

УДК 581.143.6

ОСОБЕННОСТИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *Silene cretacea* (Caryophyllaceae) В КУЛЬТУРЕ *in vitro*

© 2016 г. Т. А. Крицкая*, А. С. Кашин**, В. А. Спивак, В. Е. Фирстов

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83

*E-mail: kriticakaiata@gmail.com

**E-mail: kashinas2@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.03.2016 г.

Окончательный вариант получен 20.05.2016 г.

Исследованы особенности формирования микропобегов в культуре *in vitro* *Silene cretacea* – исчезающего вида с узкой экологической амплитудой, являющегося перспективным источником получения лекарственного сырья. Показано, что на этапе микроразмножения наиболее эффективной является базовая среда Woody Plant Medium, содержащая витамины по прописи Мурасиге и Скуга и дополненная 0.2 мг/л 6-бензиламинопурина, 1.0 мг/л кинетина, 1.0 мг/л гибберелловой кислоты и 0.5 мг/л индоллил-3-уксусной кислоты. Сочетание и концентрации этих регуляторов роста, подобранные с помощью математического комбинаторного анализа, активировало пазушные почки и обеспечивало высокий коэффициент размножения (9.3 ± 1.3 микропобегов на эксплант). Морфогистологический анализ позволил выявить основные этапы формирования микропобегов и доказать отсутствие каллусогенеза на протяжении всего времени культивирования эксплантов. Представлены особенности динамики культуры в течение года непрерывного культивирования.

Ключевые слова: Caryophyllaceae, *Silene cretacea*, клональное микроразмножение, *in vitro*, ладейный многочлен, морфо-гистологический анализ

DOI: 10.7868/S0475145016060021

ВВЕДЕНИЕ

Silene cretacea Fisch. ex Spreng; 1825 (Caryophyllaceae) – эндемичный кальцефильный полукустарничек (Цвелев, 2004). Занесен в Красную книгу Российской Федерации (Девятков, 2008) и включен в Приложение I Бернской конвенции (Bilz et al., 2011). На территории Саратовской области единственная популяция вида обнаружена в 2008 году (Невский и др., 2009). До этого вид не отмечался в регионе более 150 лет. Учитывая низкую семенную продуктивность и малочисленность особей в обнаруженной популяции, наиболее целесообразным является использование метода клонального микроразмножения *in vitro* для массового получения посадочного материала данного вида с целью восстановления численности его популяций.

S. cretacea является перспективным источником веществ из класса фитоэкдистероидов, обладающих широким спектром физиологической активности, малой токсичностью и отсутствием гормонального действия по отношению к млекопитающим (Tuleuov et al., 2014). Доказано, что фитоэкдистероиды обладают противогрибковым, анаболическим, гипогликемическим, гепатопротекторным, тонизирующим действиями (Báthori et al., 2008).

При введении данного вида в культуру с перспективой использования в фармацевтических целях также единственным путем массового получения посадочного материала видится использование метода клонального микроразмножения.

В последнее время разработке биотехнологических подходов получения растительного материала видов *Caryophyllaceae* посвящено достаточно большое число работ (Cheng et al., 2008, и др.), главной целью которых в большинстве случаев было получение каллусной культуры. Однако предпочтительными инициальными структурами для клонального микроразмножения являются, как известно, меристематические ткани растений, так как они, в отличие от каллуса, остаются генетически стабильными в течение множественных субкультивирований (Бутенко, 1999). При культивировании растений с целью сохранения биологического разнообразия, а также с селекционными или производственными целями этот фактор является ключевым.

Культивированию *S. cretacea in vitro* с целью клонального микроразмножения посвящено не-

сколько статей. Для микроразмножения *S. cretacea* Е.М. Ветчинкина с соавт. (2012) использовали питательную среду Мурасиге и Скуга (MS; Murashige, Skoog, 1962) с уменьшенной вдвое концентрацией солей и добавлением 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) или 2-изопентиладенина (2-ип). О.И. Жолобовой (2012) показана возможность культивирования *S. cretacea* на полной питательной среде MS с БАП 0.5 мг/л. Однако при попытках культивирования *S. cretacea* на питательной среде предложенных этими авторами составов наблюдался лишь непрямо́й органогенез. При этом жизнеспособность эксплантов постепенно снижалась и к 3–4 пассажи́у превалировали процессы некроза, гипергидратации и остановки морфогенеза. Доля погибших эксплантов составляла 54–56% за один пассаж, а максимальный коэффициент размножения – не более 3. В шестом пасса́же культура полностью выпадала (Крицкая, Кашин, 2013). Эмпирический подбор вариантов среды MS с различными фитогормонами и их сочетаниями в парных или тройных комбинациях не дал желаемого результата (Крицкая и др., 2015).

Нами было продемонстрировано, что использование питательной среды по прописи Woody Plant Medium (WPM; McCown, Lloyd, 1981) увеличивает морфогенетический потенциал культуры *S. cretacea* по сравнению с MS и другими вариантами сред (до 7 микропобегов на эксплант), но формирование побегов при этом происходит путем непрямого органогенеза. Была выявлена оптимальная концентрация сахарозы (20 г/л) (Крицкая, Кашин, 2013). В последующем использовали именно среду WPM с данной концентрацией сахарозы.

Цель исследования состояла в повышении эффективности клонального микроразмножения *S. cretacea* путем прямо́го органогенеза за счет подбора состава питательной среды с использованием методов математического моделирования, выявлении морфогенетических особенностей формирования микропобегов и изучении динамики культуры в течение длительного субкультивирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили в 2012–2015 гг. с использованием общепринятых приемов работы с культурами тканей и органов растений (Бутенко, 1999).

В качестве базовой среды (БС) использовали питательную среду, содержащую макро- и микро-соли по прописи WPM (McCown, Lloyd, 1981), сахарозу (20 г/л), витамины и аминокислоты по прописи MS, агар-агар (Panreac, UK) 9 г/л, pH 5.9–6.1. Время автоклавирования составляло 20 минут при 121°C.

Эксплантировали сегменты побегов высотой 1.0–1.5 см с 2–3 узлами, полученные в результате культивирования зрелых семян *S. cretacea* на БС без фитогормонов. Сбор семян осуществляли из природной популяции, произрастающей в Саратовской области. Семена последовательно стерилизовали с использованием средства “Pril” (Henkel-ERA, Россия) в течение 30 мин, 70%-ного этанола в течение 3–5 мин, 1.25% раствора NaOCl (Электра, Россия). После чего семена пятикратно промывали стерильной дистиллированной водой и в условиях ламинарного бокса (Lamsystems, Россия) помещали на питательную среду.

Подбор регуляторов роста

На этапе подбора фитогормонов использовали БАП, кинетин (КН), гибберелловую кислоту (ГК) и индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) в концентрациях 0.2, 0.5, 1.0 мг/л. Фитогормоны вносили в питательную среду до автоклавирования. Для достижения желаемого результата использовали математический метод ладейного многочлена (Riordan, 2002). Была составлена четырехфакторная трехуровневая таблица, включающая четыре фитогормона (БАП, КН, ГК и ИУК) с тремя уровнями концентрации 0.2, 0.5, 1.0 мг/л (табл. 1), в границах которой посредством рандомизации на конфигурациях ладейных расстановок проводился поиск оптимального варианта сочетания фитогормонов для регенерации *S. cretacea*.

Среду разливали в химические сосуды объемом 100 мл по 20–40 мл в каждый. Культивировали по 5–6 эксплантов на сосуд при $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 16 часовом фотопериоде и освещении 2–3 тыс. люкс. Результаты анализировали на 21-е сутки культивирования. Контролем служила безгормональная БС. В качестве основных параметров культуры оценивали коэффициент размножения, длину побега и массу каллусоподобных тканей. Под коэффициентом размножения понимали количество микропобегов, регенерировавших за один пассаж, в пересчете на один эксплант.

Морфо-гистологический анализ

Материал отбирали каждые трое суток, фиксируя по 10 эксплантов в смеси формалина, ледяной уксусной кислоты и 50% этилового спирта в объемном соотношении 4 : 1 : 10 (ФУС) в течение 3 часов. Фиксированный материал переносили в раствор глицерин-спирт в соотношении 1 : 1. Подготовленные таким образом экспланты изучали под стереомикроскопом Stemi 2000-CS (Carl Zeiss, Germany). Анатомические срезы готовили при помощи ротационного микротомы согласно общепринятым методикам (Aesch et al., 2010a). В качестве контрольных образцов использовали интактные растения смолевки. Готовые препара-

Таблица 1. Морфогенетический ответ экплантов *S. setacea* на различные комбинации фитогормонов и их концентрации (мг/л). Таблица представлена в виде шахматной доски в соответствии с теорией латентных множителей (Rigdan, 2002). Полу жирным шрифтом выделена первая конфигурация латентных расстановок, обычным – повторная

	БАП 0.2			БАП 0.5			БАП 1.0		
	КН 0.2	КН 0.5	КН 1.0	КН 0.2	КН 0.5	КН 1.0	КН 0.2	КН 0.5	КН 1.0
ГК 1.0	ИУК 1.0	K 5.4 ± 1.0 L 15.9 ± 1.2 M 0.7 ± 0.1							
	ИУК 0.5		K 9.3 ± 1.3 L 17.5 ± 0.7 M 0.6 ± 0.1		<i>K 5.7 ± 0.5</i> <i>L 13.4 ± 0.7</i> <i>M 0.8 ± 0.1</i>				
	ИУК 0.2			<i>K 5.4 ± 0.5</i> <i>L 12.3 ± 0.9</i> <i>M 0.9 ± 0.1</i>	K 5.1 ± 0.8 L 15.5 ± 1.1 M 0.9 ± 0.1				
ГК 0.5	ИУК 1.0	K 5.7 ± 0.6 L 13.6 ± 0.8 M 0.6 ± 0.1	<i>K 5.6 ± 0.6</i> <i>L 14.7 ± 0.8</i> <i>M 0.7 ± 0.1</i>						
	ИУК 0.5	<i>K 5.4 ± 0.6</i> <i>L 15.7 ± 0.9</i> <i>M 0.7 ± 0.1</i>		K 5.1 ± 1.0 L 14.3 ± 1.2 M 0.7 ± 0.1					
	ИУК 0.2					<i>K 4.7 ± 0.4</i> <i>L 12.8 ± 1.2</i> <i>M 0.9 ± 0.1</i>			K 3.7 ± 0.7 L 10.3 ± 0.7 M 1.2 ± 0.2
ГК 0.2	ИУК 1.0						<i>K 3.3 ± 0.3</i> <i>L 9.9 ± 0.7</i> <i>M 1.0 ± 0.1</i>	K 3.3 ± 0.5 L 9.5 ± 0.8 M 1.1 ± 0.2	
	ИУК 0.5						K 3.8 ± 0.6 L 9.0 ± 0.6 M 1.2 ± 0.2	<i>K 3.0 ± 0.3</i> <i>L 9.1 ± 0.6</i> <i>M 1.1 ± 0.1</i>	
	ИУК 0.2								<i>K 2.9 ± 0.3</i> <i>L 8.8 ± 0.6</i> <i>M 1.3 ± 0.1</i>

Примечание. $p \leq 0.05$ для доверительных интервалов. *K* – коэффициент размножения, количество микропобегов на экплант; *L* – длина побега, мм; *M* – масса каллусо-подобных тканей, г. Показатели культуры снимали на 21 сутки культивирования.

Таблица 2. Результаты корреляционного анализа (коэффициент Пирсона r) между морфометрическими параметрами культуры и концентрацией фитогормонов

	Корреляция с концентрацией			
	БАП	КН	ГК	ИУК
Коэффициент размножения	-0.75853	0.280939	0.674253	0.030101
Длина побега	-0.88199	0.019938	0.88785	0.050433
Масса ткани каллусного типа	0.894427	0.255551	-0.55902	-0.3993

Примечание. $p \leq 0.05$. Каждый фитогормон взят в концентрациях 0.2, 0.5 и 1.0 мг/л.

ты сначала окрашивали гематоксилином по Гайденгайну (Aesch et al. 2010б), затем комбинированной окраской по Д. и Дж. Толивиа (Tolivia, Tolivia, 1987). Изучали препараты под микроскопом Axio Lab A1 (Carl Zeiss, Germany) и фотографировали с помощью фотокамеры (Canon Power Shot G11, Japan) с адаптером.

Статистическая обработка данных

Эксперименты выполнялись в трех повторностях, в каждой повторности отбирали не менее 30 эксплантов. Статистическую обработку данных проводили стандартными методами с использованием пакета программ Statistica for Windows, V.6 и Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Подбор регуляторов роста

Максимальные значения коэффициента размножения (9.3 ± 1.3 микропобегов на эксплант) и длины побега (17.5 ± 0.7 мм) наблюдали в варианте БАП 0.2 + КН 1.0 + ГК 1.0 + ИУК 0.5 мг/л (табл. 1). Изменение концентраций фитогормонов приводило к снижению органогенной активности и разрастанию каллусоподобных тканей. Выявлена сильная положительная корреляция между коэффициентом размножения и длиной побега ($r = 0.83$; $p \leq 0.05$) и отрицательная – между коэффициентом размножения, длиной побега, – с одной стороны, – и массой тканей каллусного типа, – с другой ($r = -0.78$ и $r = -0.81$ соответственно; $p \leq 0.05$) (табл. 2).

Так как основной задачей нашей работы было получение качественных и полноценных регенерантов *S. cretacea*, оптимальным вариантом был выбран БАП 0.2 + КН 1.0 + ГК 1.0 + ИУК 0.5 мг/л, который мы условно обозначили “SCS” (Крицкая и др., 2015).

Динамика культуры

В течение года непрерывного культивирования на среде SCS дважды наблюдали снижение коэффициента размножения: первый отрица-

тельный пик приходился на июль, второй охватывал период с октября по январь (рис. 1). Несмотря на постоянные условия культивирования (среда SCS, температура $+24 \pm 1^\circ\text{C}$, фотопериод 16/8) в указанные периоды происходило снижение коэффициента размножения с 11.9 ± 1.3 (в период активного роста) до 7.3 ± 0.7 микропобегов на эксплант. При выдерживании культуры *S. cretacea* с октября по январь включительно в условиях низких положительных температур ($+5 \pm 1^\circ\text{C}$) на безгормональной БС наблюдалась полная остановка ростовых процессов, т.е. отсутствие прироста побегов в длину. После четырехмесячного содержания при пониженной температуре и возвращения эксплантов в стандартные условия культивирования, рост возобновлялся в течение двух недель, коэффициент размножения повышался до 15.0 ± 1.4 микропобегов на эксплант. В случае дальнейшего культивирования эксплантов в условиях низкой положительной температуры период покоя можно было продлить до 6 месяцев без ущерба для растений. Более длительная экспозиция, например, в течение года, приводила к гибели около 50% эксплантов, остальные 50% теряли способность к морфогенезу. При перенесении эксплантов в условия пониженной температуры в фазу активного роста (например, с августа по октябрь) ростовые процессы замедлялись, но не останавливались полностью. Прирост за этот период составлял около 1/3 от начальной длины побега. Прекращался рост к середине октября.

Морфогенез

В течение первой недели культивирования на среде SCS наблюдали активацию ростовых процессов в узловой зоне эксплантов и развитие одной или двух почек в основании листьев (рис. 2а). На 10-е сутки наблюдали активный рост побегов II порядка и формирование 3–4-х почек в основании этих побегов между листом и стеблем. При этом отмечалось увеличение размера почек, расположенных в пазухах листовых примордиев, как в первом, так и во втором узле (рис. 2б). На 13-е сутки отмечен рост побегов III порядка и разрастание узловой зоны. На 16-е сутки сформированные к этому времени побеги можно было разделить на

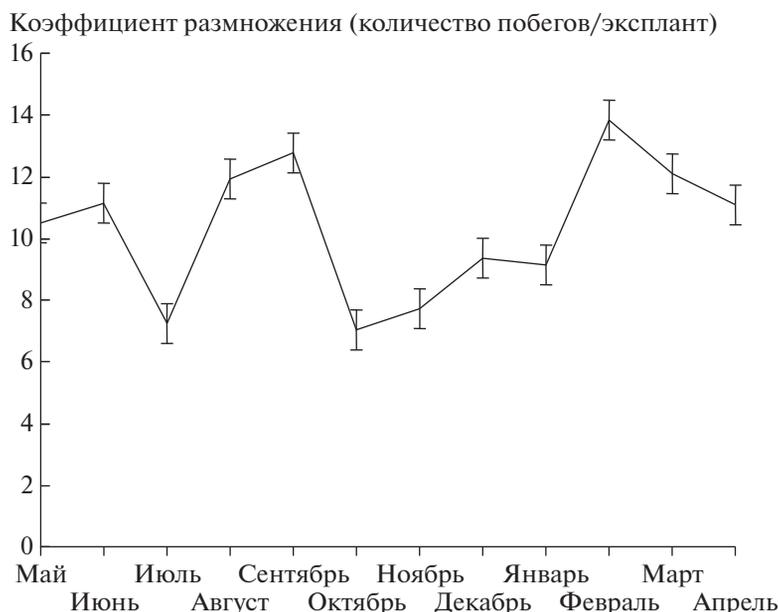


Рис. 1. Динамика культуры *S. cretacea* на среде SCS в течение года непрерывного субкультивирования.

две группы: одни формировали стебель типичного строения ($82.8 \pm 8.1\%$) (рис. 2в), другие ($17.2 \pm 1.3\%$) – фасциальную форму стебля, которая сохранялась на уровне побегов первого порядка, отходившие от нее микропобеги следующих порядков имели нормальное строение (рис. 2г). В узловой зоне экспланта на этот момент происходило активное разрастание клеток основной паренхимы, что приводило к разрыву эпидермы (рис. 2д). К концу третьей недели культивирования по мере увеличения размера микропобегов, разрастание клеток основной паренхимы в разрыве узловой зоны экспланта сопровождалось пролиферацией периферических групп клеток. На краях разрыва отмечено формирование множества почек, различающихся степенью развития (рис. 2е, 2ж). При пересадке на свежую питательную среду без фитогормонов, образованные таким образом апексы побегов продолжали развиваться. При этом количество микропобегов, полученных при повторном пассаже, составило 5.6 ± 0.4 шт. на вторичный эксплант. Таким образом, через три недели культивирования формировалось достаточное количество микропобегов, готовых к последующему этапу укоренения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования показали, что среда с минеральной основой WPM и органическими добавками по MS, дополненная БАП 0.2 + КН 1.0 + ГК 1.0 + ИУК 0.5 мг/л (SCS), оптимальна для микроразмножения *S. cretacea*. Она не приводит к сниже-

нию морфогенетического потенциала растительных тканей при непрерывном культивировании.

Применение методов комбинаторного анализа, в частности метода ладейного многочлена (Riordan, 2002), позволило нам сократить количество экспериментальных вариантов с 81 до 9 и выбрать из них оптимальный. Значения, разбросанные случайным образом по “шахматной доске”, образовали “гауссово пятно” с областью оптимума, в которую попала точка БАП 0.2 + КН 1.0 + ГК 1.0 + ИУК 0.5 мг/л, вокруг которой сгруппировались менее эффективные сходные значения, и область пессимума с вариантами, дополненными БАП 1.0 мг/л и ГК 0.2 мг/л. Выполнение перестановки конфигурации ладейного многочлена лишь подтвердило наши данные (табл. 1). Аналогичный этому подход (метод латинского квадрата) использовался ранее для оптимизации минерального состава питательной среды для культивирования *in vitro* апексов пшеницы (Спивак, 1994).

Полученные результаты можно полностью объяснить сформировавшимися представлениями о характере действия различных групп фитогормонов на растение. Известно, что морфогенетический ответ на воздействие экзогенных регуляторов роста обусловлен, в первую очередь, генотипом объекта, поэтому даже различные популяции одного вида могут по-разному реагировать на одинаковые условия (Митрофанова, 2011). Цитокинины (БАП, КН) обладают многофункциональностью действия на физиологические процессы у высших растений. Самыми типичными эффектами цитокининов в культуре *in vitro* являются подавление апикального домини-

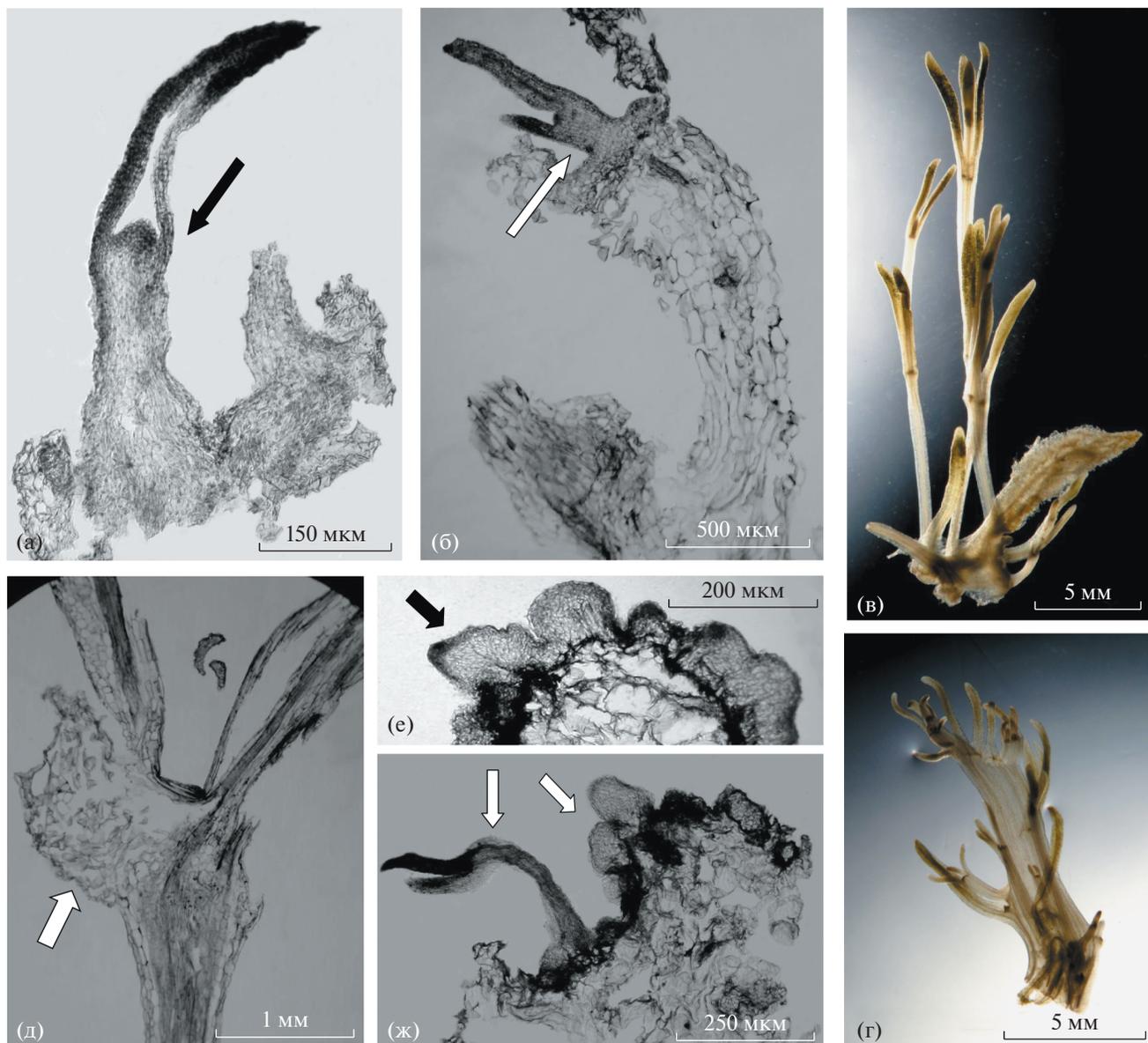


Рис. 2. Этапы морфогенеза *S. cretacea* на питательной среде SCS: а – развитие пазушных почек в узловой зоне (тангентальный срез узловой зоны на 7-е сутки культивирования); б – рост пазушных почек во втором узле экспланта на 10-е сутки культивирования (тангентальный срез периферической части стебля экспланта); в, г – регенерировавшие побеги нормального строения (в) и фасциация (г) на 16-е сутки культивирования (объекты сфотографированы в глицерин-спиртовом растворе); д – разрыв узловой зоны экспланта и выход паренхимных клеток из места разрыва (продольный срез стеблевой части экспланта на 16-е сутки культивирования); е, ж – образование почек на краевой части разрыва (продольный срез).

рования и стимуляция боковых почек, главным образом, за счет дифференциации сосудистой ткани между пазушными почками и проводящими пучками главного стебля (Van Staden et al., 2008). Отмечалось, что внесение в питательную среду нескольких цитокининов одновременно способствует повышению качества и количества регенерировавших побегов для некоторых культур (Yu et al., 2012). Основным свойством ГК является стимуляция деления и растяжения клеток. Однако в первую

очередь при действии ГК активируется деление клеток. За счет этого происходит увеличение коэффициента размножения и длины побега. ИУК в сочетании с ГК усиливает действие последнего (George et al., 2008). Кинетин совместно с ауксином (ИУК) принимает участие в процессах органогенеза у растений. В классической работе Скуга и Миллера (Skoog, Miller, 1957) на культуре недифференцированной ткани стеблевого каллуса табака было установлено, что для ризогенеза тре-

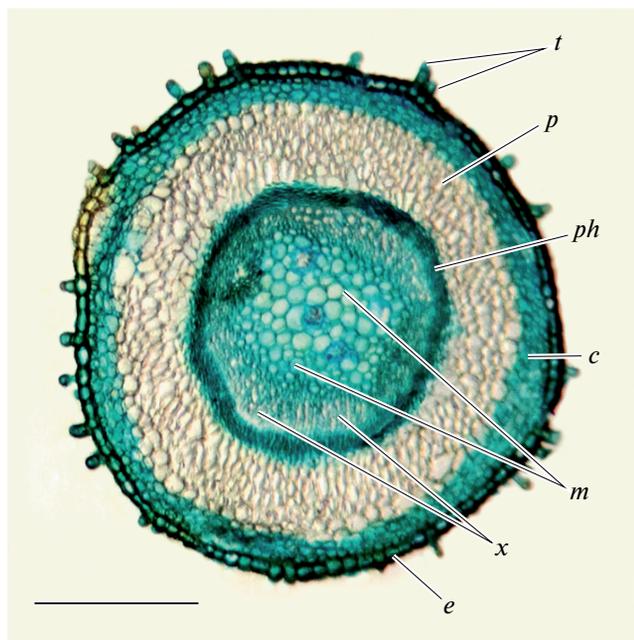


Рис. 3. Поперечный срез стебля интактного растения *S. cretacea*, окраска по Д. и Дж. Толивия (Tolivia, Tolivia, 1987): *c* – колленхима, *e* – эпидермис, *m* – центральный цилиндр, *p* – паренхима, *ph* – флоэма, *t* – трихомы, *x* – ксилема. Масштаб: 250 мкм.

бывалось присутствие 2 мг/л ИУК и 0.02 мг/л КН. Повышение концентрации КН до 0.5–1.0 мг/л, напротив, приводило к индукции формирования стеблевых почек. Одна ИУК (0.5–2.0 мг/л) вызывала лишь рост растяжением, равно как и один КН не оказывал видимого влияния на процесс дифференциации тканей и органов. В нашем исследовании наиболее эффективными концентрациями КН и ИУК оказались 1.0 и 0.5 мг/л соответственно. Однако, как показал корреляционный анализ, основную роль в формировании микропобегов *S. cretacea* играли концентрации БАП и ГК. Высокие концентрации БАП (0.5–1.0 мг/л) вызывали нарушения в развитии, рост каллуса и гипергидратацию экплантов, тогда как, низкие концентрации ГК (0.2–0.5 мг/л) были недостаточны для регуляции деления и растяжения тканей.

Отрицательные пики величины коэффициента размножения, наблюдавшиеся в эксперименте, по своей датировке соответствуют фенологическим фазам физиологического (летнего и зимнего) покоя растений-доноров *S. cretacea*, связанного с переживанием неблагоприятных периодов (Полевой, Саламатова, 1991). Известно, что период полного глубокого покоя в большинстве случаев непродолжителен. За ним непосредственно следует вынужденный покой, который вызывается только пониженной температурой (Libbert, 1993). Ранее в культуре *in vitro* диких орхидей уме-

ренных широт (Ponert et al., 2011) было отмечено снижение коэффициента размножения при клональном микроразмножении в середине лета и осенью, происходившее независимо от внешних факторов при наступлении соответствующих фенологических фаз. Таким образом, в соответствии с вышеизложенным, полная остановка роста экплантов *in vitro* происходила под воздействием и эндогенных (покой меристем), и экзогенных (низкая температура) факторов в совокупности. По отдельности эти факторы способствовали лишь замедлению ростовых процессов *S. cretacea* в культуре *in vitro*, но не полному их прекращению. Исходя из полученных результатов, в фенологические фазы глубокого покоя (с октября по январь) рекомендуется выдерживать культуру *S. cretacea* в условиях пониженных положительных температур. Не исключено, что в период летнего покоя будет достаточно выдерживать культуру на среде без фитогормонов. Последнее было подтверждено в работе Ю с соавт. (Yu et al., 2012) на культуре травянистого *Paeonia lactiflora*.

В нашей работе наблюдалось две волны морфогенеза у *S. cretacea*: в первые две недели культивирования происходила активация пазушных меристем и развитие из них боковых побегов, затем разрыв узловой зоны экплантов, и образование на третьей неделе почек и апексов побегов из клеток основной паренхимы, которую на этапе подбора регуляторов роста мы называли “каллусоподобная ткань”. Известно, что тотипотентность меристематических клеток, являющихся паренхимными по своей природе, реализуется в ходе их деления и дифференциации, тогда как тотипотентность специализированных клеток реализуется посредством дедифференциации с последующей новой дифференциацией (Zhuravlev, Omelko, 2008). Так как паренхимные клетки сравнительно мало дифференцированы, т.е. не специализированы морфологически и физиологически, и могут изменяться в течение онтогенеза или выполнять несколько различных функций одновременно, включая участие в заживлении ран и в процессах регенерации (Esau, 1997), формирование почек и апексов побегов, которые мы наблюдали на третьей неделе культивирования, не связано с процессами дедифференциации. Как следует из рис. 3, стебель *S. cretacea* имеет не пучковый тип строения, т.е. проводящая система представляет собой замкнутое кольцо, окруженное мощным слоем основной паренхимы и колленхимы. В узловой зоне проводящая система стебля соединяется с проводящей системой листа, и слои механической ткани выражены слабее, вероятно, поэтому разрыв наблюдается именно в этой области. Формирование аналогичных по морфологии структур отмечалось в работе Д.С. Кульхановой с соавторами (2015). Отличие состоит в расположении образованных *de novo* почек и апексов побегов по

всей поверхности экспланта, без привязки к поврежденным участкам, и их происхождении из эпителиальной ткани.

Плоская фасциация, наблюдаемая в нашем эксперименте, является следствием срастания верхушечного и пазушного апексов побегов или нескольких диаметрально противоположных, расположенных в одной плоскости пазушных апексов, как это происходит и при формировании побега с подобной аномалией *in situ* (Choob, Sinyushin, 2012). В дальнейшем, по мере роста таких фасциированных побегов *in vitro*, происходило их расчленение на самостоятельные, которые образовывали уже нормальные побеги, растущие одним верхушечным апексом. Последнее свидетельствует в пользу того, что наблюдаемое явление не связано с нарушениями в генетическом контроле развития и происходит в силу естественных физиологических причин, например, в результате давления на апексы интенсивно разрастающихся тканей узловой зоны.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности по заданию № 2014/203, код проекта 1287.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ветчинкина Е.М., Ширнина И.В., Ширнин С.Ю. и др. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* // Вестник Балтийского государственного университета им. И. Канта. 2012. Вып. 7. С. 109–118.
- Деятов А.Г. Смолёвка меловая — *Silene cretacea* Fisch. ex Spreng. // Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: "Товарищество научных изданий КМК", 2008. С. 172–173.
- Жолобова О.О. Сохранение редких и исчезающих видов растений в культуре *in vitro* и оценка уровня их внутривидового полиморфизма. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Белгород, 2012. 24 с.
- Крицкая Т.А., Блюднева Е.А., Кашин А.С. Питательная среда для микроразмножения кальцефильных растений в культуре *in vitro* (Патент РФ № 2552174 С1) // Бюлл. Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. 2015. № 16. 6 с.
- Крицкая Т.А., Кашин А.С. Использование метода культуры *in vitro* для сохранения некоторых редких и исчезающих кальцефильных видов растений Саратовской области // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13. Вып. 4. С. 65–73.
- Кульханова Д.С., Эрст А.А., Новикова Т.И. Регенерация эндемичного вида *Fritillaria sonnikovae* из луковичных чешуй в культуре *in vitro* // Онтогенез. 2015. Т. 46. № 4. С. 259–266.
- Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. Киев: Аграрна наука, 2011. 344 с.
- Невский С.А., Давиденко О.Н., Березуцкий М.А. и др. О находке смолёвки меловой (*Silene cretacea* Fisch. ex Spreng., Caryophyllaceae) в Саратовской области // Поволжский экологический журнал. 2009. № 2. С. 170–172.
- Полевой В.В., Саламатова Т.С., Физиология роста и развития растений. Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1991. 240 с.
- Спивак В.А. Морфогенетическая изменчивость верхушечной почки побега пшеницы и ее зависимость от светового фактора в культуре *in vitro*: Автореф. дис...канд. биол. наук. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова, 1994. 24 с.
- Цвелев Н.Н. Род Смолёвка — *Silene* L. // Флора Восточной Европы. Т. 11: Покрытосеменные. М; СПб: Товарищество научных изданий КМК, 2004. С. 233–247.
- Aescht E., Büchl-Zimmermann S., Burmester A. et al. Färbungen // Romeis — Mikroskopische Technik / Eds Mulisch M., Welsch U. Springer Spektrum, 2010a. P. 181–297. doi 10.1007/978-3-8274-2254-5
- Aescht E., Büchl-Zimmermann S., Burmester A. et al. Präparationstechniken und Färbungen von Pflanzengewebe für die Lichtmikroskopie // Romeis — Mikroskopische Technik / Eds M. Mulisch, U. Welsch. Springer Spektrum, 2010b. P. 317–338. doi 10.1007/978-3-8274-2254-5
- Báthori M., Tóth N., Hunyadi A. et al. Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids — structure and effects on humans // Curr. Medicinal Chem. 2008. V. 15. № 1. P. 75–91. doi 10.2174/092986708783330674
- Bilz M., Kell S.P., Maxted N. et al. European Red List of Vascular Plants. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2011. 134 p.
- Cheng D.M., Yousef G.G., Grace M.H. et al. In vitro production of metabolism-enhancing phytoecdysteroids from *Ajuga turkestanica* // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2008. V. 93. № 1. P. 73–83. doi 10.1007/s11240-008-9345-5
- Choob V.V., Sinyushin A.A. Flower and shoot fasciation: From phenomenology to the construction of models of apical meristem transformations // Russ. J. Plant Physiol. 2012. V. 59. № 4. P. 530–545. doi 10.1134/S1021443712040048
- Esau K. Anatomy of Seed Plants, edn 2. New York: John Wiley and Sons, 1997. 576 p.
- George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J. (2008) Plant Growth Regulators III: Gibberellins, Ethylene, Abscisic Acid, their Analogues and Inhibitors; Miscellaneous Compounds // Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1: The Background. 3rd edn / Eds George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. P. 227–281. doi 10.1007/978-1-4020-5005-3_7
- Libbert E. Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, 5th edn. Jena: Gustav Fisher Verlag, 1993. 434 p.
- McCown B.H., Lloyd G. Woody plant medium (WPM) — a revised mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species // Hort. Sci. 1981. V. 16. P. 453.
- 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.
- Ponert J., Vosolsobě S., Kmečová K. et al. European orchid cultivation — from seed to mature plant // Eur. J. Environ. Sci. 2011. V. 1. № 2. P. 95–107.

- Riordan J. An Introduction to Combinatorial Analysis. Mineola, New York: Dover Publications, 2002. 256 p.
- Skoog F., Miller C.O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro // Symp. Soc. Exp. Biol. 1957. V. 11. P. 118–131.
- Tolivia D., Tolivia J. Fasga: a new polychromatic method for simultaneous and differential staining of plant tissues // J. Microsc. 1987. V. 148. № 1. P. 113–117. doi 10.1111/j.1365-2818.1987.tb02859.x
- Tuleuov B.I., Turdybekov K.M., Khabdolda G. et al. Structure and Stereochemistry of Phytoecdysone from *Silene cretacea* Fisch. // Russ. J. Gen. Chem. 2014. V. 84. № 4. P. 704–707. doi 10.1134/S1070363214040173
- Van Staden J., Zazimalova E., George E.F. Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists // Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1. The Background. 3rd edn / Eds George E.F., Hall M.A., De Klerk G.J. Dordrecht: Springer Netherlands, 2008. P. 205–226. doi 10.1007/978-1-4020-5005-3_6
- Yu X., Wu H., Teixeira da Silva J.A. et al. Multiple shoot induction and rooting of *Paeonia lactiflora* 'Da Fu Gui' // Afr. J. Biotechnol. 2012. V. 11. № 41. P. 9776–9781.
- Zhuravlev Yu.N., Omelko A.M. Plant morphogenesis in vitro // Russ. J. Plant. Physiol. 2008. V. 55. № 5. P. 579–596. doi 10.1134/S1021443708050014

Features of Clonal Micropropagation of *Silene cretacea* (Caryophyllaceae) in *in vitro* Culture

T. A. Kritskay*, A. S. Kashin**, V. A. Spivak, and V. E. Firstov

Chernyshevsky Saratov State University, Saratov, 410012 Russia

*e-mail: kritckaiata@gmail.com

**e-mail: kashinas2@yandex.ru

Received March 21, 2016, in final form, May, 20, 2016

The features of the formation of microshoots in *in vitro* culture of *Silene cretacea*—endangered species with narrow ecological amplitude, which is a promising source of medicinal raw materials—were studied. It was demonstrated that, at the micropropagation step, basic Woody Plant Medium containing vitamins according to Murashige and Skoog and supplemented with 0.2 mg/L 6-benzylaminopurine, 1.0 mg/L kinetin, 1.0 mg/L gibberellic acid, and 0.5 mg/L indole-3-acetic acid is the most effective. The combination and concentration of these growth regulators, selected using mathematical combinatorial analysis, activated axillary buds and provided a high multiplication factor (9.3 ± 1.3 microshoots per explant). Morpho-histological analysis revealed the main stages of the formation of microshoots and proved the absence of callus formation during the whole time of the cultivation of explants. The features of the dynamics of the culture during the year of continuous cultivation are presented.

Keywords: *Caryophyllaceae*, *Silene cretacea*, clonal micropropagation, *in vitro*, rook polynomial, morpho-histological analysis