

**КРИНИЦЫНА А.А., УСПЕНСКАЯ М.С., МУРАШЕВ В.В.**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Россия,  
119991, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 12, e-mail: vvtur@hotmail.ru*

### **ТЕХНОЛОГИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ СОРТОВ *PAEONIA SUFFRUTICOSA* ANDREWS. СЕЛЕКЦИИ БОТСАДА МГУ**

В Россию древовидные пионы попали только в 1863 году, в течение 80 лет их выращивали в горшечной культуре в холодных оранжереях ботанического сада БИН РАН (Санкт-Петербург) и только с 1939 года были предприняты попытки их возделывания в открытом грунте. В ботаническом саду Московского университета на проспекте Мира с 1951 года А.А. Сосновец стала заниматься интродукцией и селекцией древовидных пионов, а с 1981 года эта работа была продолжена М.С. Успенской на основной территории сада на Воробьевых горах.

В мире сегодня зарегистрировано около 500 сортов древовидных пионов, из них 30 выведено в Ботаническом саду МГУ. Основным направлением селекционных работ у нас является привлечение при создании новых сортов диких видов, более устойчивых к холоду, засухе и болезням, вызываемыми фитопатогенными грибами (Успенская, 2007).

Массовому внедрению древовидных пионов в озеленение препятствуют медленное прорастание семян (как правило, семена прорастают на второй или третий год) и очень медленный рост сеянцев в первые годы жизни. Древовидные пионы, в отличие от травянистых, значительно сложнее размножаются вегетативным путем. Известны такие способы, как: 1) деление куста (при умелом делении можно получить максимум 3–4 деленки); 2) прививка на корни травянистых пионов. При размножении прививкой требуется большое количество корней травянистых пионов. В связи с этим необходимо иметь коллекцию травянистых пионов. С одного куста можно в первый год получить 9–10 прививок, которые дают хорошую корневую систему только на третий или четвертый год, после чего могут поступать для реализации; 3) метод микроклонального размножения в стерильных условиях, что значительно облегчает процедуру размножения и позволяет на выходе получать достаточное количество генетически однородного материала. В настоящее время разработаны схемы микроклонального размножения древовидного пиона многих сортов европейского и китайского происхождения (Veruto, Cuirig, 2007). Однако оказалось, что для каждого нового сорта этой культуры необходимо уточнять и подбирать свои оптимальные условия размножения в культуре *in vitro*.

В настоящее время не существует единой классификации методов микроклонального размножения растений. Многие исследователи в зависимости от морфогенетических процессов выделяли от трех до шести методов (Катаева, Бутенко, 1983; Носов, 1991). Выбор метода размножения зависит от доступности того или другого вида растительного материала: семян, почек

или частей растений, не имеющих меристематических тканей. Однако если целью работы является сохранение генофонда, то следует избегать методов, при которых размножение растений идет через формирование каллуса, поскольку при этом наблюдается самоклональная изменчивость получаемых растений.

С конца 80-х годов на базе лаборатории биологии развития растений кафедры высших растений биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова проводятся исследования по изучению морфогенеза в культуре растительных клеток, тканей и органов *in vitro*, травянистых и древесных представителей различных таксономических групп. Разработанные нами методики микроклонального размножения позволяют получать в короткие сроки оздоровленный посадочный материал редких и ценных генотипов растений для реинтродукции в природные места распространения, а так же для использования в озеленении населенных пунктов.

Целью нашей работы являлось разработка метода размножения в культуре *in vitro* древовидных пионов некоторых сортов селекции ботанического сада МГУ им. М.В. Ломоносова. Для этого были поставлены следующие задачи: изучить регенерационные способности почек в зависимости от их местоположения на побеге и времени взятия материала, подобрать оптимальное сочетание гормональных добавок для нормальной регенерации с последующим укоренением полученных растений.

Для микроклонального размножения пиона древовидного нами был использован самый распространенный метод — активизация деятельности пазушных меристем. При этом процесс размножения *in vitro* различных сортов пионов имеет ту же последовательность операций, что и у остальных культур: введение в стерильную культуру, индукция морфогенеза, размножение, укоренение и адаптация полученных растений к условиям *in vivo*.

В качестве эксплантов использовали апикальные и боковые почки с одревесневших 4–5-летних побегов сортов “Владимир Новиков”, “Коралл”, “Куинджи” и “Николай Вавилов”. Побег с почками отделяли от растений в самом начале периода вегетации, во время активного цветения растений, плодоношения и после полного опадания листьев и во время полного физиологического покоя.

Срезанные с куста побеги с почками предварительно тщательно промывали в проточной воде хозяйственным мылом. Стерилизацию отделенных почек проводили путем погружения в 30% раствор гипохлорита натрия на 15 минут, далее в 10% раствор перекиси водорода в 70% спирте, где инкубировали 20 секунд, а затем промывали трижды по 10 минут стерильной дистиллированной водой. Очищенные от чешуй зачаточные побеги высаживали в ламинаре на агаризированную (6 г/л) стерильную (автоклавируемую) среду (pH=6) для индукции морфогенеза WPM (Woody Plant Medium [Owen, Miller, 1992]) с удвоенной концентрацией солей кальция и добавлением 50 мг/л лимонной кислоты, 100 мг/л аскорбиновой кислоты, 1 мг/л 6-бензи-

ламинопурина (БАП) и 0,2 мг/л 3-индолил-уксусной (ИУК) или 4-[3-индолил]-масляной (ИМК) кислот. Пересадка на свежую среду того же состава культивируемых эксплантов производилась каждые 3 недели. При появлении черного экссудата в питательной среде первое пересаживание эксплантов производили через сутки.

Отделение развившихся из аксиллярных почек побегов — первичных регенерантов осуществляли при формировании ими 2–4 полностью развившихся листьев (через 30–40 дней). Размер отделяемых побегов составлял 0,5–1 см. Первичные регенеранты отсаживали по 3 в один стакан и культивировали на среде для индукции морфогенеза с соответствующими гормональными добавками до разворачивания 3–5 листьев — от 2 до 5 недель. Обновление среды проводили каждые 3 недели. На протяжении всего этого срока обеспечивали условия необходимые для нормального роста и развития культиваров: температура  $21 \pm 2$  °С, освещенность 7000 люкс, фотопериод 16 ч день, 8 ч ночь.

Укоренение полученных черенков с 3–4 нормально развитыми листьями, проводили в два этапа. Сначала осуществляли индукцию корнеобразования, после чего в течение довольно длительного времени проходило непосредственно формирование и развитие корней. Для индукции корнеобразования использовали модифицированную питательную среду WPM с уменьшенной в 2 раза концентрацией макросолей с добавлением ИМК в концентрации 1 мг/л, 2 мг/л и 4 мг/л и 4% сахарозой. Стаканы с укореняемыми черенками на 14 дней помещали в темноту при температуре 18 °С. Рост и развитие корней протекал на среде WPM без гормональных добавок и с добавлением 0,3% активированного угля и 3% ахарозы. Во время культивирования поддерживалась пониженная интенсивность освещения (4000–5000 люкс) и температура 18 °С. При этом развитие корней начиналось через 5–12 недель.

Перед переводом растений на почвенную смесь корневую систему предварительно освобождали от агаризованной среды. Нами было предложено в качестве субстрата использовать смесь: 50% торф, 25% кварцевого стерильного песка, 25% стерильного керамзита. В качестве комплексного удобрения использовали раствор макро- и микросолей для среды WPM. Кварцевый песок стерилизовали сухим жаром в течение 2-х часов при 130 °С, керамзит промывали в проточной воде и стерилизовали кипячением в дистиллированной воде в течение 15 минут. Вазоны, с высаженными растениями, помещали в климатическую камеру с влажностью не менее 90%, но не допускать застоя воды в поддоне.

В процессе работы было показано, что оптимальным материалом для размножения древовидных пионов в культуре *in vitro* являются крупные (от 25 мм в длину и более) и средние (10–20 мм в длину) апикальные и боковые почки. Причем для сортов, при получении которых использовали *P. suffruticosa* (“Николай Вавилов” и “Владимир Новиков”) с акросимподиальным нарастанием побегов (Успенская, 1981) лучшая регенерация наблю-

далась у апикальных или ближайших к ним почек. Для сортов “Куинджи” и “Коралл”, при получении которых использовали *P. lutea* с мезосимподиальным типом нарастания побегов (Успенская, 1981), лучшими эксплантами оказались почки указанных размеров, взятых со средней части побега.

Кроме физиологического возраста исходного экспланта, который имеет несомненное значение в проявлении способности к морфогенезу, не менее значимым фактором является время (сезон) его изоляции от материнского растения. По нашим наблюдениям в условиях центральной полосы России почки размножаемых нами сортов оптимально отделять от материнского растения в самом начале периода вегетации — в конце марта, начале апреля. Так ткани и органы, изолированные в момент вегетации, обладают более высокой чувствительностью к составу питательной среды и способностью образовывать адвентивные почки, формировать побеги и укореняться по сравнению с таковыми, изолированными в период глубокого и вынужденного покоя.

Для нормальной регенерации сортов “Владимир Новиков” и “Куинджи” оказалось необходимым и достаточным присутствие в среде ИУК (0,2 мг/л) и БАП (1 мг/л), тогда как для сортов “Николай Вавилов” и “Коралл” требуется среда с добавлением ИМК (0,2 мг/л) и БАП (1 мг/л). Для размножения китайских сортов древовидных пионов так же используют ИУК (Beruto, Curir, 2007), и  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК) (Cerna et al., 2001).

Индукция и последующее развитие корней, а так же их количество у регенеранта зависит от определенных концентраций ауксинов в среде. Для индукции корнеобразования и последующего укоренения регенерантов сортов китайской селекции используют ИМК в концентрации 15 мг/л (Bouza et al., 1994). Уменьшение концентрации ИМК до 2 мг/л при размножении сортов отечественной селекции привело к такому же выходу укорененных растений (около 60%). Использование при индукции корнеобразования меньшей концентрации ауксина не вызывает необходимого эффекта. Увеличение концентрации ИМК в 2 раза не приводит к увеличению выхода укорененных растений ни у одного изученного нами сорта.

Полученные нами результаты и данные, доступные в открытой печати еще раз подтверждают необходимость оптимизации гормональных добавок, применяемых в средах для регенерации и укоренения для каждого нового сорта.

Таким образом, применение методов микрклонального размножения, позволяющих сильно сократить трудовые и временные затраты на получение посадочного материала, в том числе и декоративных древесных культур, невозможно без их оптимизации для каждого сорта, подвида и вида. Сочетание огромной теоретической базы знаний по классической морфологии кафедры высших растений и новых возможностей, предоставляемых современными научными технологиями, позволяют высококвалифицированному коллективу лаборатории разрабатывать экономически рентабельные экс-

пресс методы размножения редких, исчезающих и ценных для озеленения населенных пунктов видов и сортов растений на базе уникальной коллекции Ботанического сада МГУ имени М.В. Ломоносова.

### Литература

1. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений.— М.— 1983.— 96 с.

2. Криницина А.А., Мурашев В.В., Ратнопорт А.В., Сперанская А.С., Успенская М.С., Чурикова О.А. Микроклональное размножение декоративных культур. Пион древовидный (*Paeonia suffruticosa*). (Учебно-методическое пособие).— М.— 2008.— 40 с.

3. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений.— М.: Наука.— 1991.— С. 5–20.

4. Успенская М.С. Пионы (Род *Paeonia* L.) флоры СССР // Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук.— М.: изд-во Моск. ун-та.— 1981.— 22 с.

5. Успенская М.С. Древовидные пионы: выбор, посадка, уход.— М.: “Фитон+”.— 2007.— 32 с.

6. Beruto M., Curir P. In vitro culture of tree peony through axillary budding / Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits.— Springer.— 2007.— P. 477–497.

7. Bouza L., Jacques M., Sotta B., Miginiac E. Relations between auxin and cytokinin contents and in vitro rooting of tree Peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) / Plant Growth Regulation.— 1994.— 15.— P. 69–73.

8. Owen H.R., Miller A.R. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations / Plant Cell, Tissue and Organ Culture.— 1992.— 28.— P. 147–150.

9. Cerna K., Dedicova B., Borbelyova D. Micropropagation of *Paeonia arborea* Donn., syn. *P. suffruticosa* Andr. / Acta fytotechnica et zootechnica.— 2001.— 4, Special Number.— P. 51–54.

### Резюме

Созданная ботсадом МГУ уникальная коллекция растений и накопленный за много лет теоретический потенциал коллективов ботанического сада и кафедры высших растений, позволяют в настоящее время перейти к разработке конкретных методик интенсивного размножения видов растений, ценных и актуальных для озеленения.

Створена ботанічним садом Московського університету унікальна колекція рослин і накопичений за багато років теоретичний потенціал колективу кафедри вищих рослин, дозволяють у наш час перейти до розробки конкретних методик інтенсивного розмноження видів рослин, цінних і актуальних для озеленення.

The botanical garden of the Moscow State University has created unique a collection of plants. Chairs of the higher plants were saved up for many years by enormous theoretical potential. Now it allows developing concrete techniques of intensive reproduction of kinds of the plants valuable and actual for gardening.

**ЛЯХ Е.М.**

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,  
Россия, 630090, Новосибирск, ул.Золотодолинская, 101,  
e-mail: syringa\_l@rambler.ru

## **РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ СИРЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ**

Озеленение приобретает все большее значение в формировании современного облика городов и индустриального ландшафта. В связи с этим повышаются эстетические требования к подбору ассортимента растений и их размещению на озеленяемых объектах. Важное место здесь принадлежит сирени, одному из самых любимых и распространенных кустарников. Сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.) является очень популярным декоративным кустарником, часто используемым в озеленении городов Сибири, многие сорта которой хорошо растут и цветут.

В Центральном сибирском ботаническом саду Сибирского отделения Российской Академии наук, в лаборатории дендрологии с 1986 года автором были начаты работы с зелеными (полудревесневшими) черенками сортовой сирени для создания коллекции с последующим отбором наиболее перспективных сортов для резко-континентального климата лесостепной зоны Западной Сибири и введения их в озеленение сибирских городов. За весь период работы с сортовыми сиренями автором было испытано 116 сортов зарубежной и отечественной селекции. В настоящее время коллекция сиреней ЦСБС насчитывает 33 сорта, выделенных как наиболее устойчивых к условиям лесостепной зоны Западной Сибири [1]. Сорта сирени традиционно размножали черенкованием. Однако существуют трудности в размножении наиболее интересных сортов *Syringa vulgaris*, не все сорта успешно размножаются вегетативными способами. Для размножения и сохранения таких сортов требуется разработать специальные условия — это размножение в условиях *in vitro*. Массовое размножение ряда сортов *in vitro* является более успешным и менее затратным, чем размножение растений традиционными методами.

### **Материалы и методы**

Работа проводилась в лаборатории культуры тканей Ботанического сада Лонгвуда (Longwood Gardens, Pennsylvania, USA) под руководством доктора Джима Харбаджа (Dr. Jim Harbage, Research and Production Division Leader, Longwood Gardens). Исходный материал для исследований получали из десятилетних растений разных сортов сирени обыкновенной, растущих в экспозиции открытого грунта Лонгвуда. Для выяснения влияния генотипа исходного растения на коэффициент размножения в культуре *in vitro* было исследовано четыре модельных сорта: “Мадам Лемуан” (‘Madam Lemoine’), “Людвиг Шпет” (‘Ludwig Spaeth’), “Монж” (‘Monge’), “Капитан Бальтэ” (‘Captain Baltet’).