

## Особенности размножения *in vitro* *Silene cretacea* и *Silene hellmannii*

### Features of reproduction *in vitro* of *Silene cretacea* and *Silene hellmannii*

Малаева Е. В.<sup>1,2</sup>, Фетисова А. И.<sup>1</sup>

Malaeva E. V.<sup>1,2</sup>, Fetisova A. I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Волгоградский региональный ботанический сад, г. Волгоград, Россия. E-mail: e.malaeva@mail.ru

<sup>1</sup> Volgograd Regional Botanical Garden, Volgograd, Russia

<sup>2</sup> Волгоградский государственный социально-педагогический университет, г. Волгоград, Россия

<sup>2</sup> Volgograd State Social and Pedagogical University, Volgograd, Russia

**Реферат.** В статье представлена информация по совершенствованию технологии клонального микроразмножения и особенностях размножения *in vitro* *Silene cretacea* и *S. hellmannii*. В результате исследований проведена оптимизация условий культивирования *S. cretacea* и *S. hellmannii* на разных этапах клонального микроразмножения. Подобран оптимальный режим стерилизации семян *S. cretacea* и *S. hellmannii* – 5%-й раствор «Лизоформина 3000» при экспозиции 7 минут. Максимальную всхожесть семян *S. hellmannii* 75 % наблюдали на 11 день эксперимента, а для *S. cretacea* 50 % – на 14 день. При этом процент всхожести у *S. hellmannii* выше, чем у *S. cretacea* на 30 %. Наибольший коэффициент размножения для *S. cretacea* и *S. hellmannii* наблюдали при использовании Цитодеф в концентрации 0,5 мг/л. Он составил  $23,2 \pm 0,7$  и  $26,2 \pm 0,4$  соответственно. В результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия для длительного сохранения растений-регенерантов. Растения *in vitro* хранятся в климатической камере SANYO MRL-351H на питательной среде  $\frac{1}{2}$  MS дополненной 6-БАП 0,4 мг/л, сахарозой (20 мг/л), t (3–7 °C) и освещенность (500–1200 лк).

**Ключевые слова.** Клональное микроразмножение, питательная среда, смолевка меловая, смолевка Гельмана, эксплант, *in vitro*.

**Summary.** This article provides information about improving of the clonal micropropagation technology and *in vitro* reproduction peculiarities of *Silene cretacea* and *S. hellmannii*. As a result of the research, optimization of cultivation conditions at different stages of clonal micropropagation of *S. cretacea* and *S. hellmannii* cultures was carried out. The optimal mode of sterilization seeds of species *S. cretacea* and *S. hellmannii* has been selected – a 5 % solution of Lysoformin® 3000 at an exposure of 7 minutes. The maximum germination of *S. hellmannii* seeds was 75 % observed on day 11 of the experiment, and for *S. cretacea* 50 % on day 14. At the same time, the germination percentage of *S. hellmannii* is 30 % higher than that of *S. cretacea*. The highest reproduction coefficient for *S. cretacea* and *S. hellmannii* was observed when using Cytodef at a concentration of 0.5 mg/l. It was  $23.2 \pm 0.7$  and  $26.2 \pm 0.4$ , respectively. As a result of the conducted research, optimal conditions for the long-term preservation of regenerating plants have been selected. Plants are stored *in vitro* in a climatic chamber SANYO MRL-351H on a nutrient medium of  $\frac{1}{2}$  MS supplemented with 6-BAP 0.4 mg/l, sucrose (20 mg/L), t (3–7 °C) and illumination (500–1200 lk).

**Key words.** Clonal micropropagation, *in vitro*, explants, *Silene cretacea*, *Silene hellmannii*, medium nutrient.

Смолевка меловая (*Silene cretacea* Fisch. ex Spreng.) и смолевка Гельмана (*Silene hellmannii* Claus) являются узкоареальными эндемиками, которые занесены в Красную книгу РФ (категория 3) (2008), Красную книгу Волгоградской области (2017) и Красные книги сопредельных регионов, таких как Ростовская, Воронежская, Саратовская и Астраханская области.

В связи с крайней редкостью видов и специфичностью местообитаний актуальным является изучение особенностей размножения видов в условиях *ex situ*, в том числе с использованием технологии *in vitro*.

Работы ряда авторов посвящены изучению особенностей культивирования *in vitro* *Silene cretacea* и *Silene hellmannii*. Так, в работах О. И. Короткова и И. В. Князевой был выявлен оптимальный режим стерилизации для семян *S. hellmannii* и *S. cretacea* (Коротков, Князева, 2021); установлено влияние режимов стерилизации и фитогормонов на сроки прорастания и развитие проростков смолевки меловой (Малаева, Куприянова, 2014; Малаева, 2019); выявлено влияние ризобактерии *A. brasilense* Sp245 на

адаптацию регенерантов *S. cretacea* (Крицкая и др., 2017); разработаны базовые питательные среды для культивирования *S. cretacea* (Крицкая, Кашин, 2013).

В качестве материала для введения в культуру были использованы свежесобранные семена *S. cretacea* и *S. hellmannii* 2021 г., собранные из природных популяций Камышинского и Ольховского районов Волгоградской области.

Методика биотехнологических исследований основывалась на общепринятых классических приемах работы с культурой изолированных органов и тканей (Бутенко, 1999).

Поверхностная стерилизация осуществлялась по следующей схеме: семена предварительно обрабатывали 95%-м этиловым спиртом в течение 50–60 с, затем помещались в 5 и 7 % раствор Лизоформа 3000, при этом время экспозиции составляло 5 и 7 мин. Оптимальный режим стерилизации определяли по жизнеспособности первичных эксплантов и наличию инфекции.

Растения культивировали в чашках Петри и биологических пробирках при  $t = 24 \pm 2$  °С, освещенностью 3–5 клк при 16 часовом фотопериоде. Все опыты проводились в трехкратной повторности, количество вариантов в каждой повторности составляло 10 пробирок и чашек Петри. Результаты экспериментальных данных обрабатывались статистически с помощью компьютерной программы Excel лицензионного пакета Microsoft Office 2007. Полученные данные достоверны при  $p < 0,05$ .

На этапе микроразмножения для *Silene cretacea* и *Silene hellmannii* использовали следующие варианты сред: 1. питательная среда Мурасиге – Скуга (МС), дополненная 6-БАП в концентрации 0,1–1,0 мг/л; кинетином (К) 1,0–5,0 мг/л; цитодефом (ЦФ) 0,1–1,0 мг/л; 2. 1. питательная среда Мурасиге – Скуга (МС), дополненная 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л + 2Fe; 3. питательная среда Мурасиге – Скуга (МС), дополненная 6-БАП в концентрации 1,0 мг/л +  $\beta$ -индолилуксусная кислота (ИУК) в концентрации 0,01 мг/л; 4. питательная среда Мурасиге – Скуга (МС), дополненная цитодефом (ЦФ) в концентрации 0,5 мг/л +  $\beta$ -индолилуксусная кислота (ИУК) в концентрации 0,01 мг/л.

При этом отмечали следующие показатели: коэффициент размножения, побегов/эксплант и количество аномальных (витрифицированных) растений, %.

Оптимальным режимом стерилизации семян исследованных видов является 5%-й раствор Лизоформа 3000, при этом время экспозиции составляет 7 мин. Использование описанного режима стерилизации позволило получить максимальный процент проросших семян *S. hellmannii* и *S. cretacea* 75 и 50 % соответственно. Следует отметить, что время экспозиции значительно влияет не только на показатели всхожести и жизнеспособности семян, но и на скорость прорастания. Так, при 5 мин основная часть семян проросла на 5–7 сутки, в то время как при 7 мин – на 8–14 сутки. Кроме того, максимальную всхожесть семян *S. hellmannii* 75 % наблюдали на 11 день эксперимента, а для *S. cretacea* 50 % – на 14 день. При этом процент всхожести у *S. hellmannii* выше, чем у *S. cretacea* на 30 %.

Проростки из чашек Петри пересаживались в пробирки на экспериментальные среды, содержащие фитогормоны в различных концентрациях и комбинациях.

При организации исследований учитывали эколого-биологические особенности видов, особенности жизненной формы. Все эти факторы оказывали существенное влияние на интенсивность пролиферации изученных видов, что согласуется с результатами полученными другими исследователями (Малаева и др., 2008; Молканова, 2017; Молканова и др., 2020).

Из всех исследуемых цитокининов наибольший коэффициент размножения для *S. cretacea* и *S. hellmannii* наблюдали при использовании Цитодеф в концентрации 0,5 мг/л. Он составил  $23,2 \pm 0,7$  и  $26,2 \pm 0,4$  соответственно (табл. 1).

Растения были нормальной морфологии, признаки витрификации побегов отсутствовали.

При использовании в качестве цитокинина 6-БАП отмечали изменения в морфологии побегов: междоузлия побегов сокращались, уменьшались размеры листьев, изменилась их форма. При концентрации 6-БАП 1,0 мг/л наблюдалась витрификация побегов, которая составила 90 % для *S. hellmannii* и 80 % для *S. cretacea*.

При меньших концентрациях 6-БАП коэффициент размножения значительно снижался, но растения были нормальной морфологии. Таким образом, оптимальной концентрацией 6-БАП на этапе микроразмножения является 0,4 мг/л. Использование данной концентрации позволяет получить достаточно высокий коэффициент размножения  $8,3 \pm 0,9$  и  $9,2 \pm 0,5$  для *S. cretacea* и *S. hellmannii* и микро-растения нормальной морфологии.

Таблица 1

Влияние типа и концентрации цитокинина на коэффициент размножения и развитие микрочеренков *Silene cretacea* и *S. hellmannii*

Цитокинин	Концентрация, мг/л	Коэффициент размножения, побегов/эксплант	Аномальных (витрифицированных) растений, %	Коэффициент размножения, побегов/эксплант	Аномальных (витрифицированных) растений, %
		<i>S. cretacea</i>		<i>S. hellmannii</i>	
Контроль б/г	-	1,1 ± 0,5	0	1,3 ± 0,2	0
6-БАП	0,1	5,1 ± 0,5	0	6,2 ± 0,4	0
	0,2	6,5 ± 0,7	0	6,9 ± 0,2	0
	0,4	8,3 ± 0,9	0	9,2 ± 0,5	20
	0,5	13,5 ± 1,7	50	14,3 ± 0,7	60
	1,0	10,7 ± 1,3	80	12,6 ± 0,8	90
Кинетин	1,0	2,2 ± 0,3	0	3,4 ± 0,4	0
	2,0	2,5 ± 0,3	0	4,0 ± 0,2	0
	5,0	3,2 ± 0,4	0	3,9 ± 0,9	0
Цитодеф	0,1	6,2 ± 0,2	0	7,3 ± 0,5	0
	0,2	8,4 ± 0,2	0	9,1 ± 0,4	0
	0,4	17,3 ± 0,2	0	21,7 ± 0,6	0
	0,5	<b>23,2 ± 0,7</b>	<b>0</b>	<b>26,2 ± 0,4</b>	0
	1,0	18,6 ± 0,2	10	21,3 ± 0,2	0

При использовании кинетина в концентрации от 1,0 до 5,0 мг/л коэффициент размножения не превысил 3,2 ± 0,4 и 4,0 ± 0,2 для *S. cretacea* и *S. hellmannii* соответственно. В то же время во всех вариантах концентраций фитогормона витрификации не наблюдали, побеги были нормальной морфологии.

Наш опыт культивирования редких видов растений показал наличие положительного эффекта при совместном использовании цитокининов и ауксинов (Малаева, 2020).

Для *S. cretacea* и *S. hellmannii* использовали среды питательные среды, содержащие 6-БАП 0,1 мг/л и ЦФ 0,5 мг/л в сочетании с ИУК в концентрации 0,01 мг/л и экспериментальную среду 6-БАП 0,5 мг/л в сочетании с 2Fe (табл. 2).

Таблица 2

Регенерационная способность *Silene cretacea* и *S. hellmannii*

Вариант питательной среды	Коэффициент размножения, побегов/эксплант	Аномальных (витрифицированных) растений, %	Коэффициент размножения, побегов/эксплант	Аномальных (витрифицированных) растений, %
	<i>S. cretacea</i>		<i>S. hellmannii</i>	
Контроль б/г	1,1 ± 0,5	0	1,3 ± 0,2	0
МС 6-БАП 0,1 + ИУК 0,01	5,7 ± 0,4	80	6,1 ± 0,1	90
МС 6-БАП 0,5 + 2Fe	2,1 ± 0,2	20	3,4 ± 0,4	10
МС ЦФ 0,5 + ИУК 0,01	<b>24,8 ± 0,6</b>	0	<b>29,6 ± 0,3</b>	0

На питательной среде МС БАП 0,5 + 2 Fe наблюдали гибель 20 % растений-регенерантов. При этом растения быстро потеряли свой цвет, и изменялась морфология.

На питательной среде МС БАП 0,1+ИУК 0,01 развитие растений было динамичным, но процент витрифицированных побегов достигал 90 % для *S. hellmannii* и 80 % для *S. cretacea*.

На питательной среде МС ЦФ 0,5 + ИУК 0,01 развитие растения было наиболее благоприятным, каллусная ткань не образовывалась до следующего субкультивирования (30 дней). При этом коэффи-

циент размножения был максимальным и составил  $24,8 \pm 0,6$  и  $29,6 \pm 0,3$  для *S. cretacea* и *S. hellmannii* соответственно.

Наш опыт по укоренению *S. cretacea* и *S. hellmannii* показал, что использование полной минеральной основы МС требуются более высокие концентрации ауксинов – от 1,0 мг/л. Использование обедненных питательных сред – Уайта, ½ MS позволяют снизить концентрацию ауксинов – от 0,3 до 0,5 мг/л.

В настоящее время на базе лаборатории биотехнологии отрабатываются приемы и методы адаптации к нестерильным условиям и длительного депонирования *S. cretacea* и *S. hellmannii*. В результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия для длительного сохранения растений-регенерантов.

Растения *in vitro* хранятся в климатической камере (SANYO MRL-351H) на питательной среде ½ MS дополненной 6-БАП 0,4 мг/л, сахарозой (20 мг/л), t (3-70С) при освещенности (500–1200 лк).

Таким образом, методы биотехнологии являются дополнительным вариантом сохранения редких видов *ex situ*. Их роль в сохранении редких видов тем более важна, что флора Нижнего Поволжья отличается уникальностью. Сохранение этого ценного генофонда возможно только при сочетании различных форм охраны, подкрепленных глубокими и разносторонними научными исследованиями.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко Р. Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
- Коротков О. И., Князева И. В.** Закладка основ генетического банка *in vitro* редких и исчезающих видов растений образовательного центра «Сириус» // Вестник КрасГАУ, 2021. – № 12. – С. 105–109.
- Красная книга Волгоградской области.** Т. 2. Растения и другие организмы / под ред. О. Г. Барановой, В. А. Сагалаева. – Воронеж: ООО «Издат-Принт», 2017. – 268 с.
- Красная книга Российской Федерации (растения и грибы)** / сост. Р. В. Камелин и др. – М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2008. – 855 с.
- Крицкая Т. А., Евсеева Н. В., Бурьгин Г. Л., Кашин А. С., Щеголев С. Ю.** Использование *Azospirillum brasilense* Sp245 для повышения эффективности микрклонального размножения смолевки меловой (*Silene cretacea* Fisch. ex Spreng.) // Биотехнология, 2017. – Т. 33, № 1. – С. 72–79.
- Крицкая Т. А., Кашин А. С.** Использование метода культуры *in vitro* сохранения некоторых редких и исчезающих кальцефильных видов растений Саратовской области // Известия Саратовского ун-та. Новая серия. Химия. Биология. Экология, 2013. – Т. 13, вып. 4. – С. 65–72.
- Малаева Е. В.** Сохранение редких видов растений в коллекции *in vitro* Волгоградского регионального ботанического сада // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: Материалы XVIII Междунар. науч.-практ. конф. – Барнаул, 2019. – С. 606–610. DOI: 10.14258/pbssm.2019127.
- Малаева Е. В.** Сохранение редких видов растений в генетическом банке Волгоградского регионального ботанического сада // Субтропическое и декоративное садоводство, 2020. – № 73. – С. 61–68.
- Малаева Е. В., Куприянова П. Н.** Изучение начальных этапов введения в культуру *in vitro* семян редких видов растений // Изучение, сохранение и восстановление естественных ландшафтов: Материалы IV междунар. науч.-практ. конф. – Волгоград: Волгоградское науч. изд-во, 2014. – С. 79–81.
- Малаева Е. В., Супрун Н. А., Коротков О. И., Короткова О. О.** Генетический банк редких и ценных видов растений Волгоградского регионального ботанического сада // Вестник ВолГУ, 2008. – № 1(13). – С. 242–246.
- Молканова О. И.** Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких видов растений // Бюл. ГБС, 2017. – № 1(203). – С. 42–48.
- Молканова О. И., Горбунов Ю. Н., Ширнина И. В., Егорова Д. А.** Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений // Бот. журн., 2020. – Т. 105, № 6. – С. 610–619.