

УДК:576.8.093.1 (572) (04)

А.Р. Умралина

Институт биотехнологии НАН Кыргызской Республики, Кыргызстан, г. Бишкек
E-mail: umralina@mail.ru

Введение в культуру *in vitro* эндемиков рода *Silene* семейства *Caryophyllaceae*

Разработаны протоколы микроразмножения и укоренения для 6 видов эндемиков рода смолевки (*Silene*). Для преодоления покоя были использованы методы химической и механической скарификации, холодной и теплой стратификации. Подобраны оптимальные среды для микроразмножения каждого вида. Изучено влияние различных гормональных добавок к среде MS на индукцию ризогенеза и подобраны среды для укоренения микрочеренков. Оптимальной средой для культивирования и укоренения 4 видов эндемиков – *S. fetissoviai*, *S. obovata*, *S. sussamyrica* и *S. ladyginae* – была основная среда MS с добавлением ИУК (1 мг/л). У *S. obovata* нормальные побеги с хорошо развитой корневой системой формировались как на среде MS, так и с добавлением ИУК в концентрации 1 мг/л. Для *S. schischkinii* оптимальной средой для микрочеренкования была среда MS с добавлением БАП (0,1 мг/л) и ГК (0,2 мг/л). Для микроразмножения и укоренения *S. eviscosa* наиболее подходящей средой оказалась среда MS с добавлением кинетина (0,1 мг/л) и ГК (0,2 мг/л). Оптимальной средой для укоренения всех видов служила среда MS с добавлением ИУК (1 мг/л).

Ключевые слова: эндемики, семенной банк, смолевки, микроразмножение, всхожесть, питательные среды, укоренение микрочеренков.

A.R. Umralina

In vitro culture introduction of *Silene* genus of *Caryophyllaceae* family endemic species

Micropropagation and rooting protocols for 6 endemic species of *Silene* genus species were developed. Chemical and mechanical stratification and cold and warm stratification methods were used. Germination period of various species highly varied and temperature change was required for germination besides long term cultivation. Optimal media for each species cultivation were selected. Impact of various hormones addition to MS medium on rhizogenesis induction was studied and media for plantlet rooting were selected. The optimal medium for rooting of 4 endemics – *S. fetissoviai*, *S. obovata*, *S. sussamyrica* and *S. ladyginae* was MS medium with addition IAA (1 mg/l). *S. obovata* normal plantlets with good root system were formed both on MS medium and with addition of 1 mg/l IAA. For *S. schischkinii* the optimal medium for micropropagation was MS medium with addition of BAP (0.1 mg/l) and GA (0.2 mg/l). The most suitable medium for micropropagation and rooting *S. eviscosa* was MS medium with addition kinetin (0.1 mg/l) and GA (0.2 mg/l). MS medium was optimal medium for rooting of all species with addition IAA (1 mg/l).

Key words: endemic, seed bank, micropropagation, germination, growth media, rooting of microcutting.

А.Р. Умралина

Caryophyllaceae тұқымдасының *Silene* туысына жататын эндемиктерді *in vitro* жағдайында культураға енгізу

Silene туысына жататын 6 эндемик түрін микрокөбейту және тамырландыру әдістемесі жасалды. Тыныштық күйді жеңу үшін химиялық және механикалық скарификация, суық және жылулық стратификация әдістері қолданылды. Әртүрлі түрге жататын өсімдік тұқымдарының өну кезеңі арасында айырмашылықтары байқалды, сонымен қатар тұқымдардың өнуіне уақыттан бөлек қосымша температураны өзгерту талап етілді. Әр түрге жататын өсімдіктерді микрокөбейту үшін арнайы оптимальды қоректік орталар таңдалды. MS ортасына әртүрлі гормональды қоспалардың ризогенез индукциясына әсері мен микроөркендерді тамырлануына қолайлы орталар зерттелді. 4 эндемик түр: *S. fetissoviai*, *S. obovata*, *S. sussamyrica* және *S. ladyginae* өсімдіктерін культивирлеу мен тамырландыру үшін оптимальды орта – 1 мг/л концентрацияда ИСК қосылған MS негізгі ортасы болып табылды.

S. obovata өсімдігінің тамыр жүйесі жақсы дамыған қалыпты өркендері 1 мг/л концентрацияда ИСК қосылған және фитогормон қосылмаған MS ортада отырғызылған экспланттарда байқалды. *S. schischkinii* микроқалемшелеу үшін оптимальды орта (0,1 мг/л) БАП және (0,2 мг/л) ГК қосылған MS ортасы болды. *S.*

eviscosa өсімдігін микроклондық көбейту және тамырландыру үшін (0,1мг/л) кинетин және (0,2 мг/л) ГК қосылған MS ортасы лайықты деп табылды. Барлық 6 түрге жататын өсімдіктерді тамырландыру үшін (1мг/л) ИСҚ қосылған MS ортасы оптимальды екендігі анықталды.

Түйін сөздер: эндемиктер, тұқым банкі, *Silene* туысы, микрокөбейту, тұқымның өнуі, қоректік орталар, микрокалемшелерді тамырландыру.

В мировой флоре насчитывают 400 видов смолевок. Это многолетние травы, реже кустарнички. Некоторые виды используются в качестве декоративных, известны также лекарственные свойства этих растений, издавна используемые в народной медицине. Химический состав вторичных соединений смолевок изучен недостаточно, до недавнего времени отмечали наличие сапонинов. Проведенные в последние годы исследования химического состава лекарственных растений показали, что биологическая активность многих видов обеспечивается фитостероидами [1, 2]. Оказалось, что по сравнению с известным адаптогеном маральим корнем в растениях смолёвки татарской содержание экистероидов на порядок выше.

Изучение потенциальных лекарственных свойств смолевок представляет большой интерес, причем как изучение как *in vivo*, так и *in vitro*. Особенно это актуально по отношению к эндемичным видам. Для проведения такого рода исследований, прежде всего, следует предварительно подобрать протоколы микроразмножения и укоренения проростков.

Материалы и методы

Род *Silene* является крупнейшим родом семейства Caryophyllaceae в Кыргызстане и представлен 31 видом [3]. Семенной банк Института биотехнологии НАН КР включает 9 видов смолевок, из них 6 эндемиков, которые служили объектами исследований (табл. 1). Сбор материала проводился д.б.н. Лазьковым Г.А.

Таблица 1 – Эндемичные виды смолевок Кыргызстана, представленные в семенном банке Института биотехнологии НАН КР

№	Вид	Природо-охранный статус*	Год и место сбора	Распространение в Кыргызстане
1	<i>Silene eviscosa</i> Bondar. et Vved. Смолевка Нелипкая Жылмакай чайырккан	E,VU	Алайский хребет, перевал Белес из Оша в Наукат, полусаванна, h=1320, 12.07.2005	Чаткальский, Ферганский и Алайский хребты. Сообщества: каменисто-щебнистые местообитания в полусаванных группировках, в нижнем поясе гор
2	<i>Silene fetissovii</i> Lazkov С. Фетисова Фетисовдун чайыркканы	E,VU	Ферганский хребет, скалы над селом Джародар, h = 1300, 15.07.2004	Чаткальский, Атойнокский, Узунахматский хребты. Сообщества: группировки скальной растительности
3	<i>Silene ladyginae</i> Lazkov С. Ладыгиной Ладыгинанын чайыркканы	E,DD	2006 Ферганский хребет, горы Тахталык, р. Карасу, скалы, h = 1047, 03.08.2006	Ферганский и Атойнокский хребты. Сообщества: скалистые склоны в нижнем поясе гор
4	<i>Silene obovata</i> Schischk. С. обратнойцевидная Жумурткадай чайырккан	SE,R,VU	Коксуйский хребет, берег реки Чаткал, близ с. Акташ, скалы, h = 1409, 29.07.2005	Пскемский и Коксуйский хребты. Сообщества: скалы и осыпи в среднем поясе гор
5	<i>Silene schischkinii</i> (M.Pop.) Vved. С. Шишкина Шишкиндин чайыркканы	E,VU	Чаткальская долина, близ спуска с перевала Чапчама, h = 1444, 30.07.2005	Чаткальский и Пскемский хребты Сообщества: каменисто-щебнистые местообитания в полусаванных группировках, в среднем поясе гор

Продолжение таблицы 1

6	<i>Silene sussamyrica</i> Lazkov С. сусамырская Сусамырдык чайырган	Е,КРБ, VU	Сусамырский хребет, ущелье реки Чич- кан, скалы, h = 1600, 02.08.2006	Хребты Сусамыр-Тоо, Кок-Ирим-Тоо, Кавак-Тоо, Молдо-Тоо. Сообщества: скалы в среднем поясе гор
Примечание: Е – эндемик, SE – субэндемик, R – редкий вид, КРБ – занесен в Красную книгу Кыргызстана, VU – уязвимый вид, DD – недостаточно данных				

Семена стерилизовали и высаживали для проращивания в чашки Петри с агаризованной средой Мурасиге-Скуга – MS [4] без гормонов. Стерилизацию проводили несколькими способами, в зависимости от морфологии семян. Мелкие семена с тонкой кожурой стерилизовали 30-40 секунд в 96° этиловом спирте, затем 5 минут в 5% растворе гипохлорида натрия и 5 минут в 33% перекиси водорода. После каждого этапа – несколько раз отмывали стерильной дистиллированной водой. Толстостенные семена стерилизовали концентрированной серной кислотой от 5 до 60 минут в различных вариантах. При такой стерилизации мы одновременно проводили и скарификацию толстостенных семян [5].

Для преодоления состояния покоя семян использовали методы химической и механической скарификации, холодной и теплой стратификации. Семена, требующие холодной стратификации, помещались в холодильник при 4-5°C. Остальные семена проращивали при температуре 18 -22°C. Если при таком режиме проращивания семена не проросли, то их подвергали холодной стратификации при температуре 4 –5°C с последующим проращиванием при 18-22°C. Для некоторых видов пришлось применять режим с неоднократной сменой температур.

Для микроразмножения полученных стерильных проростков растений использовали агаризованную питательную среду, содержащую минеральные соли по MS, сахарозу (20г/л) и 7 г/л агара с добавками фитогормонов и гормоноподобных синтетических регуляторов роста в различных концентрациях и сочетаниях. Для мультипликации побегов использовались среды с добавлением цитокининов: кинетина и 6-бензиламинопурина (БАП). Для удлинения укороченных побегов в среды вводилась гибберелловая кислота (ГК) При укоренении полученных побегов применяли среды с добавлением

β-индолилуксусной кислоты (ИУК) [6]. В качестве контроля использовали безгормональную среду MS. pH питательных сред – 5,6-5,8. Продолжительность пассажа на одной среде составляла 14-20 суток. На всех этапах культивирования поддерживали температуру +25°C, фотопериод – 16 ч.

Результаты и их обсуждение

Большинство родов семейства Caryophyllaceae, к которым относятся смолевки, характеризуются неглубоким физиологическим покоем семян. Такой покой довольно легко нарушается под действием разных факторов. Но у представителей этого рода наблюдаются гетерокарпия и гетероспермия, т. е. варьируют цвет, размер и некоторые другие особенности плодов и заключенных в них семян. Соответственно варьирует и глубина покоя семян разных фракций, период прорастания семян многих видов сильно растянут [7].

Это подтверждают и наши опыты по проращиванию. Всхожесть семян была довольно высокой. Семена *S. eviscosa*, *S. fetissovii*, *S. ladyginae*, *S. schischkinii* и *S. sussamyrica* начали прорастать на 2-5 сутки, при температуре +18-22°C. Семена 3 видов – *S. fetissovii*, *S. ladyginae* и *S. schischkinii* проросли все только после нескольких этапов смены температур.

Подбор сред для микроразмножения проводили следующим образом. Экспланты каждого вида высаживали на основную среду MS с гормональными добавками в различных концентрациях. После получения результатов первого опыта в следующих пассажах сравнивались между собой лучшие из вариантов сред и детализировался их состав [8]. Через 2-4 пассажа для большинства видов таким способом были подобраны подходящие среды для микроразмножения (табл. 2).

Таблица 2 – Способы и оптимальные среды для микроразмножения и укоренения

Вид	Способ микроразмножения	Оптимальная среда для микроразмножения	Среда для укоренения
<i>S. schischkinii</i>	микрочеренкование	MS + 0,1 мг/л БАП +0,2 мг/л ГК	MS + 1 мг/л ИУК
<i>S. fetissoyii</i>	микрочеренкование	MS +1 мг/л ИУК	MS +1 мг/л ИУК
<i>S. obovata</i>	микрочеренкование	MS без гормонов или с добавлением 1 мг/л ИУК	MS без гормонов или с добавлением 1 мг/л ИУК
<i>S. sussamyrica</i>	микрочеренкование	MS +1мг/л ИУК	MS +1мг/л ИУК
<i>S. ladyginae</i>	микрочеренкование	MS +1мг/л ИУК	MS +1мг/л ИУК
<i>S. eviscosa</i>	междоузлий почти нет, растения с удаленной верхушечной почкой целиком сажали на питательную среду для пробуждения боковых почек	MS+0,1мг/л Кин.+0,2 мг/л ГК	MS + 0,1мг/л Кин. + 0,2 мг/л ГК; MS + 1 мг/л. ИУК

Стерильные растения 3 видов – *S. fetissoyii*; *S. schischkinii*, *S. obovata* – легко черенкуются, и пазушные почки пробуждаются на среде без гормонов (контроль), но у микрочеренков, посаженных на эту среду, стебель утолщается, образуя каллус, и многие инициированные пазушные почки образуют очень короткие розеточные побеги. Нам не удалось инициировать их удлинение. Побеги нормально развивались только при введении в среду гормонов.

Микрочеренки *S. fetissoyii* и *S. obovata* хорошо росли на среде с добавлением 0.1 мг/л ИУК. На этой среде наблюдалось нормальное развитие растений (черенков), каждый черенок давал один побег, высотой 6-7 см, с хорошо развитыми междоузлиями, через 8-10 дней на черенке образовывались корни. Растение готово к новому черенкованию.

На черенках *S. schischkinii*, посаженных на среды MS без гормонов и с добавлением 1,0 мг/л ИУК, боковые почки пробуждались, но развивались очень плохо, не вытягивались, желтели. На среде с добавлением 0,5 мг/л БАП+0,5 мг/л ИУК – очень быстро пробуждались боковые почки, побеги хорошо развивались, но часть побегов витрифицировалась, образовывался каллус. При уменьшении концентрации БАП до 0,1 мг/л у большей части черенков пробуждалось по одной боковой почке, которые давали хорошо растущие побеги; у части черенков – по две почки,

побеги образующиеся на них не вытягивались, имели очень короткие междоузлия. Лучшей средой для микроразмножения оказалась среда с добавлением 0,1 мг/л БАП+0,2мг/л ГК.

Черенки *S. eviscosa* на среде MS без гормонов и с добавлением 1.0 мг/л ИУК образовывали плотную розетку листьев, пазушные почки не образовывались, что препятствовало их размножению методом черенкования. Для стимулирования развития пазушных почек и получения боковых побегов необходимо было удалить верхушечную почку и пересадить их на среду, содержащую кинетин и ГК. В нашем случае это среда с добавлением 0,1мг/л кинетина +0,2 мг/л ГК. Содержание в среде кинетина стимулирует побегообразование, но приводит к блокированию апикального доминирования и, как следствие, вызывает значительное снижение высоты побега.

Для получения полноценных растений при микроклональном размножении необходим этап укоренения полученных побегов, так как часто через несколько пассажей экспланты теряют способность к нормальному органогенезу. Хорошо развитые корни необходимы и при переводе растения в грунт. Для укоренения обычно используют питательные среды с уменьшенной концентрацией минеральных солей и добавлением регуляторов роста ауксинового типа в различных концентрациях. При подборе опти-

мальной среды для укоренения побеги растений, полученных при микроразмножении, пересаживали на агаризованную среду MS с половинным содержанием солей и 10 г/л сахарозы; без гормонов и с добавлением: α -нафтилуксусную кислоту (НУК), γ -индолилмасляную кислоту (ИМК), 2,4-дихлорфенилуксусную кислоту (2,4-Д), β -индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0.5 мг/л и 1 мг/л.

Для укоренения полученных побегов, если

они не укоренялись на среде для размножения, меняли основной состав среды: уменьшали в два раза концентрацию минеральных солей среды MS или заменяли средой Уайта, полностью исключали из среды цитокинины, добавляли ауксины. В качестве стимулятора корнеобразования использовали ИМК, ИУК, НУК или 2,4-Д. В таблице 3 показано влияние различных гормональных добавок к основной среде MS на индукцию ризогенеза у *S. fetissovii*.

Таблица 3 – Индукция образования корней *S. fetissovii* на среде MS с использованием различных гормональных добавок

Гормоны, мг/л	Количество посаженных побегов	Количество побегов, образовавших корни	Количество побегов, образовавших корни, %	Время появления первых корней, сут.	Среднее количество образовавшихся корней у проростка	Средняя длина самого длинного корня на 30-ый день	Характеристика растений, корней
Без гормонов	50	50	100	10	5	1,5	Хорошо развитые корни
ИУК-1.0	50	50	100	8	8	1,5	Хорошо развитые корни
2,4Д-0,5	25	6	24	11	1	0,4	Сильное каллусообразование, корни на каллусе рыхлые
2,4Д-1,0	25	8	32	10	2	1,0	
НУК-0,5	25	20	80	22	17	1,5	Сильное каллусообразование корни на каллусе рыхлые
НУК-1,0	25	25	100	22	18	1,5	
ИМК-0.5	25	25	100	7	8	2,5	Корни у основания рыхлые, сильно ветвятся
ИМК-1.0	25	25	100	7	9	3,0	
НУК 0.2 + ИМК 0.2	25	25	100	20	18	2,0	Сильное каллусообразование, корни на каллусе рыхлые
		P>0,01		P>0,05	P>0,01	P>0,05	

Побеги *S. fetissovii* образовывали хорошо развитые корни как на среде без гормонов, так и с добавлением ИУК. Среда с ИУК предпочтительна, так как на ней происходит нормальное удлинение побегов, остальные добавки вызывали каллусообразование. Корни чаще всего образовывались не на стебле, а на каллусе.

Таким образом, нами были введены в культуру

in vitro 6 видов смолёвок эндемиков и подобраны оптимальные среды для микроразмножения и индукции ризогенеза. Период прорастания семян разных видов варьировал от 2 суток (*S. eviscosa*, *S. fetissovii*, *S. ladyginae*, *S. schischkinii* и *S. sussamyrica*) до 50 дней у *S. obovata*. Для преодоления покоя этому виду, помимо длительного времени, потребовалась и неоднократная смена температур.

Оптимальной средой для культивирования видов 4 видов эндемиков – *S. fetissoyii*, *S. obovata*, *S. sussamyrica* и *S. ladyginae* была основная среда MS с добавлением ИУК (1 мг/л), на которой формировались нормальные побеги с хорошо развитой корневой системой. *S. obovata* размножался одинаково как на чистой среде MS, так и с добавлением ИУК в концентрации 1

мг/л. Для *S. schischkinii* оптимальной средой для микрочеренкования была среда MS с добавлением БАП (0,1 мг/л) и ГК (0,2 мг/л). Для микро-размножения и укоренения *S. eviscosa* наиболее подходящей средой оказалась среда MS с добавлением кинетина (0,1 мг/л) и ГК (0,2 мг/л). Единой средой для укоренения всех видов служила среда MS с добавлением ИУК (1 мг/л).

Литература

- 1 Зибарева Л.Н. Фитоэкдистероиды растений семейства Caryophyllaceae: дис. д-ра хим. наук. – Томск, 2003. – 247 с.
- 2 Володин В. Фитоэкдистероиды – новые растительные адаптогены: от решения фундаментальных проблем до инновационных проектов // Кто есть Кто в образовании и науке. – 2009. – №2(2).
- 3 Лазьков Г.А. Семейство гвоздичные (Caryophyllaceae) во флоре Кыргызстана. – М., 2006. – 272 с.
- 4 Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1964. – №15. – P. 473-497.
- 5 Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 486 с.
- 6 Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983.
- 7 Николаева М.Г. Особенности прорастания семян растений из подклассов Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae и Hamamelididae // *Ботанический журнал.* – 1988. – Т.73. – С.508-521.
- 8 Uddin S. M. Regeneration of multiple shoots from different explants viz. shoot tip, nodal segment and cotyledonary node of *in vitro* grown seedlings of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) // *Biotechnology.* – 2005. – V. 4(1). – P. 35-38.

References

- 1 Zibareva L.N. Dis. d-ra him. nauk. Fitoekdisteroidy rastenij semejstva Caryophyllaceae. – Tomsk, 2003. – 247 s.
- 2 Volodin V. Fitoekdisteroidy – novye rastitel'nye adaptogeny: ot reshenija fundamental'nyh problem do innovacionnyh proektov // *Kto est' Kto v obrazovanii i nauke.* – 2009. – №2(2).
- 3 Lazkov G.A. Semejstvo гвоздичные (Caryophyllaceae) vo flore Kyrgyzstana. – M., 2006. – 272 s.
- 4 Murashige T. and Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1964. – №15. – P. 473-497.
- 5 Kalinin F.L. Metody kul'tury tkanej v fiziologii i biohimii rastenij. – Kiev: Naukova dumka, 1980. – 486 s.
- 6 Kataeva N.V., Butenko R.G. Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij. M.: Nauka, 1983.
- 7 Nikolaeva M.G. Osobennosti prorastaniya semjan rastenij iz podklassov Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae i Hamamelididae // *Botanicheskij zhurnal.* – 1988. – T.73. – S.508-521.
- 8 Uddin S. M. Regeneration of multiple shoots from different explants viz. shoot tip, nodal segment and cotyledonary node of *in vitro* grown seedlings of *Peltophorum pterocarpum* (DC.) // *Biotechnology.* – 2005. – V. 4(1). – P. 35-38.