

## Приложение

К статье Мурасевой Д.С., Звягиной Н.С., Новиковой Т.И., Дорогиной О.В. «Сохранение эндемика Западного Саяна *Fritillaria sonnikovae* Schaulo et A. Erst (Liliaceae) в коллекции *in vitro*»

### Дополнительные материалы

#### Протокол приготовления питательных сред

1. В мерный стакан налить половину нужного объема дистиллированной воды, добавить навески сахарозы, мезоинозита, макро- и микроэлементов, витаминов (табл.) и регуляторов роста.
2. Добавить дистиллированной воды до нужного объема и определить pH среды (оптимальной является pH = 5.7–5.8, если pH превышает эти значения, добавить 0.1 н раствор HCl, если ниже – 0.1 н раствор NaOH).
3. Добавить навеску агара.
4. Среду разлить по колбам и автоклавировать при давлении 1 атм и температуре 120 °C в течение 20 мин.
5. Проавтоклавированные среды в ламинар-боксе разлить по стерильным культуральным сосудам.

Состав питательных сред, используемых для культивирования микрорастений *F. sonnikovae*

Компоненты среды	Концентрация, мг/л	
	BDS	B <sub>5</sub>
Макроэлементы		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	320.0	–
KNO <sub>3</sub>	2530.0	2500.0
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	230.0	–
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134.0	134.0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	172.0	169.6
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	247.0	250.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	330.6
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O		440.0
Микроэлементы		
KJ	0.75	0.75
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3.0	3.0
MnSO <sub>4</sub> × 4H <sub>2</sub> O	13.2	10.0
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O	2.0	2.0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O	0.25	0.25
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O	0.039	0.025
CoCl <sub>2</sub> × 6H <sub>2</sub> O	0.025	0.025
FeSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O		27.8
Na <sub>2</sub> ЭДТА × 2H <sub>2</sub> O		37.3
Органические вещества		
Мезоинозит		100.0
Тиамин		0.1
Пиридоксин		0.5
Никотиновая кислота		0.5
Сахароза		30 000.0
Агар		6 000.0

Примечание. При использовании половинного состава питательных сред необходимо уменьшить в два раза содержание макро- и микроэлементов, оставив неизменными концентрации других компонентов.

## Протокол размножения и депонирования *in vitro* микрорастений *F. sonnikovae*

Этап	Содержание работ
I. Стерилизация	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Интактные луковицы выдержать при пониженной температуре (<math>+5 \pm 2</math> °C) 3–4 нед.</li><li>2. Промыть интактную луковицу под проточной водой в течение 60 мин. Затем луковицу разделить на чешуи.</li><li>3. Стерилизовать луковичные чешуи погружением в 70 % этанол на 30 с, затем в 0.1 % раствор <math>\text{HgCl}_2</math> с добавлением 1–2 капель Tween 80 на 30 мин и трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой.</li><li>4. Стерильные чешуи в асептических условиях разделить скальпелем на сегменты размером <math>5 \times 5</math> мм и использовать в качестве первичных эксплантов. В культуральные сосуды экспланты помещать раневой поверхностью на среду по 4–5 шт.</li></ol>
II. Инициация культуры <i>in vitro</i>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Для индукции регенерации в тканях первичных эксплантов использовать питательную среду BDS, содержащую 5.0 мкМ БАП и 2.0 мкМ НУК. Длительность первого пассажа 50–60 сут.</li><li>2. Образованные адвентивные микролуковички отделить от экспланта и перенести на среды для размножения.</li></ol>
III. Собственно размножение	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Мультипликацию проводить на питательной среде BDS, дополненной 5.0 мкМ БАП и 2.0 мкМ НУК. Длительность пассажа 35–40 сут.</li><li>2. По завершению пассажа отделить вновь образованные адвентивные микролуковички и пересадить на свежие питательные среды для размножения. Культивировать микролуковички (этапы II и III) при интенсивности освещения 3.–4.0 клк, при фотопериоде – 16 ч свет, 8 ч темнота, температуре <math>+23 \pm 2</math> °C.</li></ol>
IV. Депонирование (в условиях замедленного роста)	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Использовать микрорастения с луковицами размером не менее 4–5 мм, имеющие 1–2 листа. В культуральные сосуды помещать по 5–7 микрорастений.</li><li>2. Депонирование проводить в следующих условиях: температура <math>+7</math> °C, фотопериод — 16 ч свет, 8 ч темнота, интенсивность освещения 1.5–3.0 клк, среды 1/2 BDS или 1/2 B<sub>5</sub>, содержащие 0.5 г/л измельченного активированного угля. Длительность депонирования 9–12 мес.</li></ol>