

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРИЕМЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ *SYRINGA VULGARIS* L. ДЛЯ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

А.Ю. Набиева

Центральный Сибирский ботанический сад, г. Новосибирск, Россия

Разработаны биотехнологические приемы клонального микроразмножения десяти сортов *Syringa vulgaris* L. Показана возможность индукции развития зачаточного побега пазушных почек сортов “Мадам Лемуан” и “Красавица Москвы”, изолированных с растений в состоянии физиологического покоя. Максимальное увеличение регенерационной способности длительно культивируемых восьми сортов сирени было достигнуто при помощи чередования питательных сред.

В качестве объектов настоящего исследования использовали два высокодекоративных сорта, интродуцированных в ЦСБС, а также растения - регенеранты восьми сортов *S. vulgaris*, культивируемые в лаборатории биотехнологии в условиях *in vitro* в течение 3 лет. Для введения в культуру *in vitro* были использованы апикальные и пазушные почки сортов “Мадам Лемуан” и “Красавица Москвы”. Отбор растительного материала – сегментов однолетних побегов данных сортов с 2-3 междоузлиями - осуществляли в ноябре, во время полного физиологического покоя.

Сирень широко используют для самых различных категорий зеленых насаждений и типов посадок. На больших по площади объектах особенно привлекательны сирингарии, включающие отечественные и зарубежные сорта [3]. В Международном Регистре рода Сирень содержатся сведения о 1566 сортах *S. vulgaris* L. [20]. В нашей стране наиболее обширные коллекции *S. vulgaris* созданы в Главном ботаническом саду и ботаническом саду МГУ (около 200 наименований) [1, 8]. Состав коллекций сирени ботанических садов Сибирского региона включает по несколько десятков сортов, причем основным условием репродукции является их морозостойкость. Маточные насаждения представлены, как правило, сортами, отличающимися легкостью размножения, но не всегда обладающими высокой декоративностью. Как показывает практика, труднее всего размножаются махровые сорта сирени, пользующиеся наибольшим спросом. Недостаточно высокий коэффициент размножения, низкая укореняемость замедляют селекционный процесс, внедрение новых сортов и использование их в декоративном садоводстве и зеленом строительстве. На сегодняшний день существует реальная угроза утраты генофонда отечественных сортов [8]. Таким образом, возникает необходимость в разработке способов размножения сирени, позволяющих увеличить количество корнесобственного сортового материала, расширить его ассортимент, а также облегчить обмен материалом между ботаническими учреждениями. Весь комплекс подобных проблем может быть разрешим с помощью биотехнологических методов, которые в настоящее время успешно применяются для репродукции сортовых сиреней благодаря возможности быстрого тиражирования исходных генотипов из малого количества исходного материала [5, 18].

Существует два метода клонального микроразмножения сирени. Так, V. Hildebrand и P.M. Harney [13] разработали метод получения микропобегов с помощью инициации аксиллярных почек при использовании высокого уровня цитокининов. В свою очередь, J.W. Einset и J.H. Alexander [11] предложили метод микрочеренкования полученных побегов растений - регенерантов (размножения одноузловыми черенками). Ограничением для его применения часто является замедленный рост побега у сирени *in vitro*. Элонгация побега происходит, как правило, при введении в среду относительно небольших количеств цитокининов [18]. На практике применяются оба подхода, но так как первый метод часто приводит к появлению витрифицированных, либо морфологически измененных растений, предпочтение отдается второму методу [19]. Недостаточно полными являются данные о видоспецифичном действии различных цитокининов, применяемых для элонгации побегов сирени в культуре *in vitro* [6, 7]. Среди возможных сроков введения сирени в культуру чаще всего упоминается период активного роста [16]. Предпринимаются шаги по депонированию коллекций различных сортов сиреней [10], но вопрос о возможности сохранения морфогенетического потенциала при длительном культивировании данной культуры остается практически открытым.

Настоящая работа **посвящена изучению** возможности получения и элонгации стабильно растущих микропобегов сортов *S. vulgaris in vitro* из почек, взятых с интродуцированных растений сирени в состоянии физиологического покоя и влияния абиотических факторов (состава питательной среды и регуляторов роста) на морфогенетический потенциал длительно культивируемых *in vitro* сортов сирени.

Материалы и методы. В качестве объектов настоящего исследования использовали два высокодекоративных сорта, интродуцированных в ЦСБС, а также растения - регенеранты восьми сортов *S. vulgaris*, культивируемые в лаборатории биотехнологии в условиях *in vitro* в течение 3 лет. Для введения в культуру *in vitro* были использованы апикальные и пазушные почки сортов "Мадам Лемуан" и "Красавица Москвы". Отбор растительного материала – сегментов однолетних побегов данных сортов с 2–3 междоузлиями - осуществляли в ноябре, во время полного физиологического покоя. Стерилизацию проводили в 2 этапа. Растительный материал промывали проточной водой в течение получаса, выдерживали 20 мин в 10% растворе Domestos на качалке, после чего, ополаскивали дистиллированной водой. Следующий этап проводили в стерильных условиях: почки отделяли от стебля с небольшим его фрагментом и помещали на 15 сек в 70% этанол, затем стерилизовали сулемой (0.1% раствор) в течение 12 мин. Почки 3 раза промывали стерильной дистиллированной водой, удаляли перед посадкой все почечные чешуи и часть листовых примордиев. Размер экспланта (меристемы, имеющей в основании небольшой участок стебля) составлял 1-3 мм.

Процесс размножения *in vitro* различных сортов сиреней 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*.

Для введения данных сортов сирени в культуру *in vitro* и индукции морфогенеза использовали питательную среду с основой по Murashige и Skoog (MS) [14] с добавлением 30 г сахарозы, цитокининов: 6-бензиламинопурина (БАП), тидиазурона (TDZ), N6 - (2- изопентил) аденина (2ip) и гибберелловую кислоту (ГК₃) в различных концентрациях. Экспланты высаживали в стеклянные баночки по 3-5 штук на агаризованные питательные среды. Сосуды с эксплантами помещали в культуральную комнату с температурой 24±1° С, 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2000–3000 лк. Субкультивирование эксплантов на свежую питательную среду осуществляли каждые 4 недели.

Для микроклонального размножения сортов *S. vulgaris* нами был использован два метода - активизация деятельности пазушных меристем и метод микрочеренкования. Для культивирования почек применяли базовые питательные среды MS, Gamborg и Eveleigh (B5) [12], к которым добавляли регуляторы роста: БАП, 2ip, TDZ, β-индолил-3-масляную кислоту (ИМК), β-индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), α-нафтилуксусную кислоту (НУК) и ГК₃.

Укоренение полученных микропобегов проводили на среде Knudson [14] в нашей модификации. Растения-регенеранты с хорошо развитыми корнями на первом этапе адаптации к условиям *ex vitro* высаживали на 2 недели в стерильный кварцевый песок, а затем, на втором этапе, – в микропарник со сбалансированным по составу почвенным субстратом. Количество эксплантов в опыте по индукции морфогенеза - 15 шт/вариант среды. Опыт проведен в 3 повторностях. В таблице приведены средние квадратичные отклонения.

Результаты и обсуждение. Известно, что успешная регенерация растений, определяемая как способность к морфогенезу изолированных органов и тканей, зависит от многих факторов, таких как видовая или сортовая принадлежность, возраст растения-донора, тип первичного экспланта, сроков его введения *in vitro* и состава питательной среды, включая действие регуляторов роста) [2].

В ответ на воздействие экзогенных гормонов у изолированных в ноябре конусов нарастания сортовых сиреней “Мадам Лемуан” и “Красавица Москвы” наблюдались схожие морфологические реакции (табл.). Для снятия апикального доминирования у первичных эксплантов в питательные среды добавляли вещества с цитокининовой активностью: 2iP, TDZ и БАП.

Таблица - Индуцированный морфогенез в культуре пазушных почек двух сортов *S. vulgaris* L. на модифицированной среде MS (0 пассаж), % индуцированных эксплантов

Варианты сред Сорта	Без PP (контроль)	MS+0.2 мг/л БАП	MS+0.2 мг/л БАП+0.2 мг/л TDZ	MS+0.2 мг/л TDZ	MS+0.5 мг/л 2 iP
------------------------	----------------------	--------------------	------------------------------------	--------------------	------------------

“Мадам Лемуан”	-	8.6 ± 0.7	20.7 ± 1.2	4 ± 0.5	25%-каллус, остальные - нет развития
“Красавица Москвы”	5.2 ± 0.5	5.4 ± 0.4	15.8 ± 0.9	-	100% -каллус

Примечание: РР – регуляторы роста.

У индуцированных эксплантов на питательных средах происходил интенсивный рост и деление клеток, ткани приобретали интенсивно зеленую окраску. На регенерацию зачаточного побега на этапе введения в культуру стимулирующее влияние оказывало совместное применение БАП в концентрации 0.2-0.5 мг/л и 0.1-0.2 мг/л TDZ. У обоих сортов сирени при внесении 2iP в концентрации 0.5 мг/л происходило образование неморфогенного каллуса. Элонгация побегов достигалась добавлением в среду регенерации MS одновременно двух цитокининов БАП, TDZ (по 0.2 мг/л) и ГК₃ в концентрации 0.1 мг/л.

На этапе введения в культуру *in vitro* использовали более низкую концентрацию цитокинина БАП – 0.2 мг/л, чем на этапе собственно размножения (0.5 мг/л), что несколько противоречит общей практике [7, 21]. Несмотря на то, что у полученных нами микропобегов в течение трех зимних месяцев прирост не превышал 1.5-2.5см, в основании побегов была отмечена активная пролиферация аксиллярных побегов, что увеличивало коэффициент размножения до 4-5 растений на эксплант (рис. 1).

При исследовании воздействия трофических факторов на пролиферацию микропобегов сирени было испытано несколько составов питательных сред, из которых оптимальными оказались среды MS и B5 с высоким содержанием азота, фосфора и калия. Поэтому в дальнейших исследованиях применяли модификации этих сред. В зависимости от этапа микроразмножения их дополняли регуляторами роста. Наилучшей (по количеству индуцированных почек, скорости роста и количеству образующихся в кластере микропобегов) показала себя следующая последовательность сред: MS (этапы введения в культуру, индукции морфогенеза); B5 (этап собственно размножения); Кнудсона (укоренения).



Рисунок 1 - Реализация развития аксиллярных побегов у сирени сорта “Памяти Колесникова” при добавлении к среде MS 0.2 мг/л TDZ.

Изучение влияния состава питательной среды и регуляторов роста на регенерационную способность длительно культивируемых сортов сирени показало, что максимальный коэффициент размножения достигался при последовательном использовании сред MS (с добавлением 0.2 мг/л TDZ) и B5 с внесенными в среду по 0.5 мг/л БАП и ИМК. После чего все сорта сирени в следующем пассаже переносились на среду Кнудсона без регуляторов роста, что позволяло получать регенеранты с неизменной морфологией.

Известно, что данный прием чередования минеральных составов питательных сред хорошо себя зарекомендовал, например, при культивировании *in vitro* сортов вишни и других плодовых культур [4].

При культивировании побегов на средах для размножения (MS, B5), содержащих относительно низкие концентрации БАП (до 0.7 мг/л), либо TDZ (до 0.3 мг/л), у выделенных из кластеров микропобегов или их черенков практически не снижается укореняемость, количество и длина корней. Обнаружено, что ризогенез легко индуцируется после переноса полученных регенерантов на среду Кнудсона с добавлением 0.5 мг/л ИМК. Процесс формирования придаточных корней у сирени в культуре *in vitro* имеет схожие черты с ризогинезом черешни *in vitro* [9]. Нами также были выявлены случаи заложения корней у сиреней: а) непосредственно из тканей микропобега (рис 2а); б) выше базальной части микропобега (рис 2б); в) из каллуса (рис. 2в).

Несмотря на то, что среди восьми культиваров *S. vulgaris*, находящихся в культуре *in vitro* в течение 3 лет, отмечены сортовые различия, проявлявшиеся как на стадии пролиферации, так и на стадии корнеобразования, с помощью подобного приема клонального микроразмножения в течение 3 лет стабильно получены жизнеспособные регенеранты. Применение двухэтапной адаптации способствовало приживаемости растений - регенерантов сирени на уровне 80 - 85 % и их дальнейшему развитию в условиях как закрытого, так и открытого грунта. Лучшим субстратом для адаптации растений сирени оказалась смесь из песка, торфа и дерновой земли (1:2:1).

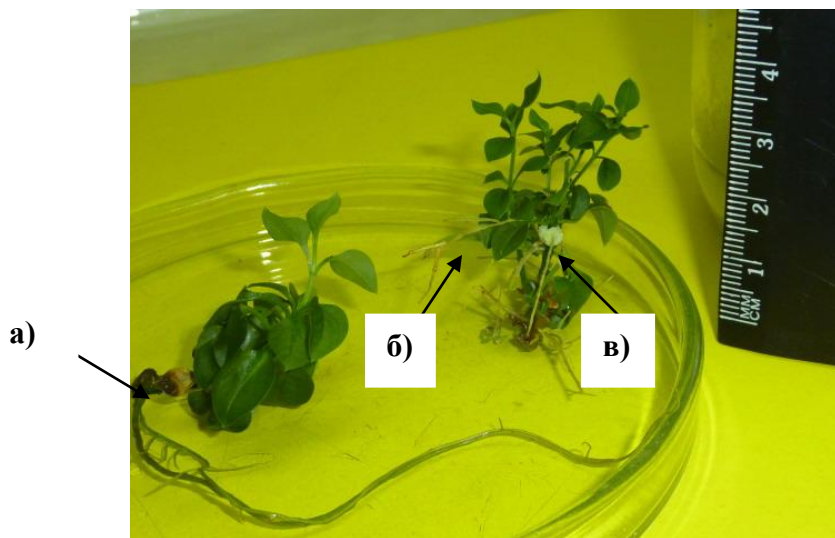


Рисунок 2 - Различные способы закладки придаточных корней у микропобегов сортов сирени: а) “Русская Песня”; б), в) “Маленький Принц”.

Выводы.

1. В культуре *in vitro* возможна индукция морфогенеза у пазушных почек сортов “Мадам Лемуан” и “Красавица Москвы”, изолированных с растений в состоянии физиологического покоя.

2. На регенерацию зачаточного побега на этапе введения в культуру стимулирующее влияние оказывало совместное применение БАП в концентрации 0.2-0.5 мг/л и TDZ в концентрации 0.1-0.2 мг/л.

3. С целью увеличения регенерационной способности длительно культивируемых сортов сирени был применен прием чередования питательных сред. Максимальный эффект достигался при последовательном использовании сред MS (с добавлением 0.2 мг/л TDZ), B5 (с внесенными в среду по 0.5 мг/л БАП и ИМК) и среды Кнудсона без регуляторов роста.

4. Достигнут высокий процент приживаемости растений-регенерантов изученных сортов сирени в условиях *in vivo* благодаря двухэтапной адаптации.

Клональное микроразмножение, сорта Syringa vulgaris L., пазушные почки, ризогенез.

Clonal micropropagation, cultivars of Syringa vulgaris L., axillary buds, rhizogenesis.

Список литературы

1. Ботанический сад Московского университета. 1706-2006. Первое научное ботаническое учреждение России / Под ред. В.С. Новикова, М.Г. Пименова, К.В. Киселевой, В.Е. Гохмана, А.Ю. Паршина. Москва: Тов-во науч. изд. КМК. – 2006. – 280 с.

2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Учеб. пособие / Р.Г. Бутенко – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.

3. Горб В.К. Использование видов и сортов сирени для обогащения парковых ландшафтов. / В.К. Горб. Оптимизация структуры парковых насаждений с использованием интродуцентов. – Киев: Наукова Думка, 1990. – С. 86-90.

4. Корзина Н.В. Индуцированный морфогенез в культуре органов и тканей районированных и перспективных сортов черешни (*Prunus avium* L.) *in vitro* / Н. В. Корзина, О. В. Митрофанова // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. – К.: Логос, 2010. – Т.9.- С. 280-284.

5. Крючкова В.А. Биотехнологические приемы оптимизации микроклонального размножения и адаптации генотипов сирени (*Syringa vulgaris* L.): Дис. ... канд. биол. наук. М., 2005. – С. 204.

6. Молканова О.И. Использование регуляторов роста цитокининового ряда при микроклональном размножении сирени. / О.И. Молканова, Л.Н. Коновалова // Сб. тез. “Регуляторы роста и развития растений в биотехнологиях”. – М.: МСХА, 2001. – 180 с.

7. Молканова О.И. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. / О.И. Молканова, О.А. Чурикова, Л.Н. Коновалова, И.Б. Окунева // Вестник Моск. Университета, сер. 16. – №4. М.: МГУ. – С. 8-14.

8. Окунева И.Б. Сирень: коллекция ГБС РАН: история и современное состояние / И.Б. Окунева, Н.Л. Михайлов, А.С. Демидов. – М.: Наука, 2008. – 174 с.

9. Фаустов В. В. Микроклональное размножение вишни / В. В. Фаустов, Е.В. Олешко, И.В. Жаркова, З.М. Асадулаев, Х.В. Шарифудинов, Х. Исмаил // Известия ТСХА. –1988. Вып. 5. М.: ТСХА. – С. 131-148.

10. Чурикова О.А. Поддержание и возобновление коллекции сортовой сирени с использованием биотехнологических приемов / О.А. Чурикова // Фактори

експериментальної еволюції організмів: 3б. наук. пр. – К.: Логос, 2010. – Т.9. – С. 365-369.

11. Einset J.W. Multiplication of *Syringa* species and cultivars in tissue culture / J.W. Einset, J.H. Alexander // Comb. Proc. Intern. Plant Propagators Soc. – 1985. – Т. 34. – P. 628-636.

12. Gamborg O.L. Culture methods and deletion of glucanases in cultures of wheat and barley / O.L. Gamborg, D.E. Eveleigh // Can. J. Biochem. – 1968. – V.46. – N5. – P. 417-421.

13. Hildebrandt V. In vitro propagation of *Syringa vulgaris* ‘Vesper’ / V. Hildebrandt, P.M. Harney // HortScience. – 1983. – V.18. – P. 432-434.

14. Knudson L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed / L. Knudson // American Orchid Society Bulletin – 1946. – V. 14. – P. 214-217.

15. Murashige T.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – 15. – P. 473-497.

16. Nesterowicz S. Micropropagation of an old specimen of common lilac (*Syringa vulgaris* L.) from the Dendrological garden at Przelewiec / S. Nesterowicz, D. Kulpa, K. Moder, J. Kurek // Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus. – 2006. – 5(1) – P. 27-35.

17. Oprea M. The behaviour of *Syringa vulgaris* in the process of *in vitro* culture / M. Oprea, M. Duta // Bulletin UASVM Horticulture. – 2008. – V. 65. – P.1-2.

18. Pierik R.L.M. 1988. Vegetative propagation of *Syringa vulgaris* L. in vitro / R.L.M. Pierik, H.H.M. Steegmans, A.A. Elias, O.T.J. Stiekema, A.J. van der Velde // Acta Hort. – 1988. – 226. – P.195-204.

19. Pierik R.L.M. Micropropagation of lilac (*Syringa vulgaris* L.) / R.L.M. Pierik, H.H.M. Steegmans, P.A. Sprenkels // Biotechnology in Agriculture and Forestry / High-Tech and Micropropagation, Berlin, 1992. - V. 20. P. 407-426.

20. Vrugtman F. International register and checklist of cultivar names in the genus *Syringa* L. (Oleaceae). Intn'l Register and Checklist of Cultivar Names in the genus *Syringa* L. (Oleaceae). “Work-in-Progress” Lilac Register. Royal Botanical Gardens, Hamilton, Ontario, Canada. 2006. – P. 123-131.

21. Waldenmaier S. *Ex vitro* effects in micropropagation of *Syringa* L./ S. Waldenmaier, G. Bünemann // Acta Hort. - 1992.-300. - P. 201-210.

UDC 635.92:57.0852

Summary

BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF CLONAL MICROPROPAGATION OF PROSPECTIVE *SYRINGA VULGARIS* L. CULTIVARS FOR WESTERN SIBERIA

Nabieva A.Y.

Biotechnological methods of clonal micropropagation of ten cultivars *Syringa vulgaris* L. have been worked out. The possibility of shoot sprouting induction was shown for the axillary buds, isolated from cultivars “Madam Lemoine” and “Beauty of Moscow” at the stage of physiological dormancy. For the long-term *in vitro* culture of 8 lilac cultivars maximum of morphogenetic capacity growth was achieved by the use of nutritional media alteration.

The objects of the present study used two highly ornamental varieties introduced in the CSBG, as well as plants such as eight varieties of regenerants *S. vulgaris* L., cultivated in the laboratory of biotechnology *in vitro* conditions during 3 years. For the introduction of the culture *in vitro* the apical and axillary buds varieties such as “Madame Lemoine” and “Beauty of Moscow” have been used. The selection of plant material - segments of annual shoots of data types with 2-3 internodes – have been conducted in November during the full physiological rest.