение плодов в дистиллированную воду, влияние низких температур на семя
A ₂	сильный	сильное замедляющее влияние околоплодника	повреждение околоплодника, влияние низких температур на семя
A _ф	физиологический	непроницаемость тканей	нарушение целостности внешних покровов семян, воздействие низкими или высокими температурами, воздействие серной кислотой
Типы эндогенного покоя (Б и В)			
Б	морфологический	недоразвитие зародыша	воздействие высоких температур
В ₁	неглубокий физиологический	слабый физиологический механизм торможения прорастания	нарушение целостности тканей, непродолжительное воздействие низкой температурой, отсутствие влаги при хранении, проращивание под воздействием света, воздействие фитогормонами (гиббереллином) и др.
В ₂	промежуточный физиологический	средний физиологический механизм торможения прорастания	продолжительное воздействие низкими температурами и т.д.
В ₃	глубокий физиологический	сильный физиологический механизм торможения прорастания	
Б-В ₁	неглубокий физиологический	слабый физиологический механизм торможения прорастания	воздействие сначала низкими температурами, а затем высокими
Б-В ₂	промежуточный физиологический	средний физиологический механизм торможения прорастания	
Б-В ₃	глубокий физиологический	сильный физиологический механизм торможения прорастания	
Б-В ₃	глубокий эпикотильный морфологический и физиологический	сочетание недоразвития зародыша и сильного физиологического механизма торможения прорастания	воздействие сначала высокой, а затем низкой температурой

Таблица 2 – Продолжение

Формула покоя	Тип покоя	Причины покоя	Условия нарушения покоя
Б-В ^Д ₃	глубокий двойной морфологический и физиологический	сочетание недоразвития зародыша и сильного физиологического механизма торможения прорастания	воздействие сначала высокой, а затем низкой температурой (проводится два раза)
БВ-В ₁	неглубокий морфологический и физиологический	слабый физиологический механизм торможения прорастания	воздействие низкой температурой
БВ-В ₂	промежуточный морфологический и физиологический	средний физиологический механизм торможения прорастания	
БВ-В ₃	глубокий морфологический и физиологический	сильный физиологический механизм торможения прорастания	
Типы комбинированного покоя (А-Б-В)			
	Все возможные варианты выше перечисленных типов покоя		длительное воздействие низкими и высокими температурами

Для быстрого прорастания растения необходимо определить тип покоя семени. В современной науке выделяют три типа покоя семян – экзогенный (А), эндогенный (Б, В) и комбинированный (А, Б, В) [22].

Для семян, находящихся в состоянии экзогенного покоя (А), свойственно неодинаковое во времени прорастание. Первые всходы могут появиться спустя несколько лет. Данный тип покоя связан с тормозящим действием околоплодника. В этой структуре могут содержаться ингибиторы, тормозящие рост и развитие растения. Они могут оказывать не только негативное влияние, но и положительное. Например, ингибиторы позволяют семенам переживать неблагоприятные условия.

Экзогенный покой делится на несколько видов – сильный, средний и слабый. Сильный покой характерен для косточковых растений. Чтобы преодолеть покой, необходимо удалить околоплодник или провести холодную стратификацию. Данный тип покоя редко встречается в природе. Экзогенный

тип покоя невозможно преодолеть с помощью обработки стимуляторами роста.

Значительное влияние на прорастание растения оказывает физический покой (твердосемянность). В данном состоянии в семя или околоплодник не поступает влага. Данный тип покоя часто встречается у растений, имеющих сельскохозяйственное значение. Физический покой может возникнуть из-за высыхания семян. В этом случае сначала кожура семени полностью отдает влагу, а затем воды удаляется через рубчик. Если вода не проникает в семя, значит, растение не может тронуться в рост. В естественных условиях, даже при высокой влажности, покой не нарушается. В искусственной среде на семя можно воздействовать с помощью различных температур, веществ и т.д. Физический покой преодолевается с помощью комплекса процедур (скарификации, ошпаривание водой или серной кислотой и др.).

Особенные свойства зародыша обеспечивают эндогенный покой. Данный тип покоя классифицируют на морфологический, физиологический и морфофизиологический.

Морфологический покой обосновывается недоразвитостью зародыша. Он свойственен для растений тропиков и субтропиков. Для наших широт данный тип покоя практически не характерен. Семена прорастают только в том случае, если зародыш развивается до конца. В искусственной среде для развития зародыша на семя можно воздействовать высокой температурой на протяжении нескольких дней, недель или месяцев.

Физиологический покой характеризуется низкой ростовой способностью растения, непроницаемостью тканей зародыша. Он встречается у растений субтропиков и умеренных широт. Данный тип покоя создает для растения физиологический механизм торможения разной силы (неглубокий, промежуточный и глубокий). Низкие температуры позволяют преодолеть физиологический покой.

Неглубокий физиологический покой свойственен для свежих семян разных видов. Он преодолевается естественным образом путем хранения в

сухом состоянии, а затем обработки низкой или высокой температурой набухших семян.

Промежуточный и глубокий покой можно преодолеть с помощью продолжительной холодной стратификации или обработкой фитогормонами. Но при полном удалении покровов семя не способно расти.

Морфофизиологический покой включает в себя недоразвитость зародыша и физиологический механизм торможения. Чтобы преодолеть данный тип покоя, необходимо поместить семена в холодильник.

Комбинированный покой состоит из экзо- и эндогенного покоя. Данный тип чаще всего встречается в природе. Комбинированный покой классифицируется на различные виды, поэтому выбрать способ преодоления покоя семян непросто. Для получения первых ростков необходимо обеспечить поступление влаги в семена, а затем проводить стратификацию. Но это не единственный способ преодоления семян.

Таким образом, в зависимости от типа покоя семян необходимо выбирать методику проращивания. Для каждого вида растений свойственен свой тип покоя.

1.5 Способы сохранения редких растений

На территории Российской Федерации обитает около 25 тысяч видов растений, из которых 1500 видов – сельскохозяйственные культуры, а 1000 видов – растения медицинского значения. В Красную книгу занесены 652 вида растений, большую часть которых составляют представители отдела Покрытосеменные (*Magnoliophyta*).

Чтобы сохранить биологическое разнообразие, необходимо пройти четыре основных пути:

- 1) внесение в законодательные документы редкого или исчезающего вида растений;

- 2) поставить охрану на участки, где обитают представители редких или исчезающих видов растений;
- 3) сохранение коллекций в ботанических садах и университетах;
- 4) сохранение генофонда в генетических банках [9].

С каждым годом проблема исчезновения редких и исчезающих видов становится все ярче. Данный вопрос освещается не только в научных сообществах, но и в телевидении и интернете. Красные книги составляются для того, чтобы государственные органы и общественность предприняли меры для сохранения биоразнообразия. Впервые проблему исчезновения вида отметили орнитологи в начале XX века. В 1902 году была создана первая в мире Международная конвенция по охране птиц. Спустя несколько десятилетий в 1963 году был организован Всемирный союз охраны природы и составлены первые списки редких видов. В 1975 году была издана первая Красная книга растений.

Красная книга – это официальный документ, который постановляет исчезающие виды и утверждает меры сохранения биоразнообразия. В ней определяются места обитания, которые нуждаются в охране. Для каждого вида растений свойственна своя категория по охране места обитания. Все исчезающие виды запрещено изымать из естественных мест обитания.

Растения из Красной книги необходимо исследовать в ботанических садах и лабораториях. Изучение особенностей прорастания позволяет выращивать растение в искусственных условиях и возвращать их в природу. С помощью Красной книги активисты узнают о редких видах, находят их новые места обитания и сообщают о них специалистам. Список редких растений постоянно меняется, поэтому издания выпускаются регулярно [10].

Ис исчезающие виды можно сохранять с помощью не только Красных книг, но и ботанических садов. По мнению П.С. Вайса Джексона ботанический сад – это «учреждение, хранящее документирующие коллекции живых растений в целях научных исследований». Растения могут находиться под угрозой исчезновения из-за негативных последствий хозяйственной деятель-

ности человека. К антропогенным причинам возникновения редких видов можно отнести расчистки естественных мест обитания, эрозии и засоления почв, а из биотических причин одна из значимых – изменение климата.

С начала XXI века по настоящее время в Красный список МСОП были включены более 40 тысяч видов цветковых растений. Для сохранения растений была создана Конвенция о биологическом разнообразии (КБР). Она возлагает ответственность за сохранение видов на ботанические сады. В 2003 году ботанические сады России приняли КБР.

В 2002 году в КБР вошла Глобальная стратегия сохранения растений (ГССР). Ее целью стало изучение и документирование разнообразия растений, разработка методик сохранения видов. В 2010 году была установлена задача включения более 75 процентов в коллекции *ex situ* и более 20 процентов доступных программ для восстановления до 2020 года. В 2012 году в ботанических садах культивировалось около 64% редких видов из Красной книги Российской Федерации, а в 2020 году этот показатель возрос до 73%.

Сохранение биологического разнообразия можно достичь с помощью законодательных документов. Существуют как международные, так и российские законы по охране природы. В нашей стране охрана растений устанавливается Федеральным законом от 10 января 2002 года №7-ФЗ «Об охране окружающей среды». В России также была принята стратегия по восстановлению популяций редких видов растений. Она должна быть реализована до 2030 года.

Также в сохранении редких или исчезающих видов растений немаловажную роль играет Красная книга. В Российской Федерации повреждение территорий, где находятся представители видов из Красной книги, или самих растений карается по закону. Во многих других государствах информация в Красной книге носит рекомендательный характер.

Сохранение растений методом «*ex situ*» осуществляется в научных учреждениях. Схема данного метода представлена на рисунке 11. В данном случае невозможно вырастить материал для его хранения в генетических

банках, т.к. метод подразумевает размножение видов, не подходящих для консервации или размножающихся вегетативным путем. Но тем не менее, ботанические сады или другие научные учреждения позволяют сохранять огромное количество видов.

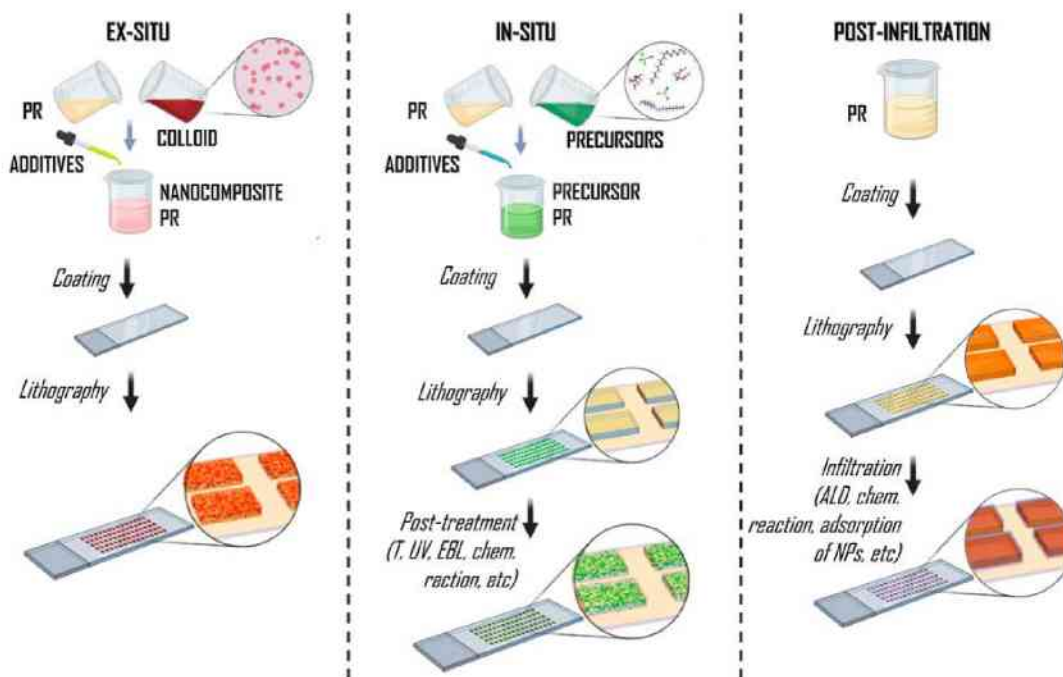


Рисунок 11. Схема метода «ex situ»

Создание генетических банков – самый эффективный способ сохранения редких или исчезающих видов растений. На данный момент существуют банки семян, тканей, пыльцы, ДНК. В генетических банках семена хранятся в сухом виде при низких температурах. Образовательные ткани помещают на питательные среды при фиксированном освещении и температурном режиме. Пыльца хранится в пыльцевых зернах. ДНК содержится в зародышевой плазме, которую сохраняют с помощью технологий криоконсервации [9]. Схема данного процесса представлена на рисунке 12.

Государство также заботится о природе на законодательном уровне с помощью, например, статьи 60 «Охрана редких и находящихся под угрозой исчезновения растений, животных и других организмов» федерального закона «Об охране окружающей среды». Он был принят 20 декабря 2001 года.

Согласно ему каждый гражданин имеет право на благоприятную окружающую среду. Но вместе с тем каждый должен заботиться о природе и не разрушать ее.



Рисунок 12. Схема криоконсервации растений

Статья 60 включает в себя несколько пунктов:

1. Для сохранения и учета редких видов создается и обновляется Красная книга Российской Федерации, а также субъектов государства. Представителей редких видов запрещено использовать в хозяйствах. Но для сохранения биоразнообразия планеты экземпляры редких видов помещают в генетические банки и в искусственные среды. На территории государства запрещены действия, направленные на сокращение численности представителей редких видов.

2. Все меры, направленные на сохранение редких видов, регулируются законодательством в области охраны окружающей среды.

3. Ввоз в Российскую Федерацию, вывоз из государства, перевозка и оборот редких видов регулируется законодательством Российской Федерации с учетом общепризнанных принципов и норм международного права.

Таким образом, о сохранении редких видов заботится государство на законодательном уровне. Пополнение списков Красной книги Российской Федерации и субъектов государства, охрана природных местообитаний, создание заповедников, помещение представителей редких видов в генетические банки – это меры, которые помогут сохранить биоразнообразие. Также исследование анатомических, физиологических и экологических особенностей особей положительно влияет на сохранение редких видов.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования – растение отдела Цветковые (Магнолиофиты, Покрытосеменные) – отдел *Magnoliophyta*. Класс Лилиопсиды (Лилиевые, Однодольные) – класс *Liliopsida*. Порядок Лилейные – порядок *Liliales*. Семейство Лилейные – семейство *Liliaceae*. Род Рябчик – род *Fritillaria*. Вид Рябчик русский – вид *Fritillaria Ruthenica* Wikstr. [38].

Исследования проводились на семенах, собранных в ботаническом саду им. И.И. Спрыгина [36]. Опыт закладывался при разных световых и температурных условиях. Проращивание семян проводилось в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге. В каждую чашку помещалось по 20 семян. С помощью данного исследования определялась всхожесть семян.

Не все семена могут считаться нормально проросшими. Всхожесть определяется по развитым корешкам и листочкам. Также семена должны соответствовать следующим критериям:

1. поверхностные повреждения не должны затрагивать глубокие ткани,
2. при повреждениях главного корня, должны быть целыми боковые и придаточные корни,
3. может быть повреждена одна семядоля или незначительно обе семядоли,
4. органы должны быть не повреждены.

Существует два вида всхожести – лабораторная и полевая. Первую определяют через одну-две недели проращивания семян в чашках Петри при фиксированной температуре. Вторая определяется по процентному соотношению всхожих и посаженных семян. Полевая всхожесть ниже лабораторной. Это связано с тем, что в естественных условиях сложнее создать оптимальные условия для растений [37]. В ходе исследования определялась лабораторная всхожесть.

Рябчик русский *Fritillaria Ruthenica* Wikstr. в естественных условиях прорастает не всегда. Именно с этим фактом связано то, что оно входит в Красную книгу Российской Федерации, а также Пензенской области. Семенам свойственен покой, при котором они не растут до наступления благоприятных условий. Но для семян рябчика русского *Fritillaria Ruthenica* Wikstr. не подходит простое замачивание, поэтому было решено поместить семена в условия пониженных температур.

Затем пророщенные семена помещались в питательную среду. Все манипуляции проводились в стерильном боксе обеззараженными инструментами. Приборы стерилизовались в сухожаровом шкафу, а затем обрабатывались спиртом и обжигались в пламени спиртовки.

Питательная среда готовилась в соответствии с таблицей Мурасиге-Скуга (табл.1). Чтобы растение нормально росло и развивалось, необходимы не только питательные вещества, но и различные витамины с гормонами. Дополнительно в среду добавлялись фитогормоны (индолилуксусная кислота (ИУК) (2 мг/л), кинетин (2 мг/л) и гиббереллин – гибберелловая кислота (ГА3) (2 мг/л), сахароза (20 г/л). Все эти соединения благоприятно повлияют на рост и развитие растения. К тому же состав питательной среды был модифицирован. Ее структура была подобрана в предыдущих работах на примере растений рода *Iris*.

В питательной среде не должны присутствовать споры бактерий и грибов, т.к. эти организмы будут поглощать все вещества и у растений будет недостаток питания. Таким образом, пропуск этого этапа может повлечь за собой то, что семена не будут расти и развиваться. Питательная среда стерилизовалась в автоклаве при температуре 123°C и давлении 1 атм в течение 40 минут.

Чтобы питательная среда была стерильной, все работы проводились в асептическом помещении с помощью обеззараженных инструментов. Ламинар-бокс обрабатывается спиртом, а также с помощью ультрафиолетового излучения. Руки также обрабатывались спиртом, а инструменты помещали в

пламя спиртовки. Пробирки нельзя вынимать из ламинар-бокса до окончания проращивания.

Перед помещением семян в питательную среду, они стерилизовались в растворах по двум схемам:

- 1) раствор «Жавель-клейд» с концентрацией 1% с натриевой солью дихлоризоциануровой кислоты $C_3O_3N_3CL_2NA$ с концентрацией 80-82% (15 минут) → раствор пероксида водорода H_2O_2 с концентрацией 3% (3 минуты) → дистиллированная вода (3 раза);
- 2) перманганат калия $KMnO_4$ с концентрацией 0,5% (15 минут) → сульфат меди (II) $CuSO_4$ с концентрацией 1% (15 минут) → этиловый спирт C_2H_5OH с концентрацией 70% (1 минута) → перекись водорода H_2O_2 с концентрацией 3% (1 минута) → дистиллированная вода (несколько раз).

После стерилизации семена рябчика русского *Fritillaria Ruthenica* Wikstr. помещали в питательную среду в асептических условиях с помощью обеззараженных инструментов. Чтобы в культуру *in vitro* из воздуха не проникали споры бактерий и грибов, необходимо закрывать пробирки пробками. Но при этом нельзя ограничивать доступ к воздуху. Поэтому в исследовании использовались пробирки из ваты и марли, но они дополнительно нуждались в стерилизации. Для этого пробки ненадолго помещались в пламя спиртовки.

Растения выращивали при естественном освещении (8000-15000 лк) и температуре (+20-25°C). Измерение интенсивности освещения проводили в 12 часов дня при помощи люксметра Ю-116. Дополнительные источники света не применялись. Температура воздуха – комнатная (+20-25°C). Ее показатели измерялись с помощью комнатного термометра.

В культуру *in vitro* было пересажено 20 проростков. В ходе работы необходимо было получить посадочный материал, который подходит для выращивания растения в естественных условиях. В природные местообитания проростки помещены не были, но они были посажены в грунт.

Впоследствии результаты работы могут быть использованы для выращивания в естественных местообитаниях. Культура *in vitro* – это идеальные условия для выращивания семян, т.к. в этом случае растение получает все необходимые вещества для нормального развития. Таким образом, работа направлена на выведение рябчика русского из списка редких видов.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Особенности проращивания семян рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr.

Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. может размножаться двумя способами – вегетативным и генеративным путем. Половой путь размножения выгоден тем, что он предполагает новые комбинации генов у потомков. Семенное размножение – основной способ увеличения площади и численности растений. В ходе исследования использованы семена, которые были взяты в ботаническом саду им. И. И. Спрыгина.

Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. входит в список редких видов растений. Этот факт может быть связан со многими причинами, одна из которых – это особенности развития и роста семян. В ходе исследования была поставлена цель изучить особенности развития семени и найти способ преодоления покоя. Результаты работы направлены на выведение рябчика русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. из Красной книги Российской Федерации и субъектов государства.

Опыт был заложен в сентябре – декабре 2021 года. В это время средняя длина светового дня закономерно уменьшалась: сентябрь – 14 ч. 45 мин.; октябрь – 10 ч. 26 мин.; ноябрь – 8 ч. 45 мин.; декабрь – 7 ч. 49 мин (рис. 14). Период роста и развития наземных частей растения в природе приходится на апрель – май. Поэтому благоприятный световой день для рябчика русского во время вегетации должен составлять 13-17 ч.



Рисунок 13. Зрелые плоды и семена рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr.

Рябчику русскому *Fritillaria ruthenica* Wikstr. свойственно несколько способов размножения – семенами, выводковыми почками и луковицами (рис. 13). В исследовании использовались семена. Они обеспечивают половое размножение и устойчивость популяции.

Для семян рябчика русского, как и для многих растений, характерен органический покой. Такие семена при наступлении благоприятных условий не прорастают или обладают пониженной всхожестью. Иногда такие семена требуют предпосевной подготовки. Но даже в этом случае первые проростки могут появиться через несколько лет.

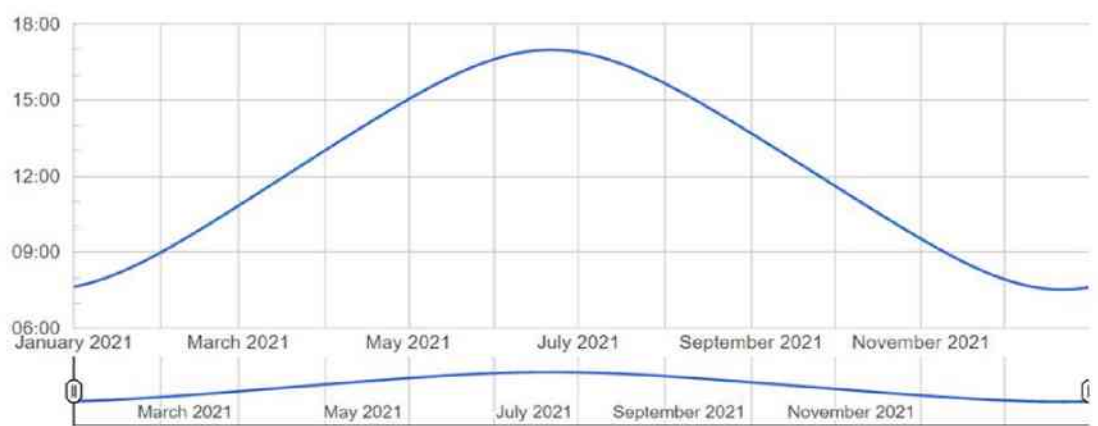


Рисунок 14. Продолжительность светового дня (ч) в Пензенской области за 2021 г

У семян рябчика зародыш развивается не до конца, к тому же он покрыт толстым слоем эндосперма, поэтому прорастание не может начаться сразу после замачивания. Относительная автономность зародыша у рябчика достигается в период дифференциации основных осевых органов.

При попытках прорастить семена при замачивании и комнатной температуре не было получено ни одного проростка за 3 месяца опытов. Таким образом, было принято решение найти оптимальные условия для проращивания семян данного растения.

Семена рябчика русского характеризуются сложным глубоким морфофизиологическим покоем (БВ-В³). Это значит, что покой семени вызван анатомической недоразвитостью (морфологическое свойство), а также особым состоянием зародыша (физиологическое свойство). Т.е. первые проростки появятся только после доразвития зародыша. У семян данного растения глубокий покой.



Автономность зародыша
 Покой
 Стадия относительной автономности
 Сформированный зародыш

Рисунок 15. Схема выхода семян рябчика русского *Fritillaria ruthenica*

Wikstr. из состояния покоя

На рисунке 15 представлена краткая схема, благодаря которой можно отметить, что семя достаточно длительное время находится в состоянии покоя. Автономность зародыша наступает поздно. Именно поэтому необходимо подобрать оптимальные условия для прорастания данного растения.

Чтобы решить проблему покоя семян, была проведена холодная стратификация. Мы выдерживали замоченные семена в холодильнике в течение 3-х месяцев при температуре +5-10°C. В таких условиях зародыш доразвивается и затем прорастает. Всхожесть семян составляет 78-80%. Процесс прорастания растянулся на 1 месяц. В результате опыта были получены проростки, которые можно использовать для выращивания растения как в искусственных, так и в естественных условиях.

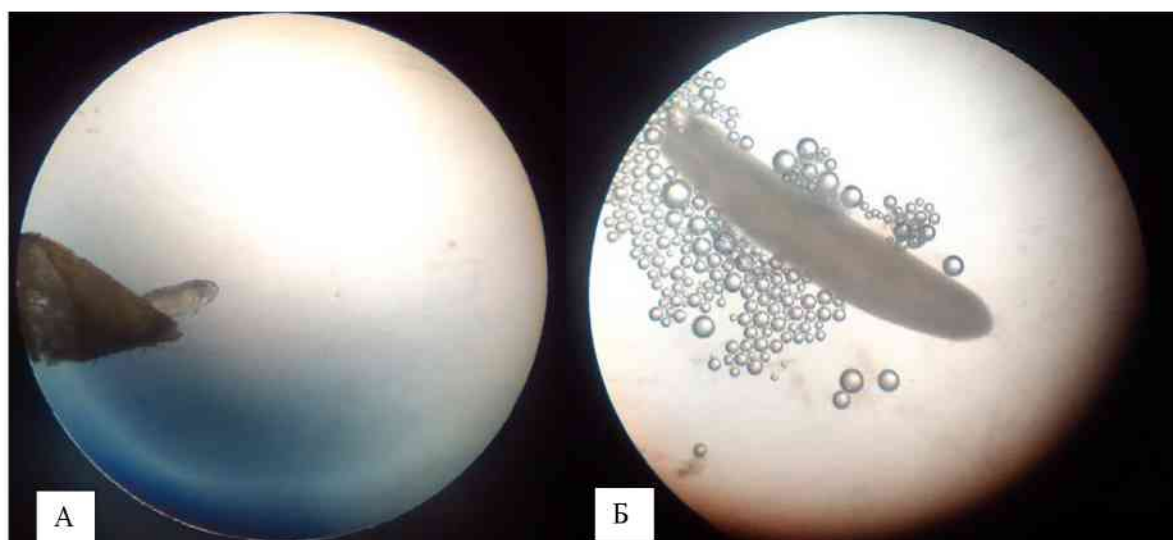


Рисунок 16. Зародыши рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr.

под микроскопом:

А – выделение зародыша из семени после предварительного замачивания в течение 1 месяца при температуре $+20-25^{\circ}\text{C}$ ($\times 40$); Б – зародыш ($\times 400$)

Таким образом, имитация зимних условий благоприятно влияет на прорастание на семена растения рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. На рисунке 17 под буквой Б мы видим проросток, который образовался в результате холодной стратификации. Здесь четко видны корешок и побег. Также на рисунке 17 можно увидеть развивающийся зародыш после 1 месяца выдерживания при низких температуре.

Т.к. в природе создавать такие условия для растения в природных условиях проблематично, то рябчик русский редко распространяется половым путем. Но растение может распространяться с помощью природного вегетативного способа – луковичками. Также его можно сажать искусственным путем – выводковыми почками.



Рисунок 17. Проросшие семена рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr.:

А – проросшее семя после холодной стратификации в течение 3 месяцев при температуре $+5-10^{\circ}\text{C}$; Б – проросток, выделенный из семени сразу после начала прорастания (четко видны дифференцированные зародышевый корешок и побег)

Как известно, на прорастание семян многих растений оказывает влияние освещенность. Было решено проверить, может ли свет повлиять на прорастание семян рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. Был заложен опыт по влиянию освещенности на прорастание семян исследуемого растения. В результате семена не проросли. Таким образом, освещенность не влияет на прорастание семян данного вида.

После прорастания семян проростки были помещены в питательную среду. Но перед этим они были стерилизованы с помощью растворов. На рисунке 18 представлены проросшие семена, прошедшие дезинфекцию.

Перед помещением семян в питательную среду, они стерилизовались в растворах по двум схемам:

- 1) раствор «Жавель-клейд» с концентрацией 1% с натриевой солью дихлоризоциануровой кислоты $\text{C}_3\text{O}_3\text{N}_3\text{CL}_2\text{NA}$ с концентрацией 80-82% (15 минут) → раствор пероксида водорода H_2O_2 с концентрацией 3% (3 минуты) → дистиллированная вода (3 раза);

- 2) перманганат калия KMnO_4 с концентрацией 0,5% (15 минут) → сульфат меди (II) CuSO_4 с концентрацией 1% (15 минут) → этиловый спирт $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ с концентрацией 70% (1 минута) → перекись водорода H_2O_2 с концентрацией 3% (1 минута) → дистиллированная вода (несколько раз).



Рисунок 18. Проросшие семена рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr.

Раньше считалось, что в большинстве случаев холодную стратификацию семян, находящихся в глубоком покое, нельзя заменить действием других факторов. Но в последние годы появляется все больше и больше данных, свидетельствующих о том, что значительно сократить длительность стратификации или расширить диапазон температур, при которых происходит нарушение покоя, можно с помощью гормональных обработок. В частности, обработка гормонами (кинетином и ГК₃) совместно с тиомочевинной в 2-5 раз сокращает время пребывания семян некоторых видов на холоде, а у других видов, кроме того, расширяет диапазон температур стратификации с 0-3 до 0-7°C и даже 0-10°C.

3.2 Техника культивирования рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. в условиях *in vitro*

Полученные проростки были помещены в питательную среду в условиях *in vitro* для последующего проращивания.

Предварительно были попытки поместить недоразвитые зародыши в питательную среду, но в результате семена не прорастали получены не были. Затем в питательную среду были помещены проростки, которые успешно росли и развивались.

Культивирование растений рябчика русского проводилось по следующей схеме:

Проращивание семян в течение 2-3 месяцев в чашках Петри при температуре +5-10°C → выделение проростков → стерилизация проростков → пересев проростков в культуру *in vitro*.

От состава питательной среды зависит то, в каких условиях будут расти и развиваться проростки. Мы использовали среду Мурасиге-Скуга, состав которой описан в таблице 3.

Применение маточных растворов уменьшает погрешность при взвешивании. Если использовать вещества с небольшими концентрациями, то повышается вероятность заражения бактериями и грибами питательной среды.

Таблица 3 – Приготовление маточных растворов для среды Мурасиге-Скуга

Маточный раствор макросолей (на 1 л)		Маточный раствор микросолей (на 100 мл)	
Компонент	Количество (г)	Компонент	Количество (мг)
Нитрат калия KNO_3	38	Водный молибдат натрия $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	25
Нитрат аммония NH_4NO_3	33	Водный сульфат меди $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,5
Дигидрофосфат калия KH_2PO_4	3,4	Борная кислота H_3BO_3	620
Безводный сульфат магния $MgSO_4$	3,6	Водный сульфат марганца $MnSO_4 \cdot 5H_2O$	2410

Таблица 3 – Продолжение

Маточный раствор макросолей (на 1 л)		Маточный раствор микросолей (на 100 мл)	
Безводный хлорид кальция CaCl_2	6,65	Водный сульфат цинка $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860
		Иодид калия KJ	83
		Водный хлорид кобальта $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5
		Сульфат железа (II) FeSO_4	557
		Na_2 ЭДТА	745

Помимо компонентов, указанных в таблице 3, в культуру *in vitro* вводились различные углеводы (сахароза, глюкоза, фруктоза, галактоза). Но следует учитывать то, что каждый вид растения требует разное содержание компонентов.

В нашем исследовании мы добавляли в культуру *in vitro* сахарозу 20 г/л и глюкозу 20 г/л. Для быстрого роста и развития проростков были использованы витамины группы В (В (тиамин B_1 , пиридоксин B_6 , B_{12}), РР, фолиевая кислота, мезоинозит. Помимо этого, для нормального формообразования добавлялись фитогормоны (ИУК – 2 мг/л, кинетина – 2 мг/л и ГАЗ – 2 мг/л).

Питательная среда была немного модифицирована и ее состав представлен в таблице 4. Данный состав был проверен на растениях других видов. Мы исходили из того, что растению для нормального развития необходимы определенные фитогормоны и витамины. Модифицированный состав среды подошел рябчику русскому *Fritillaria ruthenica* Wikstr. Были использованы витамины группы В (В (тиамин B_1 , пиридоксин B_6 , B_{12}), РР, фолиевая кислота, мезоинозит.

Тиамин (B_1) входит в состав пируватдекарбоксилазы, участвует в превращениях углеводов. Тиаминпирофосфат входит в состав ферментов окислительного декарбоксилирования кетокислот (пировиноградной и кетоглутаровой), является коферментом транскетолазы.

Пиридоксин (B_6) в виде фосфорнокислого эфира входит в состав ферментов декарбоксилирования и переаминирования аминокислот.

Никотиновая кислота (РР) в виде амида входит в состав дегидрогеназ НАД и НАДФ, катализирующих донорно-акцепторную цепь H^+ (отнятие H^+ от молекул органических веществ).

Использование маточных растворов снижает погрешности при взвешивании компонентов солей. Использовать менее концентрированные растворы солей также не целесообразно из-за повышенной вероятности их заражения микроорганизмами.

В качестве источника углеродного питания используют различные углеводы типа сахарозы, глюкозы, фруктозы, галактозы. Разные культуры требуют различной концентрации углеводов на разных этапах микроклонального размножения.

Для культивирования зародышей растений ириса в качестве источника углеродного питания мы использовали сахарозу – 20 г/л.

Таблица 4 – Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга для культивирования рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr.

Компоненты в культуре <i>in vitro</i>	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Хелатное железо	5 мл/л
Хлорид кальция	50 л/л
Тиамин-НСl	0,1 мг/л
Пиридоксин-НСl	1 мг/л
Витамин B ₁₂	0,015 мг/л
Витамин РР	2 мг/л
Фолиевая кислота	0,5 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
Гидролизат казеина	1 г/л
Пантотенат Са	10 мг/л
Рибофлавин	0,5 мг/л
Биотин	1 мг/л
Активированный уголь	10 г/л
ГК	2 мг/л
Кинетин	2 мг/л
Ауксин	2 мг/л
Сахароза	20г/л
Глюкоза	20г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5,7-5,8	

Чтобы питательная среда не была заражена бактериями и грибами, все манипуляции проводились в ламинар-боксе гигиенической безопасности (рис. 19). Все действия проводились с помощью стерильных инструментов.



Рисунок 19. Ламинар-бокс гигиенической безопасности (LAMSYSTEMS, класс II / тип A)

Дополнительно питательная среда стерилизовалась в автоклаве (рис. 20). Высокую температуру в этом случае использовать нельзя, т.к. в культуре есть фитогормоны, разрушающиеся при сильном нагревании. Уменьшение времени стерилизации до 30 минут приводило к тому, что часть пробирок с питательной средой оказывалась зараженной еще до посадки объекта.



Рисунок 20. Автоклав Tuttnauer 2540 ML, AUTOCLAVE – STEAM STERILIZER

Были проанализированы 20 проростков. На рост и развитие растения рябчика русского оказывают влияние следующие факторы:

- 1) состав питательной среды (минеральные соли, органические вещества, витамины),
- 2) наличие фитогормонов (ИУК (2 мг/л), кинетин (2 мг/л) и ГК₃ (2 мг/л)),
- 3) свет и комнатная температура.

Фитогормоны были добавлены в питательную среду. Ауксины обеспечивают клеточную дифференциацию растения, цитокинины необходимы для образования каллусных тканей, а гиббереллины провоцируют рост клеток тканей.

Проросшие семена были помещены в питательную среду (рис. 21, А). Растения проросли при комнатной температуре и при естественном освещении. В исследовании не использовался дополнительный источник света.

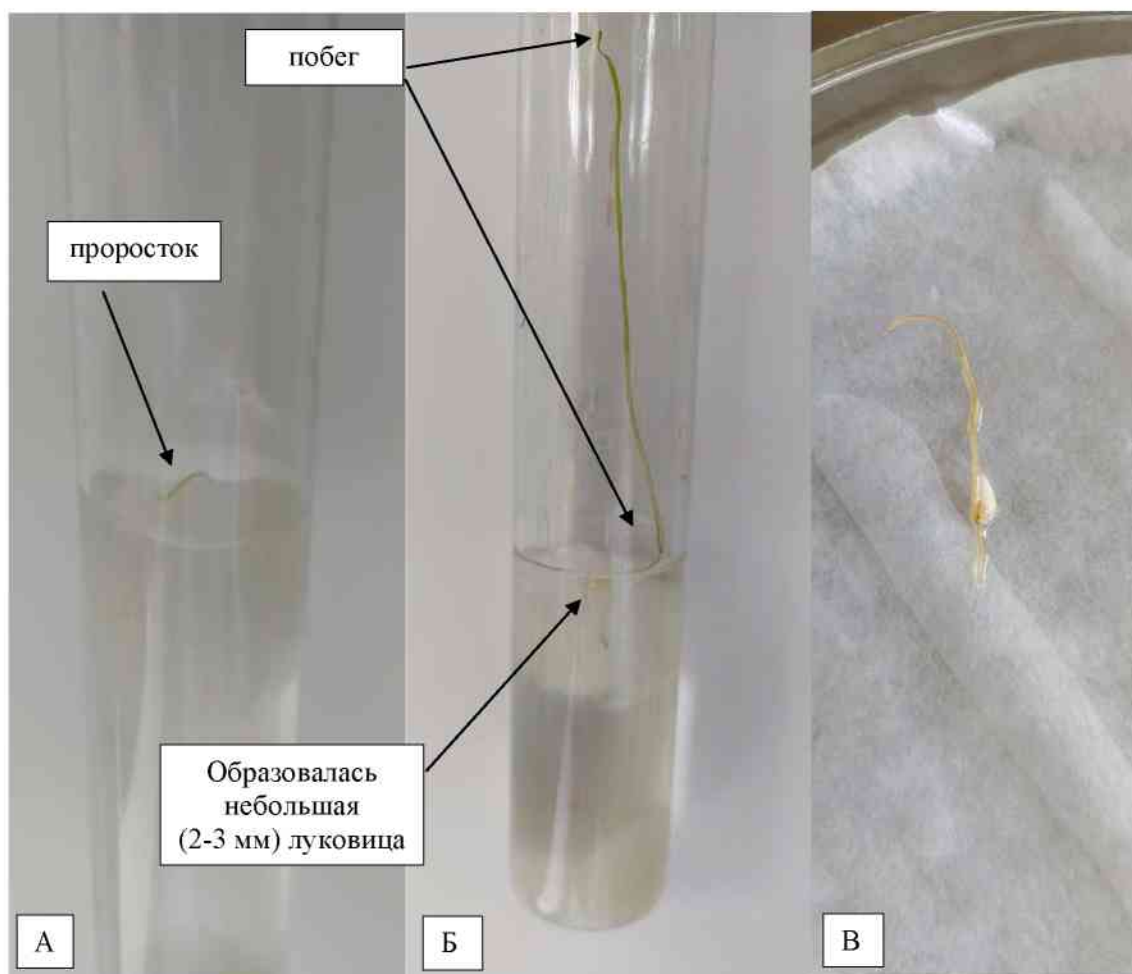


Рисунок 21. Растения рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr.npu
культивировании *in vitro*:

А – проросток после посадки; Б – растение в возрасте 1 месяца; В –
луковица

Спустя месяц после помещения проростка в культуру *in vitro* появилась первая небольшая луковица (рис. 21, В), после наземная часть засыхала и растение переходило в состояние покоя.

Луковицу было решено посадить в почву (рис. 23). Она прижилась и, таким образом, полученный материал можно помещать в естественные условия обитания. Также можно проращивать не только луковицы, но и проросшие семена. С помощью проведенного исследования можно восстановить численность многих популяций.



Рисунок 22. Сравнение взрослой луковицы рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. и полученной в результате исследования

В условиях *in vitro* рябчик русский чувствовал себя комфортно. Питательные вещества, гормоны и витамины создали условия, при которых растение заметно росло. В условиях искусственного размножения в питательной среде создается здоровый посадочный материал, который часто приживается в грунте.

Было принято решение часть растений культивировать с использованием подсветки (рис. 23). В качестве подсветки были использованы светодиодные лампы с возможностью регулирования спектрального состава света. Был оставлен красный (длина волны 660 нм) и синие спектры (длина волны 460 нм). Данные спектры оптимальны для роста и развития растений. Интенсивность света составляла 3500-4000 люкс.

Данный опыт был заложен в теплице Пензенского государственного университета на кафедре «Общая биология и биохимия».

В результате исследования было установлено, что интенсивность освещения недостаточна. Оптимальная интенсивность искусственного освещения должна составлять 10000-15000 люкс. Данные опыты планируется повторить летом при оптимальном для растений световом дне.

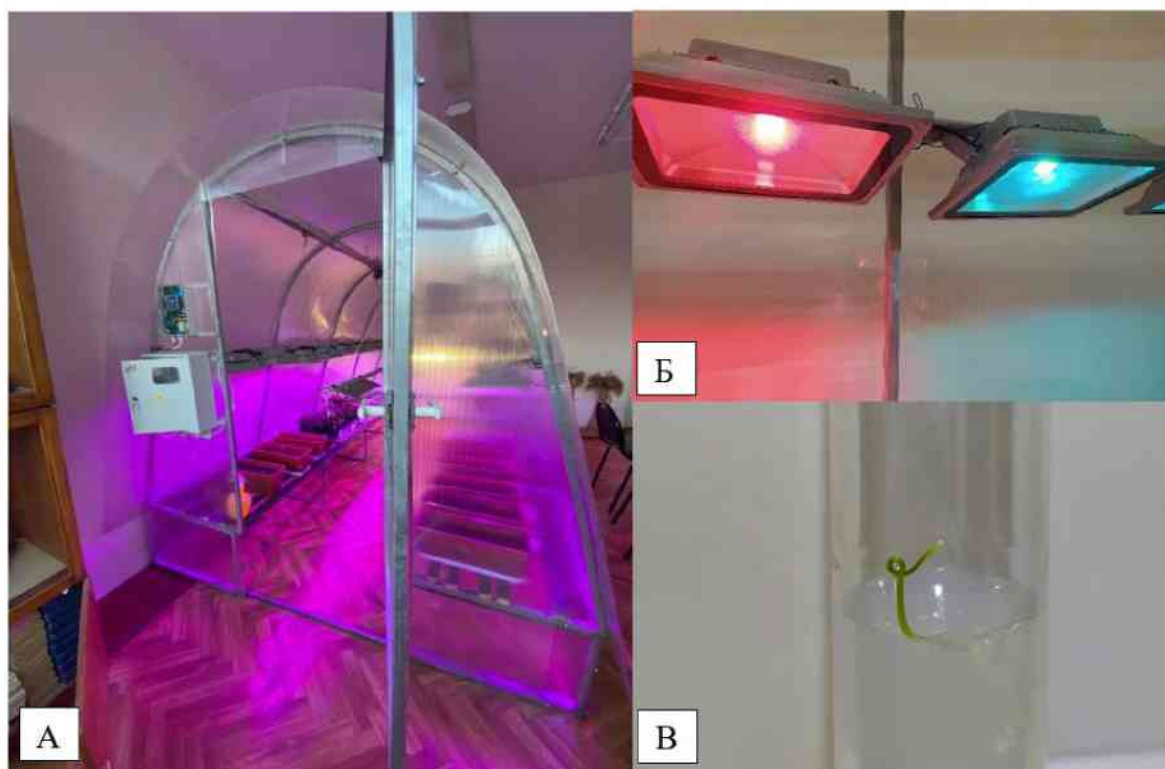


Рисунок 23. Теплица для выращивания растений. Пензенский государственный университет, кафедра «Общая биология и биохимия».

А – внешний вид теплицы; Б – светодиодные лампы для подсветки (красные и синие лучи солнечного спектра); В – растения in vitro в возрасте 3 дней (выращенные с использованием подсветки)

Пока не были поставлены опыты по выращиванию в естественных местообитаниях. Но часть проростков была посажена в обычные пластиковые стаканчики и выращивалась как комнатные растения на подоконнике. До-

полнительный источник света не использовался. Проростки прижились в грунте.



Рисунок 24. Растения рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. при выращивании в грунте из проростков:

А – проростки после высадки в почвенный грунт; Б – растения в возрасте 1 неделя (слева без подсветки, справа – с использованием подсветки)

Сохранение биоразнообразия – это одна из важнейших задач человечества. Это актуально для растений, которые находятся в Красных книгах. Некоторые виды с трудом размножаются в естественных условиях, поэтому они нуждаются в сохранении в генетических банках. Защитить генофонд можно с помощью использования техники *in vitro*.

У системы *in vitro* есть множество преимуществ, по сравнению с традиционными методами сохранения биоразнообразия:

- 1) экономия площадей;
- 2) независимость от абиотических факторов;
- 3) возможность использования минимального количества эксплантов для получения стерильных проростков [15].

Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. нуждается в разработке технологий увеличения численности. Технология *in vitro* позволяет за небольшой промежуток времени получить большое количество особей. Полученные растения отличаются генетической однородностью и отсутствием вирусов. С

помощью этой технологии можно ускорить переход растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития [34].

Таким образом, наше исследование может восстановить численность популяций рябчика русского. Этот вид входит в список редких растений, поэтому наше исследование может вывести растение из Красных книг Российской Федерации.

В результате нашего исследования была создана стратегия введения в культуру *in vitro* рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. Мы изучили особенности прорастания семян данного растения, а также начальные этапы онтогенеза в питательной среде. В ходе исследования были определены особенности культивирования данного вида. Для проверки устойчивости полученных проростков семена были посажены в грунт. Растения прижились в почве, поэтому даны общие рекомендации по выращиванию исследуемого редкого растения.

Питательная среда культуры *in vitro* позволяет получить здоровый материал с последующим выращиванием в природных условиях. Также с помощью этой культуры можно сохранить генетическое разнообразие. В наше время особенно важно сохранять биоразнообразие.

Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. входит в Красную книгу Пензенской области, а также в Красную книгу Российской Федерации. Результаты нашего исследования могут помочь вывести многие растения из списков редких видов. Можно в лабораториях проращивать семена в условиях холодной стратификации, а затем помещать их в естественную среду обитания.

Выращивание семян в культуре *in vitro* имеет много плюсов. Это связано с тем, что в питательной среде можно получить здоровый посадочный материал. Растения изученных видов из условий культуры *in vitro* хорошо переносят пересадку в почвенный грунт, легко приживаются и могут в последствии быть использованы для высаживания в естественные условия произрастания.

В наше время в мире множество глобальных проблем, одна из которых – это сохранение биоразнообразия. Современные проблемы требуют решения с помощью новейших технологий. За последние несколько сотен лет навсегда исчезла почти тысяча видов растений, поэтому сейчас особенно важно разрабатывать методы сохранения растений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе исследования мы изучали растения рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr., которое включено в Красную книгу Пензенской области. Семена для лабораторных опытов были взяты в Пензенском ботаническом саду им. И. И. Спрыгина.

Объектом исследования стало растение из отдела Цветковые (Магнолиофиты, Покрытосеменные) – отдела *Magnoliophyta*. Класа Лилиопсиды (Лилиевые, Однодольные) – класса *Liliopsida*. Порядка Лилейные – порядка *Liliales*. Семейства Лилейные – семейства *Liliaceae*. Рода Рябчик – рода *Fritillaria*. Вида Рябчик русский – вида *Fritillaria Ruthenica* Wikstr.

В ходе исследования была достигнута поставленная цель и решены все задачи. Были подробно изучены особенности выращивания семян растения рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr., а также культивирования данного вида в условиях *in vitro*.

В результате проведенных опытов были установлено, что семена рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. не могут прорасти без холодной стратификации. Это связано с тем, что семенам данного вида свойственен сложный глубокий морфофизиологический покой. Зародыш семени рябчика русского окружен толстым эндоспермом, который задерживает поступление воды к зародышу. Скорее всего, именно с этим связано то, что рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. – это редкое растение на территории Пензенской области. Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. впервые может зацвести через несколько лет после посева семян. Но также данное растение может размножаться не только с помощью генеративных, но и вегетативных способов, например, луковицами.

В результате лабораторных исследований нам удалось подобрать оптимальные условия для выращивания рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. Мы выяснили, что для прорастания семян необходимо выдерживать их в замоченном состоянии в течение 2-3 месяцев при температуре +5-10°C.

Если семена в замоченном виде проращивать при комнатной температуре, то проростки не формируются. Это было установлено при попытке проращивания семян в обычных условиях на протяжении нескольких месяцев.

Полученные проросшие семена были помещены в культуру *in vitro*. Нами была разработана схема, по которой были проведены исследования:

Проращивание семян в течение 2-3 месяцев в чашках Петри при низких положительных температурах (+5-10°C) → выделение проростков стерилизация проростков в дезинфицирующих растворах → пересев проростков в культуру *in vitro*.

Чтобы в питательной среде не образовались бактерии и грибки, мы простерилизовали полученные проростки:

1) раствор «Жавель-клейд» с концентрацией 1% с натриевой солью дихлоризоциануровой кислоты $C_3O_3N_3Cl_2Na$ с концентрацией 80-82% (15 минут) → раствор пероксида водорода H_2O_2 с концентрацией 3% (3 минуты) → дистиллированная вода (3 раза);

2) перманганат калия $KMnO_4$ с концентрацией 0,5% (15 минут) → сульфат меди (II) $CuSO_4$ с концентрацией 1% (15 минут) → этиловый спирт C_2H_5OH с концентрацией 70% (1 минута) → перекись водорода H_2O_2 с концентрацией 3% (1 минута) → дистиллированная вода (несколько раз).

В результате лабораторных исследований было установлено, что на рост и развитие рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr. в культуре *in vitro* влияют:

- наличие фитогормонов,
- структура питательной среды,
- доступ к свету,
- комнатная температура.

В работе мы использовали среду Мурасиге-Скуга с добавлением фитогормонов (ИУК – 2 мг/л, кинетина – 2 мг/л и ГАЗ – 2 мг/л). Но чтобы в питательной среде не развивались грибы и бактерии, пробирки со средой стерилизовались в автоклаве. Все работы с культурой *in vitro* проводились в про-

дезинфицированном ламинар-боксе с помощью стерильных инструментов. Пробирки не извлекались из бокса до окончания посадки. Дополнительно пробирки закрывались стерильными пробками из ваты и марли.

В результате даже была получена небольшая луковица. Интенсивность освещения должна составлять 8000-15000 люкс; длина светового дня – 13-17 ч.; температура +20-25°C. Дополнительные источники света и тепла использованы не были. Это необходимо для того, чтобы максимально приблизить лабораторные условия к природным.

После выращивания растения в культуре *in vitro* было решено пересадить полученный материал в почвенный грунт. Растения прижились, поэтому их можно пробовать выращивать в естественных условиях в местах обитания рябчика русского *Fritillaria ruthenica* Wikstr.

Таким образом, разработана схема введения в культуру *in vitro* растений рябчик русский. Установлены особенности прорастания семян. Изучены начальные этапы онтогенеза в культуре *in vitro*. Определены видовые особенности культивирования. Также было проверено, сможет ли растение расти в грунте. Даны общие рекомендации по выращиванию исследуемого редкого растения.

Технология *in vitro* позволяет сохранить генетическое разнообразие, получить здоровый посадочный материал и распространить редкий вид растения. В наше время особенно важно сохранять биоразнообразие.

Рябчик русский *Fritillaria ruthenica* Wikstr. входит в Красную книгу Пензенской области, а также в Красную книгу Российской Федерации. Таким образом, наше исследование может помочь многим популяциям восстановить свою численность. Можно в лабораториях проращивать семена в условиях холодной стратификации, а затем помещать их в естественную среду обитания.

Культура *in vitro* имеет множество преимуществ. С ее помощью можно получить здоровый посадочный материал, сохранить генетические ресурсы культурных и дикорастущих видов растений. Растения изученных видов из

условий культуры *in vitro* хорошо переносят пересадку в почвенный грунт, легко приживаются и могут в последствии быть использованы для высаживания в естественные условия произрастания.

Сохранение биоразнообразие – это глобальная проблема человечества, которая требует современного решения с помощью новейших технологий. К тому же за последние несколько сотен лет навсегда исчезла почти тысяча видов растений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авксентьева О.А., Петренко В.А. Биотехнология высших растений: культура *in vitro*: учебно-методическое пособие. Харьков: Изд-во ХНУ имени В.Н. Каразина, 2011.
2. Биология. Современная иллюстрированная энциклопедия. М.: Росмэн, 2006.
3. Веселов Д.С., Веселов С.Ю., Высоцкая Л.Б., Кудоярова Г.Р., Фархутдинов Р.Г. Гормоны растений: регуляция концентрации, связь с ростом и водным обменом. М.: Наука, 2007.
4. Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу: учебное пособие для студентов вузов. М.: Академия, 2003.
5. Гамбург К.З. Биохимия ауксина и его действие на клетки растений. Новосибирск: Наука, 1976.
6. Гамбург К.З. Фитогормоны и клетки. М.: Наука, 1970.
7. Гамбург К.З., Кулаева О.Н., Муромцев Г.С., Прусакова Л.Д., Чкаников Д.И. Регуляторы роста растений / под. ред. Г.С. Муромцева. М.: Колос, 1979.
8. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. Том 2. Москва, 1986.
9. Иванов Е.С., Чердакова А.С., Марков В.А., Лупанов Е.А. Охрана природы: учебник и практикум для среднего профессионального образования. М.: Изд-во Юрайт, 2023.
10. Казакова М.В., Мучник Е.Э. Красная книга инструмент сохранения природной флоры. Рязань: Вестник РГУ им. С.А. Есенина, 2012.
11. Кефели В.И. Рост растений. М.: Колос, 1973.
12. Красная книга Российской Федерации (Растения и грибы). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008.
13. Красная книга Пензенской области. Том 1. Грибы, лишайники, мхи, сосудистые растения. Издание второе. Пенза, 2013.

14. Кузнецов Вл.В. Физиология растений: учебник для вузов. М.: Высшая школа, 2005.
15. Мамаева Н.А., Коротков О.М., Молканова О.И. Возможность сохранения коллекции редких и ценных растений в генетических банках *in vitro*. Красноярск: Вестник Красноярского государственного аграрного университета, 2008.
16. Муромцев Г.С. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. М.: Агропромиздат, 1987.
17. Овчаров К.Е. Физиология формирования и прорастания семян. М.: Колос, 1976.
18. Орлова С.Ю. Биологические особенности и селекционная ценность сортов вишни в условиях северо-запада России: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб, 2002.
19. Полевой В.В. Физиология и биохимия действия ауксина и гиббереллина. Ленинград: Изд-во ЛГУ, 1970.
20. Полевой В.В. Физиология растений. М.: Высшая школа, 1989.
21. Полевой В.В., Чиркова Т.В., Лутова Л.А. и др. Практикум по росту и устойчивости растений: учебное пособие. СПб, 2001.
22. Попцов А.В. Биология твердосемянности. М.: Наука, 1976.
23. Рогожин В.В. Биохимия растений. Учебник. СПб: ГИОРД, 2012.
24. Салтыков А.Н., Разумный В.В., Роговой В.И., Астафьева В.Е. Лесная типология: таксоны, критерии определения, применение: учебно-методическое пособие для проведения практических занятий и самостоятельной работы. Симферополь: ИТ «АРИАЛ», 2019.
25. Титов А.Ф., Таланова В.В. Устойчивость растений и фитогормоны. Петрозаводск: Изд-во Карельского научного центра РАН, 2009.
26. Трепет С.А., Акатов В.В. Редкие виды и их сохранение: учебно-методическое пособие. Майкоп: ИП Войнов Д.В, 2010.
27. Тимофеева С.Н., Смолькина Ю.В., Апанасова Н.В., Юдакова О.И. Технологии микроразмножения *in vitro*: учебно-методическое пособие. Сара-

тов, 2016.

28. Турецкая Р.Х. Физиология корнеобразования у черенков и стимуляторы роста. М.: Изд-во АН СССР, 1961.

29. Холодный Н.Г. Фитогормоны: (Очерки по физиологии гормональных явлений в растительном организме). Киев: Изд-во АН СССР, 1939.

30. Хрянин В.Н. Содержание эндогенных регуляторов в листьях конопля. Пенза: Биол. науки, 1975.

31. Хрянин В.Н. Влияние гиббереллина на дифференциацию стеблевых апексов конопля. Докл. АН СССР, 1977.

32. Чайлахян М.Х. Инструкция по применению гиббереллинов на виноградной лозе. М.: Колос, 1967.

33. Чайлахян М.Х., Хрянин В.Н. Пол растений и его гормональная регуляция. М.: Наука, 1982.

34. Широков А.И., Крюков Л.А. Основы биотехнологии растений: Электронное учебно-методическое пособие. Н. Новгород: Изд-во Нижегородского госуниверситета, 2012.

35. Якушкина Н.И. Физиология растений: учебное пособие. М.: Гуманитар. Изд. центр ВЛАДОС, 2004.

36. Ботанический сад. [Электронный ресурс]. URL: <https://botsad.pnzgu.ru> (дата обращения: 26.09.2022).

37. ГОСТ 24933.2-81. «Семена цветочных культур. Методы определения всхожести и энергии прорастания». [Электронный ресурс]. URL: <http://vsegost.com/Catalog/13/13865.shtml> (дата обращения: 26.09.2022).

38. Плантариум. Определитель растений on-line. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.plantarium.ru/page/view/item/16609.html> (дата обращения: 26.09.2022).

39. Niino Takao, Tashiro Kazuo, Suzuki Mitsuteru, Ohuchi Susumu, Magoshi Jun, Akihamo Tomoya (Jap). Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. Scientia Horticulturae, 1997.

40. Phatak, S., Wittwer S. H., Honma S., Bukovac M. J. (Eng). Gibberellin-induced and pollen development in a stamenless tomato mutant. *Nature (London)*, 1966.