

УДК 635.92:581.143.6

DOI: 10.31040/2222-8349-2019-0-2-66-72

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА СРЕДЫ НА РАЗМНОЖЕНИЕ *PHLOX SIBIRICA* L. В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

© А.Ш. Ахметова, А.А. Зарипова, А.И. Шигапова

Показана возможность эффективного применения метода культуры тканей для размножения *Phlox sibirica* L. Разработаны оптимальные среды для побегообразования и ризогенеза. В результате экспериментов установлено, что при культивировании фрагментов стерильного проростка *P. sibirica* на питательной среде Мурасиге и Скуга (MS), дополненной регуляторами роста, характерны следующие типы морфогенеза: каллусогенез и геммогенез, который связан с активацией существующих меристем и индукцией образования почек *de novo* непосредственно на экспланте. При культивировании эксплантов на питательной среде MS, дополненной БАП 0.35–0.5 мг/л, наблюдали прямую регенерацию растений. Причем, независимо от состава питательной среды, количество микропобегов во всех испытанных вариантах было высоким и составляло от 8.4 до 17.5 штук на один эксплант. Интенсивный каллусогенез и большой объем каллусной ткани формировался преимущественно на базальной части побега *P. sibirica*. Каллус был дифференцированный, светло-зеленый, рыхлой консистенции и образовывался в течение 1.5–2 мес. Индукция образования почек *de novo* наблюдалась и в каллусной ткани. В варианте кинетин 1.5 мг/л + НУК 1.0 мг/л, где началу морфогенеза сопутствовал процесс каллусогенеза, число микропобегов, образующихся в каллусной ткани, не превышал 6.1 штук на эксплант. Исключение составил лишь один вариант, где в качестве стимулятора морфогенеза в питательной среде присутствовали БАП 2.5 мг/л + ИУК 1.0 мг/л. В этих условиях культивирования в каллусной ткани образовывалось максимальное количество меристематических зон, из которых в дальнейшем развивались нормальные по морфологии микропобеги – 12.3. В результате экспериментов установлено, что оптимальной для образования микропобегов являлась питательная среда, содержащая БАП в концентрации 0.4 мг/л. В этих условиях наблюдалась максимальная регенерация побегов до 17.5 шт. на эксплант за один пассаж. Побеги *P. sibirica* укореняли на среде ½ MS, дополненной ИМК в концентрации 0.5 мг/л. Частота приживаемости растений-регенерантов *P. sibirica* в условиях *ex vitro* составила 60.3%.

Ключевые слова: редкие виды, культура *in vitro*, регенерация, размножение, *Phlox sibirica*.

Флокс сибирский *Phlox sibirica* L. – красивоцветущая культура; представитель семейства Синюховые *Polemoniaceae*. Относится к группе стелющихся флоксов. *P. sibirica* – американо-сибирский скально-горно-степной вид, распространенный в Западной и Восточной Сибири, в северных регионах Дальнего Востока, на Южном Урале и в Монголии. В отличие от своих близких родственников *P. sibirica* используется в народной медицине. Настои применяют при катаре верхних дыхательных путей и как успокаивающее средство при нервной бессоннице и испуге. Настойки и смеси из травы и корней используются при раке молочной железы,

болезнях желудочно-кишечного тракта. Наружно в виде примочек применяют при груднице и раке кожи.

Редкое растение, занесенное в Красную книгу Республики Башкортостан с категорией 3 [1] и в ряд региональных Красных книг Российской Федерации. Численность *P. sibirica* значительно колеблется по годам, в течение последних 40 лет наблюдается резкое снижение численности вида. Причиной снижения численности является низкая конкурентоспособность, затенение, переувлажнение. Редкие и реликтовые виды в природе являются очень уязвимой биологической группой, поскольку имеют

АХМЕТОВА Альбина Шамсуновна – к.б.н., Южно-Уральский ботанический сад-институт УФИЦ РАН, e-mail: al_sham75@mail.ru

ЗАРИПОВА Альфия Ануровна – к.б.н., Южно-Уральский ботанический сад-институт УФИЦ РАН, e-mail: zaripova.al@mail.ru

ШИГАПОВА Альфира Инсафовна, Южно-Уральский ботанический сад-институт УФИЦ РАН, e-mail: botsad@anrb.ru

сильно ограниченный ареал, популяции их чаще неполночленные, с низким показателем обилия. Они, как правило, не обладают высокой интенсивностью как вегетативного, так и семенного размножения. При усилении степени хозяйственного вмешательства человека в природные эколого-ценотические комплексы группа ограниченных в распространении видов переходит в разряд исчезающих. Учитывая возможность повреждения значительного количества взрослых особей, представляется необходимым, помимо охраны популяций *P. sibirica in situ*, сохранение видов путем интродукции, с последующим созданием искусственных интродукционных популяций за пределами современного ареала. Поэтому разработка альтернативных способов для сохранения и восстановления численности редкого вида *P. sibirica* весьма актуальна. Чрезвычайно важно и то, что такая разработка дает уникальную возможность сохранить природные популяции *P. sibirica*.

При выборе стратегии сохранения и воспроизводства биоразнообразия редких, исчезающих видов растений многими исследователями показана эффективность методов биотехнологии в сравнении с традиционными способами их размножения [2–4].

Целью исследования являлось определение оптимальных условий (в частности, состава питательной среды) для размножения *in vitro* редкого вида *P. sibirica*.

Условия эксперимента. В качестве исходного материала для исследований использовали семена *P. sibirica*, полученные по деклтусу. Проведена оценка эффективности различных подходов стерилизации эксплантов при введении в культуру *in vitro*, разработаны условия обеспечения оптимального роста и развития растений за счет подбора питательной среды и физических условий культивирования.

Работу в асептических условиях, стерилизацию питательных сред и посадочного материала проводили согласно имеющимся рекомендациям [5–7]. Поверхностную стерилизацию проводили в ламинар-боксе с использованием в качестве стерилизующих агентов ртутьсодержащее соединение (диацид) в концентрации 0.1% и хлорсодержащее соединение (лизоформин) в концентрации 1.0%. Семена сначала обрабатывали 70%-м этанолом,

затем одним из вышеперечисленных стерилизующих растворов. Экспозиция воздействия стерилизующих растворов составляла от 6 до 11 мин.

Семена *P. sibirica* помещали на безгормональную среду, содержащую минеральные соли, по прописи MSO. Для культивирования стерильных проростков использовали модифицированную среду Мурасиге и Скуга (MS) [8], различающуюся по типу и концентрации цитокининов и ауксинов. Процесс размножения изучали в контролируемых условиях: 16-часовой фотопериод, температура $24 \pm 1^\circ\text{C}$, влажность воздуха не менее 70%.

Для инициации морфогенетических процессов экспланты (фрагменты стерильных проростков) помещали на модифицированную среду MS, различающиеся по типу и концентрации цитокининов: 6-БАП (6-бензиламинопурин), кинетин (Кин) и ауксинов: α -НУК (α -нафтилуксусная кислота), ИУК (индолилуксусная кислота). Средняя продолжительность пассажа составляла 6 недель.

Коэффициент размножения подсчитывали путем деления общего количества образовавшихся побегов за субкультивирование на число высаженных эксплантов. Учитывали регенерационную способность эксплантов (количество и длину побегов, корней). Адаптацию растений-регенерантов к нестерильным условиям выращивания осуществляли в теплице.

Результаты и обсуждение. Одним из ключевых моментов размножения *in vitro* является разработка приемов введения растительного материала в стерильную культуру, что предусматривает как выбор экспланта, так и подбор условий стерилизации. Используемые нами стерилизующие растворы по-разному влияли на жизнеспособность семян и последующее развитие проростков.

Из табл. 1 следует, что применение лизоформина для стерилизации семян не является оптимальным, так как при его использовании получено лишь 13.7–25.0% стерильной культуры. Несмотря на выдерживание семян в лизоформине в течение 11 мин, число инфицированных оставалось высоким и составляло 75.0%. При асептической обработке семян *P. sibirica* в 0.1% растворе диацида в течение 10 мин получено максимальное число стерильной культуры – 86.7%, которое характеризовалось интенсивным ростом.

Т а б л и ц а 1

Влияние стерилизующего раствора и его экспозиции на получение стерильной культуры *Phlox sibirica*, (%)

Стерилизующий раствор					
диацид 0.1%			лизиформин 1.0%		
экспозиция стерилизации, мин			экспозиция стерилизации, мин		
6	8	10	6	10	11
16.7 ± 5.07	41.7 ± 7.12	86.7 ± 4.58	13.7 ± 4.73	17.3 ± 5.25	25.0 ± 6.00

Т а б л и ц а 2

Влияние факторов гормональной среды на морфогенез *Phlox sibirica in vitro*

№ варианта	Гормональный состав питательной среды, мг/л	Число побегов на эксплант, шт.	Каллусогенез	Примечание
1	БАП 0.5	11.0 ± 0.3	–	витрификация
2	БАП 2.5 + ИУК 1.0	12.3 ± 0.3	+	–
3	БАП 0.4	17.5 ± 0.6	–	единичное корнеобразование
4	БАП 0.2	8.4 ± 0.1	–	–
5	БАП 0.35	10.2 ± 0.2	–	витрификация
6	Кин 1.5 + НУК 1.0	6.1 ± 0.4	+	–

Интенсивность морфогенеза зависит от наличия регуляторов роста, использованных в питательной среде. Одним из важнейших и неотъемлемых компонентов питательной среды являются регуляторы роста. Их тщательный подбор и выявление оптимальных концентраций позволяет повысить эффективность метода клонального микроразмножения *P. sibirica* [9, 10]. Поэтому следующим этапом работы было изучение влияния экзогенных регуляторов роста на процесс морфогенеза.

Всего в исследовании было испытано 6 вариантов питательной среды (табл. 2). Контролем служила безгормональная питательная среда MSO.

Условия безгормональной среды оказались менее эффективными для развития *P. sibirica*: отсутствие регуляторов роста хотя иногда и вызывало начало морфогенетических процессов, но в дальнейшем приводило к гибели эксплантов в результате некроза.

В результате экспериментов установлено, что при культивировании фрагментов проростка *P. sibirica* на среде MS, дополненной регуляторами роста, характерны следующие типы морфогенеза: каллусогенез и геммогенез, который связан с активацией существующих меристем и индукцией образования почек *de novo* непосредственно на экспланте и из каллусной ткани. Как следует из табл. 2, при культивировании экс-

плантов в вариантах 1, 3, 4, 5 питательной среды MS наблюдали прямую регенерацию растений. Причем, независимо от состава питательной среды, количество микропобегов во всех испытанных вариантах было высоким и составляло от 8.4 до 17.5 штук на один эксплант.

Интенсивный каллусогенез и большой объем каллусной ткани формировался преимущественно на базальной части побега *P. sibirica* (рис. 1). Каллус был дифференцированный, светло-зеленый, рыхлой консистенции и образовывался в течение 1.5–2 мес. Выявлено более интенсивное каллусообразование в варианте БАП 2.5 мг/л + ИУК 1.0 мг/л.

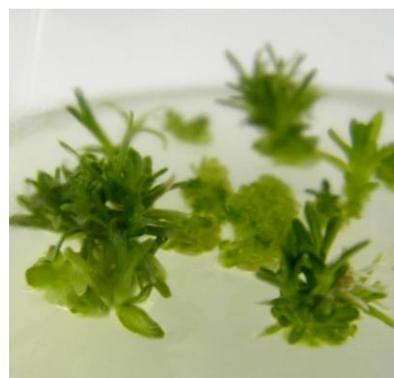


Рис. 1. Каллусогенез на базальной части проростка *Phlox sibirica* L. на питательной среде MS, дополненной БАП 2.5 мг/л + ИУК 1.0

Индукция образования почек *de novo* наблюдалась и в каллусной ткани. В варианте 6 – Кин 1.5 мг/л + НУК 1.0 мг/л (табл. 2), где началу морфогенеза сопутствовал процесс каллусогенеза, число микропобегов, образующихся в каллусной ткани, не превышал 6.1 штук на эксплант. Исключение составил лишь один вариант, где в качестве стимулятора морфогенеза в питательной среде присутствовали БАП 2.5 мг/л + ИУК 1.0 мг/л (рис. 2). В этих условиях культивирования в каллусной ткани образовывалось максимальное количество меристематических зон, из которых в дальнейшем развивались нормальные по морфологии микропобеги – 12.3.



Рис. 2. Каллусная ткань *Phlox sibirica* L. с последующей индукцией развития микропобегов на питательной среде MS, дополненной БАП 2.5 мг/л + ИУК 1.0 мг/л

Следует отметить, что в вариантах 1, 5 (БАП 0.5 мг/л; БАП 0.35 мг/л), где наблюдали прямую регенерацию растений, образование меристематических зон и формирование микропобегов нередко сопровождалось образованием витрифицированных тканей, которые ингибировали дальнейший рост побегов.

В результате экспериментов установлено, что оптимальной для образования микропобегов являлась питательная среда, содержащая БАП в концентрации 0.4 мг/л (рис. 3, 4). В этих условиях наблюдалась максимальная регенерация побегов до 17.5 шт. на эксплант.

После многократных субкультивирований *P. sibirica* в стерильных условиях на средах для размножения побегов с целью получения достаточного количества материала проводили этапы укоренения и адаптации побегов *ex vitro*.

Для стимуляции процесса укоренения побегов из питательной среды исключили цитоки-

нины. Результаты экспериментов по подбору питательных сред на этапе укоренения показывают значительные отличия скорости укоренения в зависимости от ауксинов и их концентрации, применяемых для индукции ризогенеза. Применение НУК и ИУК в концентрации 0.2–2.0 мг/л вызывало образование каллуса в основании побегов, который препятствовал закладке корней. Поэтому побеги *P. sibirica* укореняли на среде $\frac{1}{2}$ MS, дополненной ИМК в различных концентрациях (табл. 3, рис. 5–7). Результаты этого эксперимента указывают на целесообразность использования в качестве индуктора ризогенеза для побегов *P. sibirica* ИМК.



Рис. 3. Индукция развития побегов *Phlox sibirica* L. на питательной среде MS, дополненной БАП 0.4 мг/л, через 1 мес культивирования



Рис. 4. Регенерация микропобегов *Phlox sibirica* L. на питательной среде MS, дополненной БАП 0.4 мг/л, через 2.5 мес культивирования

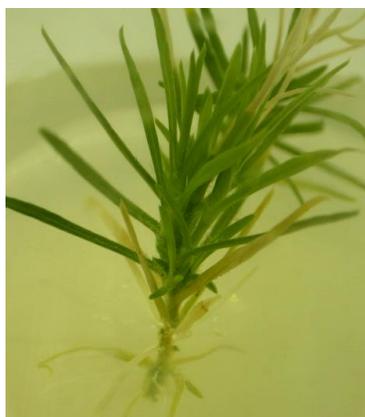


Рис. 5. Укоренение *Phlox sibirica* на питательной среде ½ MS, дополненной ИМК 0.2 мг/л

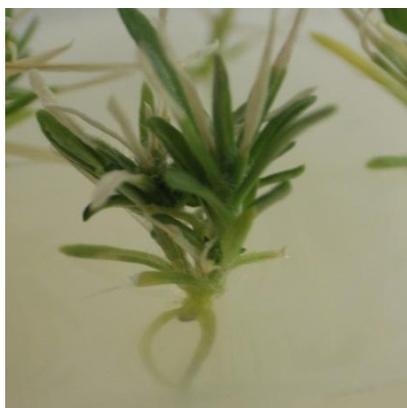


Рис. 6. Укоренение *Phlox sibirica* на питательной среде ½ MS, дополненной ИМК 2.0 мг/л



Рис. 7. Укоренение *Phlox sibirica* на питательной среде ½ MS, дополненной ИМК 0.5 мг/л

Т а б л и ц а 3

Укоренение побегов *Phlox sibirica* в условиях *in vitro* на питательной среде ½ MS, дополненной ИМК

Регуляторы роста, мг/л	Укорененные побеги, %	Среднее число корней на один побег, шт.	Средняя длина корней, см
ИМК 0.2	61.0 ± 1.7	6.4 ± 1.5	4.9 ± 1.3
ИМК 0.5	89.6 ± 1.9	7.80 ± 2.1	6.18 ± 2.1
ИМК 1.0	49.3 ± 1.6	4.7 ± 0.5	5.3 ± 1.8
ИМК 2.0	35.1 ± 1.5	2.9 ± 0.5	4.22 ± 1.3

Т а б л и ц а 4

Результаты адаптации растений-регенерантов *Phlox sibirica* на различных стерильных субстратах в условиях *ex vitro*

Тип субстрата	Частота приживаемости, %
песок	18.8±0.6
дерновая почва : вермикулит (1:1)	51.1±2.8
дерновая почва : вермикулит (2:1)	60.3±2.7
торф : вермикулит (1:1)	34.6±1.4
торф : вермикулит (2:1)	29.9 ±0.9
торф : песок (1:1)	23.7±1.6

Оптимальной для индукции корней оказалась концентрация 0.5 мг/л, обеспечивающая высокий процент укорененных побегов, равный 89.6%. Среднее число корней на один побег составила 7.8 шт., а длина корней достигала 6.18 см. Следовательно, питательную среду ½ MS, дополненную ИМК 0.5 мг/л, можно рекомендовать как универсальную для укоренения побегов, дальнейшего роста и развития корней *P. sibirica*.

Растения-регенеранты (табл. 4, рис. 8) с хорошо развитыми корнями через 2 мес

культивирования пикировали в вазоны со стерильным почвенным субстратом. Частота приживаемости регенерантов *P. sibirica* в почвенной смеси, состоящей из дерновой почвы и вермикулита в соотношении 2:1, составила 60.3%.

Весь процесс от укоренения до адаптации растений-регенерантов в почвенном субстрате *P. sibirica*, т.е. до появления полностью сформированного растения, занимает 5–6 месяцев.



Рис. 8. *Phlox sibirica* в почвенном субстрате из дерновой почвы и вермикулита (2:1)

Заключение. Таким образом, подобрана схема стерилизации эксплантов флокса сибирского *P. sibirica* L. при введении в культуру *in vitro*. Получено максимальное число стерильной культуры – 86.7%, характеризовавшейся интенсивным ростом.

Растения-регенеранты *P. sibirica* развиваются посредством прямого органогенеза и каллусогенеза с последующей регенерацией микропобегов. Число образовавшихся микропобегов на всех испытанных вариантах среды было высоким и составляло от 6.1 до 17.5 штук на один эксплант.

Разработаны условия укоренения *in vitro* и адаптации *ex vitro* растений-регенерантов *P. sibirica*. Выявлена оптимальная для индукции и роста корней среда, содержащая ИМК в концентрации 0.5 мг/л, обеспечивающая высокий процент (88.6) укорененных побегов. Подобран питательный субстрат, состоящий из дерновой почвы и вермикулита для перевода растений-регенерантов *ex vitro* с частотой приживаемости 60%.

Литература

1. Красная книга Республики Башкортостан. Редкие и исчезающие виды высших сосудистых растений. Т. 1: Растения и грибы. Уфа: Медиа-Принт, 2011. 384 с.
2. Зарипова А.А. Клональное микроразмножение *Polemonium caeruleum* L. // Аграрная Россия. 2015. № 6. С. 2–7.
3. Зарипова А.А., Ахметова А.Ш., Мухаметвафина А.А. Биотехнология размножения видов рода *Iris* L. // Известия Уфимского научного центра РАН. 2015. № 4 (1). С. 56–59.
4. Зарипова А.А., Ахметова А.Ш., Мухаметвафина А.А. Изучение морфогенеза *Digitalis grandiflora*

Mill. в культуре *in vitro* // Аграрная Россия. 2015. № 1. С. 20–25.

5. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.

6. Калинин В.Ф., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. 488 с.

7. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.

8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15, № 13. P. 473–497.

9. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.

10. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного материала плодовых и ягодных растений: автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. М., 1998. 44 с.

References

1. Red Data Book of the Republic of Bashkortostan. Rare and endangered species of higher vascular plants. Vol. 1. Plants and fungi. Ufa, Media-Print, 2011. 384 p.
2. Zaripova A.A. Clonal micropropagation of *Polemonium caeruleum* L. *Agrarnaya Rossiya*, 2015, no. 6, pp. 2–7.
3. Zaripova A.A., Akhmetova A.Sh., Mukhametvafina A.A. Propagation biotechnology of *Iris* L species. *Izvestiya Ufimskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2015, no. 4 (1), pp. 56–59.
4. Zaripova A.A., Akhmetova A.Sh., Mukhametvafina A.A. Study of morphogenesis of *Digitalis grandiflora* Mill. *in vitro*. *Agrarnaya Rossiya*, 2015, no. 1, pp. 20–25.
5. Butenko R.G. Culture of isolated tissues and physiology of plant morphogenesis. Moscow, Nauka, 1964. 272 p.
6. Kalinin V.F., Sarnatskaya V.V., Polishchuk V.E. Methods of tissue culture in plant physiology and biochemistry. Kiev, Naukova dumka, 1980. 488 p.
7. Kataeva N.V., Butenko R.G. Clonal plant micropropagation. Moscow, Nauka, 1983. 96 p.
8. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 196, vol. 15, no. 13, pp. 473–497.
9. Butenko R.G. Biology of higher plant cells *in vitro* and biotechnology on their basis. Moscow, FBK-Press, 1999. 160 p.
10. Vysotsky V.A. Biotechnological methods in the production system of healthy fruit and berry plant material. Dr. Sci. Thesis in Agriculture. Moscow, 1998. 44 p.



**THE IMPACT OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION
ON PROPAGATION OF *PHLOX SIBIRICA* L. IN *IN VITRO* CULTURE**

© A.Sh. Akhmetova, A.A. Zaripova, A.I. Shigapova

South Ural Botanical Garden-Institute – Separate Structural Subdivision of the Federal State Budgetary
Scientific Institution Ufa Federal Research Centre of the RAS,
195/3, ulitsa Mendeleeva, 450080, Ufa, Russian Federation

The paper shows the possibility of effectively applying the method of tissue culture for the propagation of *Phlox sibirica* L. The optimum media for shoot formation and rhizogenesis were developed. It was experimentally found out that at cultivating the fragments of a sterile *P. sibirica* seedling on the Murashige and Skoog (MS) nutrient medium supplemented with growth regulators, the types of morphogenesis were as follows: callusogenesis and gemmogenesis associated with the activation of existing meristems and induction of the *de novo* gemma formation directly on the explant. Direct plant regeneration was observed during the cultivation of explants on the MS nutrient medium supplemented with BAP at a concentration of 0.35–0.5 mg/l. Moreover, regardless of the composition of the nutrient medium, the number of microshoots in all tested variants was high and ranged from 8.4 to 17.5 pieces per explant. The intensive callusogenesis and large amount of the callus tissue were observed mainly on the *P. sibirica* basal part. Callus formed within 1.5–2 months was differentiated, light green and of loose consistency. Also, the induction of *de novo* gemma formation was observed in the callus tissue. In the variant of kinetin 1.5 mg/l + NAA 1.0 mg/l, where the beginning of morphogenesis was accompanied by the process of callus formation, the number of microshoots formed in the callus tissue did not exceed 6.1 pieces per explant. The only exception was a case with BAP 2.5 mg/l + IAA 1.0 mg/l used in the nutrient medium as a stimulator of morphogenesis. Under these cultivation conditions, the maximum number of meristematic zones was formed in the callus tissue to trigger further development of morphologically normal microshoots (12.3). As a result of the experiments, it was determined that the nutrient medium containing BAP at a concentration of 0.4 mg/l was optimal for the formation of microshoots. Under these conditions, the maximum regeneration of shoots was observed with 17.5 pieces per explant after one passage. The shoots were rooted on the ½ MS medium supplemented with IBA at a concentration of 0.5 mg/l. The survival frequency of the regenerant plants under *ex vitro* conditions was 60.3%.

Key words: rare species, regeneration, *in vitro* culture, propagation, *Phlox sibirica*.