

**А. А. НЕРСЕСЯН, Е. Н. ЩЕРБАКОВА,
Н. Г. МЕЛКОНЯН, А. Г. ДАНИЕЛЯН**

**EX SITU СОХРАНЕНИЕ ВИДОВ *CENTAUREA
ERIVANENSIS* (ASTERACEAE), *CERCIS
GRIFFITHII* (CAESALPINIACEAE) И *GYPSOPHILA
TAKHTADZHANII* (CARYOPHYLLACEAE)
МЕТОДОМ КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ**

Разработаны условия клонального микроразмножения редких видов флоры Армении *Centaurea erivanensis* (Asteraceae), *Cercis griffithii* (Caesalpiniaceae), *Gypsophila takhtadzhanii* (Caryophyllaceae).

Клональное микроразмножение, редкие виды, флора Армении, сохранение ex situ

Nersesyan A. A., Shcherbakova Ye. N., Melkonyan N. G., Danielyan A. H. *Ex situ* conservation of *Centaurea erivanensis* (Asteraceae), *Cercis griffithii* (Caesalpiniaceae) and *Gypsophila takhtadzhanii* (Caryophyllaceae) by the method of clonal micropropagation. Appropriate conditions for clonal micropropagation of the following rare species of Armenian flora have been elaborated: *Centaurea erivanensis* (Asteraceae), *Cercis griffithii* (Caesalpiniaceae), *Gypsophila takhtadzhanii* (Caryophyllaceae).

Clonal micropropagation, rare species, Armenian flora, ex situ conservation

Ներսեսյան Ա. Ա., Շչերբակովա Ե. Ն., Մելքոնյան Ն. Գ., Դանիելյան Ա. Հ. *Centaurea erivanensis* (Asteraceae), *Cercis griffithii* (Caesalpiniaceae), *Gypsophila takhtadzhanii* (Caryophyllaceae) տեսակների ex situ պահպանությունը կլոնալ միկրոբազմացման մեթոդի կիրառմամբ: Մշակվել են Հայաստանի հետևյալ հազվագյուտ տեսակների՝ *Centaurea erivanensis* (Asteraceae), *Cercis griffithii* (Caesalpiniaceae), *Gypsophila takhtadzhanii* (Caryophyllaceae) կլոնալ միկրոբազմացման պայմանները:

Կլոնալ միկրոբազմացում, հազվագյուտ տեսակներ, Հայաստանի ֆլորա, ex situ պահպանություն

Культивирование растительных тканей *in vitro* является эффективным методом для сохранения и воспроизводства генофонда редких и исчезающих видов флоры (Вечернина, 2004; Белокурова и др., 2005; Доан и др., 2012; Жолобова и др., 2012; Молканова и др., 2005; Хеншоу, О'Хара, 1987).

Целью наших исследований явилось введение в изолированную культуру и разработка условий клонального микроразмножения трех редких видов флоры Армении: *Centaurea erivanensis* (Lipsky) Bordz. (Asteraceae), *Cercis griffithii* Boiss. (Caesalpiniaceae), *Gypsophila takhtadzhanii* Schischk. ex Ikonn. (Caryophyllaceae).

Вид *Centaurea erivanensis* включен в Красную Книгу Растений Армении (Tamanyan et al., 2010) под

категорией VU. Этот многолетник произрастает на сухих склонах в Ереванском флористическом районе. Общий ареал вида ограничен Ю Закавказьем, Вост. Анатолией и Сев.-Зап. Ираном.

Вид *Cercis griffithii* включен в Красную Книгу Растений Армении (Tamanyan et al., 2010) под категорией CR. Это красиво цветущее дерево в Армении встречается только в Мегринском флористическом районе. Общий ареал вида ограничен В и Ю Закавказьем, Центр. Азией и Ираном.

Вид *Gypsophila takhtadzhanii* в Красной Книге Растений Армении (Tamanyan et al., 2010) имеет статус DD и нуждается в дополнительных исследованиях. Этот многолетник является локальным эндемиком Армении и произрастает только на известковых скалах в Дарелегисском флористическом районе.

Материал и методика

Материалом для работы послужили сборы зеленых частей и семян исследуемых видов из Ереванского (*Centaurea erivanensis*), Мегринского (*Cercis griffithii*) и Дарелегисского (*Gypsophila takhtadzhanii*) флористических районов Армении, а также из живой коллекции Центра Сохранения Биоразнообразия Армении Института ботаники им. А. Тахтаджяна НАН РА. Ваучеры из исследованных популяций хранятся в гербарии Института ботаники (ERE).

При введении в изолированную культуру эксплантатами служили верхушечная меристема и пазушные почки растений *C. griffithii* и *G. takhtadzhanii*, а также стерильные проростки *C. erivanensis*. Работа проводилась по всем этапам клонального микроразмножения: получение изолированных культур, индукция морфогенеза из верхушечной и пазушной меристем, выращивание пробирочных растений и их микроразмножение (Белокурова и др., 2005; Доан и др., 2012; Молканова и др., 2005; Хеншоу, О'Хара, 1987).

Молодые побеги *C. griffithii* и *G. takhtadzhanii* с верхушечной меристемой и пазушными почками стерилизовались 0,1 % раствором диазида, промывались в 4 порциях стерильной воды и помещались на питательные среды по прописи Мурасиге и Скуга (МС) (Muraschige, Skoog, 1962). Семена *C. erivanensis* стерилизовались 2,5 % раствором гипохлорида натрия, отмывались в 4 порциях стерильной воды и высаживались на минеральную среду для проращивания. Полученные стерильные проростки переносились на питательные среды МС. В зависимости от поставленной задачи и условий опыта в питательные среды добавлялись витамины (тиамин, пиридоксин, никотиновая кислота) и гормональные соединения в различных концентрациях и сочетаниях: бензиламинопурин

(БАП) – 0,2-2 мг/л; кинетин – 0,2-1 мг/л; индол-3-уксусная кислота (ИУК) – 0,5-2 мг/л; нафтилуксусная кислота (НУК) – 0,5-1 мг/л; индолилмасляная кислота (ИМК) – 0,5-1 мг/л.

Колбы с эксплантами, а в дальнейшем и полученные мериклоны содержались в климатической камере с фотопериодом 16/8 часов и температурой 22°/18°. Рост мериклонов поддерживался периодическим пасированием на свежую питательную среду.

Результаты исследований и обсуждение

***Centaurea erivanensis*.** После прорастания семян у проростков отрезался зародышевый корень, а верхняя часть переносилась на питательную среду МС. Если в питательной среде содержание БАП было 1 мг/л в сочетании с 0,5 мг/л ИУК, то происходил рост верхушки побега и одновременно образовывались многочисленные пазушные укороченные побеги, из-за чего растение приобретало вид “шарика” или “ежика” (Рис. 1). Эти пазушные побеги можно отделить друг от друга, пересадить на свежую питательную среду и весь цикл микроразмножения повторится. При концентрации БАП в среде 2 мг/л наблюдалось явление витрификации – растения приобретали оводненный вид и в дальнейшем не росли. Если в питательной среде заменить БАП на кинетин в концентрации 1 мг/л, то растения *C. erivanensis* вытягиваются до 5-6 см с несколькими узлами. Иногда на них образуются 1-3 пазушных побега. Такие растения можно или расчеренковать для микроразмножения, или перенести на другую питательную среду для корнеобразования. Оказалось, что для индукции и роста корней у черенков *C. erivanensis* необходимо снизить концентрацию минеральных солей и витаминов в питательной среде в 2 раза и добавить только ауксин – ИУК или ИМК в концентрации 1 мг/л (Рис. 2). Окоренившиеся растения можно переносить в субстрат.

***Cercis griffithii*.** Весной, в период активного роста растений, отбирались молодые побеги и после стерилизации экспланты высаживались на питательные среды с различным набором витаминов и гормональных соединений. На питательной среде, содержащей по 0,5 мг/л тиамина, пиридоксина и никотиновой кислоты, 2 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК начинался рост как верхушечной, так и пазушной меристем. А основание черенка разрасталось, образовав твердый каллус, и из него вырастали немногочисленные адвентивные побеги (Рис. 3). Эти побеги отделялись от каллуса, разрезались на черенки с одним или двумя узлами и переносились на ту же питательную среду для индукции роста пазушных почек. За 2 месяца роста растения достигали 10 см высоты и имели по 7-10 узлов.

Такие растения можно вновь расчеренковать и весь цикл микроразмножения повторится. Если же черенки посадить на питательную среду, содержащую 0,2 мг/л кинетина и 2 мг/л ИУК, то в наросте в основании черенка каллусе образуется пучок корней (Рис. 4). Эти растения можно высаживать в субстрат.

***Gypsophila takhtadzhanii*.** После поверхностной стерилизации черенки растений, содержащие верхушку побега и 2-3 пазушные почки, высаживались на различные питательные среды. На среде, содержащей 1 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК, уже через 20 дней наблюдалось развитие как верхушечной, так и пазушных меристем. А в основании побега нарастал рыхлый каллус, из которого образовывались 3-4 адвентивных побега (рис.5)

Наличие кинетина в питательной среде в концентрации 1 мг/л вместо БАП также способствовало развитию пазушных побегов. При этом образования каллуса в основании черенка не происходило. В дальнейшем для микроразмножения боковые побеги отделялись, черенковались и переносились на свежую питательную среду, и весь цикл повторялся. При содержании в питательной среде БАП в количестве 2 мг/л в сочетании с 0,5 мг/л ИУК также шло развитие верхушечной и пазушных меристем. Однако в большинстве случаев отмечалось наличие витрифицированных растений. Если концентрация БАП или кинетина в питательной среде снижена до 0,2-0,5 мг/л, то в сочетании как с 0,5 мг/л ИУК, так и с 0,5 мг/л НУК в основании черенков уже через 20-25 дней начиналось образование корней, которые росли, в основном, по поверхности агара (рис.6). Образовавшиеся корешки были очень тонкие, нежные, сильно опушенные. При попытке извлечь растение из агара для пересадки в субстрат корешки легко обрывались. В таких случаях рекомендуется использовать жидкие питательные среды с мостиками из фильтровальной бумаги. Черенки помещаются на мостик, и после того, как растение подрастет и образует корни, его можно переносить в субстрат вместе с фильтровальным мостиком, не повреждая при этом корней (рис.7).

Выводы

В результате разработки условий клонального микроразмножения трех редких видов флоры Армении выявлены следующие особенности:

1. Оптимальными добавками в питательную среду для микроклонального размножения и последующего укоренения проростков *C. erivanensis* являются 1 мг/л БАП в сочетании с 0,5 мг/л ИУК и кинетин в концентрации 1 мг/л в сочетании с 0,5 мг/л ИУК. Следует избегать более высоких кон-

- центратий БАП во избежание витрификации. Для индукции корнеобразования необходимо снизить концентрацию минеральных солей в 2 раза и добавить ИУК или ИМК в количестве 1 мг/л.
- Для микроклонального размножения эксплантов *C. griffithii* разработана следующая комбинация добавок: 0,5 мг/л тиамин, 0,5 мг/л пиридоксин, 0,5 мг/л никотиновой кислоты, 2 мг/л БАП и 0,5 мг/л ИУК. Для укоренения рекомендуется использовать 0,2 мг/л кинетин и 2 мг/л ИУК.
 - Микроклональное размножение эксплантов *G. takhtadzanii* успешно происходит на среде, содержащей по 1 мг/л БАП или кинетин и 0,5 мг/л ИУК. Более высоких концентраций БАП следует избегать во избежание витрификации. Для корнеобразования наилучшие результаты получены при использовании 0,2-0,5 мг/л БАП или кинетин в сочетании с 0,5 мг/л ИУК или ИУК. Для переноса в субстрат рекомендуется выращивать мериклоны на мостиках из фильтровальной бумаги.
- зающих видов растений // Известия ТСХА, 5: 48-52.
- Молканова О. И., Стахеева Т. С., Василева О. Г., Коноватова Л. Н., Сучкова Н. К. 2005. Использование биотехнологических методов для размножения и сохранения редких и ценных видов растений // Ботанические сады как центры сохранения биоразнообразия и рационального использования растительных ресурсов. Матер. Междунар. конф. М. 354-356.
- Хеншоу Г. Г., О'Хара Дж. Ф. 1987. Методы *in vitro* для сохранения и использования мирового генофонда растений // Биотехнология сельскохозяйственных растений: 205-224. Москва.
- Muraschige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plantarum*, 15, 13: 473-497.
- Tamanyan K., Fayvush G., Nanagulyan S., Danielyan T. (eds.) 2010. The Red Book of Plants of the Republic of Armenia. Higher plants and fungi (Second edition). Yerevan: 592 p.

Исследованные экземпляры

***Centaurea erivanensis*:** Armenia, Kotayk Marz, surroundings of Vokhchaberd village, dry slopes, 1250-1290 m a.s.l., N40°09', E 44°37', 07. 2018, A. Nersesyan, ERE 196135; surroundings of Vokhchaberd village, dry slopes, 1250 m a.s.l., N40°09', E 44°37', 12. 07. 2019 A. Nersesyan, N. Melqonyan, A. Danielyan, ERE 196136.

***Cercis griffithii*:** Armenia, Sjunik Marz, near Nrnadzor village, dry and grassy slopes, 560 m a.s.l., N38°55', E 46°28', 14.06 2019, A. Nersesyan, N. Melqonyan, A. Danielyan, ERE 196137; Armenia, Yerevan, Living collection of the Center of biodiversity conservation of the A. Takhtajyan Institute of Botany, 25.03.2019, Y. Shcherbakova, ERE 196138.

***Gypsophila takhtadzanii*:** Armenia, Vayots Dzor Marz, road from Agarakadzor village to Gnishik village, loamy rocks, 19.06.2019, A. Nersesyan, N. Melqonyan, A. Danielyan, ERE 196139; Armenia, Vayots Dzor Marz, road to Gnishik village, loamy rocks, 18.07.2019, A. Nersesyan, N. Melqonyan, A. Danielyan, ERE 196140

ЛИТЕРАТУРА

- Белокурова В. Б., Литвак Е. В., Майстров П. Д., Сикюра Й. Й., Глеба Ю. Ю., Кучук Н. В. 2005. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры // Цитология и генетика, 1: 41-51.
- Доан Т. Т., Калашникова Е. А., Молканова О. И. 2012. Клональное микроразмножение редких и исчезающих видов растений // Известия ТСХА, 5: 48-52.

Работа выполнена в рамках проекта 18T-1F173 “Հայաստանի ֆլորայի որոշ վտանգված տեսակների ex situ պահպանությունը միկրոբազմացման և սերմերի հավաքածուների ստեղծման եղանակներով” (Ex Situ Conservation of Certain Endangered Plant Species of Armenian Flora through Micropropagation and Seed Banking) при финансировании Государственного Комитета по Науке РА.

Institute of Botany after A. Takhtajyan NAS RA
0040, Yerevan, Acharyan, 1
annersesyan1@gmail.com



Рис.1. Образование мериклонов *Centaurea erivanensis*



Рис.2. Корнеобразование у *Centaurea erivanensis*



Рис.5. Адвентивные побеги *Gypsophila takhtadzhanii*



Рис. 3. Изолированная культура *Cercis griffithii*

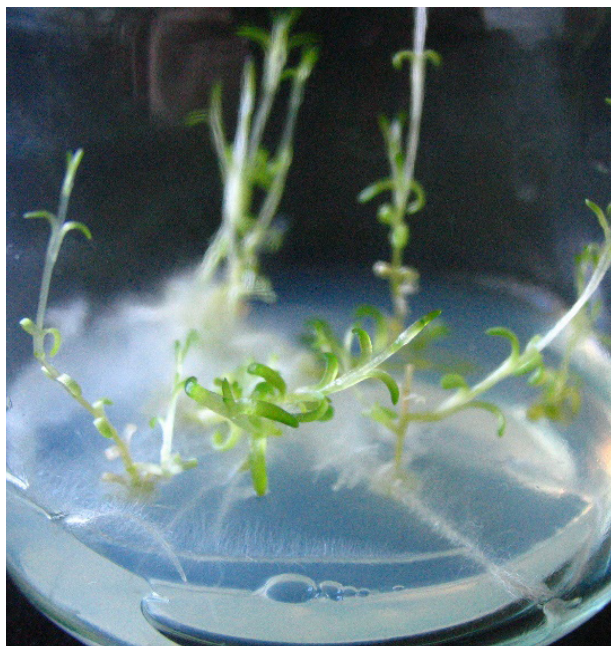


Рис.6. Образование корней у *Gypsophila takhtadzhanii*



Рис.4. Корнеобразование у *Cercis griffithii*



Рис.7. Растение *Gypsophila takhtadzhanii* готовое к пересадке в почву