

УДК 581.143.6:582.931.4

## РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЕМОВ РАЗМНОЖЕНИЯ СИРЕНИ ОБЫКНОВЕННОЙ

О.И. МОЛКАНОВА,<sup>1</sup> Ю.М. ЗИНИНА,<sup>1</sup> Н.В. МАКЕДОНСКАЯ,<sup>2</sup> Н.Г. БРЕЛЬ,<sup>2</sup>  
Т.И. ФОМЕНКО,<sup>2</sup> Е.В. СПИРИДОВИЧ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук  
127413 Москва, ул. Ботаническая, 4

<sup>2</sup>Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси  
220012 Минск, ул. Сурганова, 2В

Разработана высокоэффективная технология микроклонального размножения сортов сирени, поддерживаемых в коллекции *in vitro* с оптимизацией условий на всех этапах культивирования. Представлены результаты комплексных исследований с использованием анатомо-морфологических, физиологических и биотехнологических методов представителей рода *Syringa* L. при разработке биотехнологических приемов размножения ценных генотипов.

*Ключевые слова:* *Syringa vulgaris* L., сирень, микроклональное размножение, коллекция, регенерационный потенциал.

Сирень — одно из наиболее популярных декоративных древесных растений. В течение нескольких столетий ее культивируют в умеренных широтах Евразии и Северной Америки. Практически все виды рода *Syringa* L. в большей или меньшей степени декоративны и устойчивы в культуре. Наиболее известна сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.), на основе которой получено подавляющее большинство сортов. Целенаправленная работа по созданию сортов сирени была начата в середине XIX ст., большинство выведено в первой половине XX ст. В настоящее время в Международный регистр сирени (International Register and Checklist of Cultivar Names in the Genus *Syringa* L.) внесено около 2000 сортов.

Наиболее репрезентативные коллекции этой культуры сосредоточены преимущественно в ботанических садах и интродукционных центрах, где отдельные сорта обычно представлены малым числом экземпляров. В настоящее время коллекция сирени Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина РАН насчитывает свыше 200 наименований (17 видов, 177 сортов) и является крупнейшей в России. Состав коллекции достаточно полно отражает генотипическое разнообразие рода *Syringa* L. [6]. Коллекция сирени Центрального ботанического сада НАН Беларуси по видовому, сортовому и гибриднему разнообразию обширная, находится на уровне последних достижений селекции и составляет 248 таксонов. Видовая коллекция представлена 25 таксонами в возрасте 40—50 лет, состоит из трех секций рода *Syringa* L. [4].

Применение клеточных биотехнологий обеспечивает ускоренное получение новых ценных форм и линий декоративных культур, исполь-

зубаемых в селекции на устойчивость, продуктивность и качество. Отбор в культуре клеток *in vitro* дает возможность выделить новые линии клеток, из которых можно регенерировать растения с улучшенными характеристиками. Микрклональное размножение растений позволяет получать растения, идентичные исходному типу. Успех ведения культуры ткани и получения нормальных растений непосредственно связан с оптимизацией условий на каждом этапе технологии микрклонального размножения. При микрклонировании наиболее полно реализуется регенерационный потенциал первичных меристем. Это особенно важно для размножения декоративных форм растений, ценные характеристики которых невозможно поддержать при семенном воспроизведении. Отработка основных этапов размножения *in vitro* является первым и обязательным условием применения в промышленных масштабах любых биотехнологий, связанных с регенерацией целого растения. Для размножения сортов сирени, поддерживаемых в коллекции *in vitro*, необходима разработка высокоэффективной технологии микрклонального размножения с оптимизацией условий на всех этапах культивирования.

Целью нашей работы были комплексные исследования анатомо-морфологическими, физиологическими и биотехнологическими методами представителей рода *Syringa* L. с разработкой биотехнологических подходов размножения ценных генотипов. Сотрудничество в области биотехнологий открывает для ботанических садов новые возможности обмена научным опытом и материалом, создания и доступа к информационным базам.

### Методика

Исходным материалом служили виды и сорта сирени коллекции отдела декоративных растений ГБС РАН и ЦБС НАН Беларуси. Для индукции культуры в качестве эксплантатов использовали апикальные и латеральные почки зрелых и молодых побегов с небольшим участком стебля, а также фрагменты стебля длиной около 1 см с двумя пазушными почками в период активного роста. Стерилизовали материал 0,4 %-м раствором фундазола в течение 2–3 ч, затем в ламинаре профильтрованным 7–8 %-м раствором  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  в течение 15–20 мин. После стерилизации эксплантаты промывали стерильной дистиллированной водой и высаживали на питательную среду МС с концентрацией БА 2,0 мг/л и рН 5,6–5,8. В эксперименте использовали питательные среды на основе среды Мурасиге—Скуга (МС), различающиеся по типу и концентрации цитокининов (БАП или 2iP 0,5–3,0 мг/л), а также наличием или отсутствием ауксина (ИУК 0,3 мг/л). Эксплантатами служили микрочеренки с двумя пазушными почками. Количество побегов подсчитывали на одном эксплантате, количество междоузлий — на каждом побеге и измеряли высоту растений-регенерантов. Полученные данные оценивали методом дисперсионного анализа.

### Результаты и обсуждение

Известен комплекс факторов, каждый из которых в отдельности и в сочетании с другими оказывает заметное влияние на развитие меристем *in vitro*. Среди них наиболее важными являются тип эксплантата, генотип растений, условия культивирования донорных растений, состав пита-

тельных сред и др. В свою очередь, степень влияния каждого фактора зависит от генотипа [7].

Ранее мы установили, что особенности микроклонального размножения и выбор оптимальной модели культивирования *in vitro* тесно связаны с биологическими особенностями вида и его размножением в природе. У эксплантатов сирени в культуре *in vitro* реализуется морфогенный потенциал зачатков пазушных почек, а также активизируется деятельность клеток пазушной меристемы. Растения-регенеранты развиваются посредством прямого органогенеза, минуя стадию каллюсообразования [5].

Этап собственно микроклонального размножения является наиболее ответственным для биотехнологического цикла культивирования. Определение факторов, влияющих на морфогенетический потенциал изучаемых представителей рода *Syringa* L. — актуальная задача.

Изучено влияние генотипических особенностей и гормонального состава питательной среды на развитие побегов сирени *in vitro*. В результате исследований установлено, что на характер развития растений сирени *in vitro* оказывает влияние как гормональный состав питательной среды и генотип эксплантата, так и взаимодействие этих факторов ( $F_{\text{факт}} > F_{\text{теор}}$ ) (табл. 1). При этом признак «длина побегов» зависел от гормонального состава среды и взаимодействия изучаемых факторов. На число междоузлий влияли состав среды и генотип, на число побегов — генотип и взаимодействие вышеуказанных факторов. Согласно результатам исследований, генотипические особенности видов и сортов сирени влияют на развитие растений в условиях *in vitro* (табл. 2, 3). Генотипом определяются пределы изменчивости регенерационной способности эксплантатов и количество формирующихся растений *in vitro*. Это согласуется с результатами, полученными и на других культурах [2, 3]. Следует отметить, что наиболее интенсивно развивались эксплантаты сортов Моник Лемуан и Мадам Казимир Перье по сравнению с другими сортами. Эта особенность характерна также для интактных растений указанных сортов.

ТАБЛИЦА 1. Влияние состава питательной среды, генотипа и их взаимодействия на морфометрические показатели регенерантов сирени

Признак	Источник изменчивости	$F_{\text{факт}}$	$F_{\text{теор}}$
Длина побега	Среда	13,45	1,85
	Генотип	1,89	2,46
	Взаимодействие факторов	1,57	1,48
Число междоузлий	Среда	2,79	1,85
	Генотип	6,50	2,46
	Взаимодействие факторов	1,46	1,48
Число побегов на эксплантате	Среда	1,54	1,85
	Генотип	11,21	2,46
	Взаимодействие факторов	1,51	1,48
Коэффициент размножения	Среда	8,85	1,85
	Генотип	18,06	2,46
	Взаимодействие факторов	6,12	1,48

ТАБЛИЦА 2. Влияние генотипа на морфометрические показатели развития побегов сирени

Вариант	Сорт	Длина побега, см	Число междоузлий, шт.	Число побегов, шт.	Коэффициент размножения
1 (st)	Экселлент	1,96	2,77	1,31	3,63
2	Моник Лемуан	1,83	2,87	1,43	4,10*
3	Примроза	2,27	3,04	1,19	3,62
4	Сенсация	2,62*	3,25	1,24	4,03
5	Мадам Казимир Перье	2,63*	3,28*	1,29	4,23*
НСР <sub>0,5</sub>		0,51	0,50	0,19	0,47

\*Различие на уровне значимости 95 %.

В целом прослеживается тесная взаимосвязь между динамикой роста сортов в коллекциях и темпами развития регенерантов в культуре *in vitro*.

Коллекция культур *in vitro* сирени обыкновенной ЦБС НАН Беларуси с применением биотехнологических приемов дополнена новыми сортами, в том числе новыми для коллекции сирени Центрального ботанического сада НАН Беларуси. Введены в культуру сорта Rochester,

ТАБЛИЦА 3. Влияние регуляторов роста на морфогенетические показатели растений-регенерантов

Вариант	Содержание регулятора роста, мг/л			Длина побега, см	Число междоузлий, шт.	Число побегов, шт.	Коэффициент размножения
	БАП	2iP	ИУК				
1 (st)	0,5	—	0,3	2,35	2,99	1,23	3,68
2	0,5	—	—	2,06	3,15	1,25	3,94
3	1,0	—	—	2,24	2,83	1,20	3,40
4	1,0	—	0,3	2,23	2,78	1,31	3,64
5	2,0	—	—	1,97**	2,73	1,25	3,41
6	2,0	—	0,3	1,97**	3,12	1,23	3,84
7	3,0	—	—	2,14	3,16	1,20	3,79
8	3,0	—	0,3	2,14	2,93	1,44**	4,22**
9	—	0,5	—	2,18	3,40**	1,27	4,32
10	—	0,5	0,3	2,20	3,08	1,27	3,91
11	—	1,0	—	2,03	2,87	1,27	3,65
12	—	1,0	0,3	2,41	3,04	1,35*	4,10**
13	—	2,0	—	2,55	3,54**	1,42**	5,03**
14	—	2,0	0,3	2,73**	3,37**	1,24	4,18**
15	—	3,0	—	2,62	3,28**	1,27	4,17**
16	—	3,0	0,3	2,58	2,63**	1,32	3,46
НСР <sub>0,1</sub>				0,35	0,28	0,14	0,29

\*Различие на уровне значимости 95 %.

\*\*Различие на уровне значимости 99 %.

Константин Заслонов, Ипполит Маринджер, Франк Патерсон, Русь, А. Громов, Сумерки, Никитская, Кончаловский. При введении в культуру почки довольно быстро прорастают, побеги некоторых сортов могут достигать 10–12 см, но следующий пассаж на среду того же состава не дает такого эффекта: рост побегов очень слабый или отсутствует вообще, листья скручены вдоль центральной жилки и имеют желтоватый оттенок, некоторые полностью желтые за исключением участков вдоль жилок.

Способность к реализации морфогенетического потенциала сирени определяется генотипом и в определенных пределах может варьировать под воздействием экзогенных факторов. При изучении роли генотипа и условий культивирования в реализации морфогенетического потенциала показано, что на коэффициент размножения влияют как генотип растения и гормональный состав питательной среды, так и взаимодействие этих факторов.

Многие исследователи отмечают, что на развитие эксплантатов большое влияние оказывают компоненты питательной среды, особенно фитогормоны [1, 2]. Для выявления условий, способствующих максимальной реализации морфогенетического потенциала у эксплантатов исследуемых сортов, определено варьирование морфометрических признаков на питательных средах различного гормонального состава (табл. 4).

Согласно нашим наблюдениям, гормональный состав питательной среды влиял на развитие побегов в культуре *in vitro* и их морфометрические показатели: число, высоту, количество междоузлий.

Из 16 исследованных сред следует выделить 5, в которых коэффициент размножения был достоверно выше стандарта и рост побегов не угнетался. Проведено сравнение коэффициентов размножения сортов, полученных на различных средах, со средним коэффициентом размножения по сортам. Только на среде, содержащей 2,0 мг/л 2iP, отмечено достоверное повышение коэффициента размножения или сохранение его на уровне среднего по каждому сорту. Данную среду

ТАБЛИЦА 4. Морфометрические показатели культур сирени обыкновенной коллекции ЦБС НАН Беларуси на разных вариантах питательных сред

Сорт	Вариант					
	1		2		3	
	Количество междоузлий, шт.	Длина побега, мм	Количество междоузлий, шт.	Длина побега, мм	Количество междоузлий, шт.	Длина побега, мм
Рочестер	2,7±0,4	28,1±3,7	4,2±0,4	24,0±2,1	3,5±0,4	20,1±2,3
Ипполит Маринджер	1,9±0,6	29,4±2,5	3,7±0,4	42,2±4,5	2,8±0,2	34,8±3,1
Франк Патерсон	1,7±0,2	22,9±3,1	3,0±0,3	32,1±3,2	2,3±0,2	27,6±4,3
А. Громов	2,4±0,4	28,1±3,7	3,4±0,4	53,4±4,1	2,6±0,1	43,7±5,8
Сумерки	2,7±0,4	40,0±3,9	3,9±0,3	34,0±2,9	3,3±0,4	35,4±4,7
Никитская	1,8±0,3	27,3±4,2	2,7±0,6	24,7±11,7	2,8±0,3	28,3±5,4
Кончаловский	2,3±0,3	45,2±4,9	2,6±0,2	39,2±8,5	3,1±0,1	54,9±6,4

Примечание. Варианты сред: 1 — МС немодифицированная, концентрация БА 2,0 мг/л; 2 — МС модифицированная, CaCl<sub>2</sub> заменен на Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> концентрацией 1000 мг/л, концентрация 2iP 1,5 мг/г; 3 — МС модифицированная, концентрация БА 1,5 мг/л.

можно рекомендовать для ускоренного размножения сортов сирени в культуре *in vitro*. Согласно полученным данным, некоторые сорта сирени (Моник Лемуан, А. Громов, Мадам Казимир Перье) не проявляют заметной гормоноспецифичности и развиваются приблизительно одинаково как на БА, так и на 2iP. У большинства сортов коэффициент размножения и длина побегов на питательной среде с 2iP гораздо выше, чем с БА, причем некоторые культуры на среде второго варианта вовсе не имели прироста, а листья деформировались и желтели. Исключением оказался сорт Кончаловский, который заметно лучше рос на среде, содержащей БА.

Поскольку фитогормон 2iP является довольно дорогостоящим реактивом, был проведен эксперимент по изучению влияния концентрации этого цитокинина на развитие сортов сирени в асептических условиях (табл. 5). Большого отличия в развитии выбранных стерильных культур на модифицированной среде, содержащей 1,0 и 1,5 мг/л 2iP, не обнаружено, поэтому в дальнейшем при размножении сирени использовали модифицированную среду МС с концентрацией 2iP 1,0 мг/л для всех культур коллекции. Некоторые сорта (Никитская, Кавур) не проявили гормоноспецифичности и имели близкие показатели на средах, содержащих и БА, и 2iP, а длина побегов и количество междоузлий зависели только от концентрации цитокининов в питательной среде. Сорт Кончаловский более интенсивно рос на среде, содержащей БА.

На немодифицированной среде МС с концентрацией БА 2,0 мг/л все сорта формировали растения с измененной морфологией (укороченные стебли, скрученные вдоль центральной жилки листья) и хлорозом листьев. Это, вероятно, было результатом избытка цитокинина и недостатка азота, так как на среде МС 1,5 дозы макросолей, а также на модифицированной среде МС, в которой  $\text{CaCl}_2$  (166,1 мг/л) был заменен на  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  концентрацией 1 г/л, хлороз не наблюдался. Поэтому следует подбирать концентрации гормонов на модифицированной среде МС или МС, содержащей 1,5 дозы макросолей.

Мы высадили 1726 адаптированных растений сирени на участок интродукции в питомнике сортов Лунный свет, Красавица Москвы, Флора, Жемчужина, Михаил Шолохов, Павлинка и после адаптации перевели 1284 растения на подготовленный участок в карантинном питомнике. В экспериментах показано значение качества материала на каждом эта-

ТАБЛИЦА 5. Влияние концентрации цитокинина 2iP на морфометрические показатели стерильных культур сортов сирени обыкновенной

Сорт	Концентрация цитокинина 2iP, мг/л			
	1,0		1,5	
	Количество междоузлий, шт.	Длина побега, мм	Количество междоузлий, шт.	Длина побега, мм
А. Громов	2,8±0,5	35,0±6,5	2,8±0,1	40,0±1,2
Сумерки	3,5±0,1	41,2±5,7	3,5±0,5	44,7±3,3
Кавур	2,2±0,2	33,1±6,6	2,5±0,1	31,5±2,5
Поль Арио	3,0±0,1	45,0±2,5	2,8±0,5	44,1±4,1
Абель	2,2±0,1	26,2±1,2	1,9±0,4	22,1±4,1
Моник Лемуан	2,6±0,5	35,5±7,5	3,1±0,5	44,5±3,3

пе размножения (рисунок). Вопросы обновления коллекции сирени активно разрабатываются в ЦБС НАН Беларуси. Предложены пути сохранения коллекции корнесобственным посадочным материалом, полученным методом *in vitro*. Изучение новых технологий микроклонального размножения и их оптимизация для сортов сирени дало положительные результаты. Получены 24 оздоровленных, корнесобственных сорта: белорусской селекции — Нестерка, Павлинка, Лунный свет, Жемчужина, Константин Заслонов и зарубежной селекции — Космос, Михаил Шолохов, Красавица Москвы, Радж Капур, Мадам Флора Степман, Сенсация, Моник Лемуан, Поль Арио, Рочестер, Флора, Франк Патерсон, Ами Шотт, Мадам Казимир Перье, Леди Линдсей и др. Подтверждена аутентичность сортов, полученных микроклональным методом. Сорта сирени Мадам Флора Степман, Лунный свет, Флора, Павлинка, Радж Капур, Аукубофолия, Жемчужина, Юбилейная, Нестерка цветут согласно описанию их в Международном регистре сирени.

Таким образом, в результате выполненной работы предложены пути сохранения коллекции сирени корнесобственным посадочным материалом, полученным методом *in vitro*.

Комплексное исследование с использованием традиционных и биотехнологических подходов позволило сохранить и увеличить сортовое разнообразие коллекции сирени ГБС РАН и ЦБС НАН Беларуси. Нали-



Микроклональное размножение в культуре *in vitro* и размножение *ex situ* сирени сорта Павлинка

чие репрезентативных коллекций создает предпосылки как для расширения спектра научных исследований, так и для сохранения биологического разнообразия *ex situ*.

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. — М.: ФБК-Пресс, 1999. — 160 с.
2. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала плодово-ягодных культур: Автореф. дис. ... д-ра с.-х. наук. — М., 1998. — 44 с.
3. Долгих Ю.И. Соматическая изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. — М., 2005. — 45 с.
4. Македонская Н.В., Брель Н.Г. Омолождение коллекции сирени в ЦБС НАН Беларуси // Теор. и прикл. аспекты биохимии и биотехнологии растений: Сб. науч. трудов. — Минск, 2008. — С. 147—149.
5. Молканова О.И., Чурикова О.А., Коновалова Л.Н., Окунева И.Б. Клональное микро-размножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. // Вестн. Моск. ун-та. — Сер. Биология. — 2002. — № 4. — С. 8—14.
6. Окунева И.Б., Михайлов Н.Л., Демидов А.С. Сирень. Коллекция ГБС РАН. — М.: Наука, 2008. — 172 с.
7. Орлов П.А. Клеточные и генно-инженерные технологии модификации растений. — Минск, 2006. — 248 с.

Получено 12.05.2009

#### РОЗРОБЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПРИЙОМІВ РОЗМНОЖЕННЯ БУЗКУ ЗВИЧАЙНОГО

О.І. Молканова,<sup>1</sup> Ю.М. Зініна,<sup>1</sup> Н.В. Македонська,<sup>2</sup> Н.Г. Брель,<sup>2</sup> Т.І. Фоменко,<sup>2</sup>  
О.В. Спиридович<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Головний ботанічний сад ім. М.В. Цицина Російської академії наук, Москва

<sup>2</sup>Центральний ботанічний сад Національної академії наук Білорусі, Мінськ

Розроблено високоефективну технологію мікроклонального розмноження сортів бузку, що підтримуються в колекції *in vitro*, з оптимізацією умов на всіх етапах культивування. Наведено результати комплексних досліджень із використанням анатомо-морфологічних, фізіологічних і біотехнологічних методів представників роду *Syringa* L. під час розроблення біотехнологічних прийомів розмноження цінних генотипів.

#### ELABORATION OF BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF LILAC ORDINARY (*SYRINGA VULGARIS* L.) PROPAGATION

О.І. Molkanova,<sup>1</sup> Y.M. Zinina,<sup>1</sup> N.V. Makedonskaja,<sup>2</sup> N.G. Brel,<sup>2</sup> T.I. Fomenko,<sup>2</sup>  
E.V. Spiridovich<sup>2</sup>

<sup>1</sup>N.V. Tsitsin Main Botanical Garden, Russian Academy of Sciences

4 Botanicheskaja St., Moscow, 127413, Russia

<sup>2</sup>Central Botanical Garden, National Academy of Sciences of Belarus

2B ul. Surganova, Minsk, 220012, Belarus

Effective clonal micropropagation technology *in vitro* with optimization of all cultivation stages was developed for *Syringa* L. Results of investigation of microclonal propagation of valuable genotypes are represented.

*Key words:* *Syringa vulgaris* L., lilac, microclonal propagation, collection, regeneration potential.