

УДК 581.143.6

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *IN VITRO* ЗАРОДЫШЕЙ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ *PAEONIA*

© А.А. Креницына¹, М.С. Успенская², В.В. Мурашев¹

¹Биологический факультет Московского Государственного Университета им. М. В. Ломоносова, г. Москва

²Ботанический сад Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва
E-mail: krinitsina@mail.ru

Для успешного сохранения редких видов пионов *Paeonias* *obovata* Maxim и *P. wittmanniana* Hartwiss ex Lindl. целесообразно применять такие биотехнологические приемы, как культуру зародышей *in vitro*. Показано, что продолжительность первого этапа стратификации у зародышей *P. wittmanniana* и *P. obovata* в стерильной культуре составляет около 5–6 недель, длительность второго этапа около 6–7 недель. При этом увеличение концентрации ГК в питательной среде до 0,5 мг/л не ускоряет прохождение этапа тепловой. Для дальнейшего культивирования и возможного размножения *P. obovata* и *P. wittmanniana* в условиях культуры *in vitro* концентрация БАП в сочетании с 0,1 мг/л ИУК и 0,1 мг/л ГК в питательной среде может составлять 0,5 мг/л.

Ключевые слова: *Paeonias obovata*, *Paeonias wittmanniana*, культура зародышей

Введение

Род *Paeonias*, который насчитывает в своем составе 25 видов, 33 подвида и 14 разновидностей, представлен многолетними травами, кустарниками и полукустарниками (Halda, 2004). Из них 7 видов, в том числе *P. obovata* и *P. wittmanniana* занесены в Красную книгу РФ (2008). *P. obovata* встречается в лесах Дальнего Востока. Из-за выкопки корневищ, которые используются в качестве лекарственного сырья, хозяйственного освоения территорий произрастания и повышения рекреационной нагрузки численность локальных популяций *P. obovata* невысока и постепенно сокращается. *P. wittmanniana* – эндемик Кавказа, произрастает в грабовых и грабово-дубовых лесах на высоте 600–800 м н. ур. м. Увеличение рекреационной нагрузки и выкопка корней растений привели к тому, что этот вид в природных популяциях находится под угрозой исчезновения.

Одним из путей сохранения видов растений является культивирование их вне естественных мест обитания, например, в коллекциях ботанических садов. При этом в основном из природных мест обитания собирают семена растений. Созревшие семена пионов уходят в простой глубокий морфофизиологический эпикотильный покой, для нарушения которого необходимо проведение двухэтапной стратификации: теплой (+20–22°C) в течение 2–4 месяцев и холодной (+3–5°C) в течение 2–3 месяцев (Николаева и др., 1985). Для ускорения процесса получения проростков, а также для последующего сохранения и мультипликации растений, используют культуру зародышей *in vitro* (Shen et al., 2012).

Материалы и методы

Для введения в стерильную культуру использовали семена *P. wittmanniana* и *P. obovata*. Зрелые семена *P. wittmanniana* были собраны в дендрарии Ботанического сада МГУ им. М. В. Ломоносова, семена *P. obovata* были собраны в ходе экспедиции с растений популяции острова Итуруп.

Сухие семена промывали в растворе детергента «Triton X–100» на магнитной мешалке в течение 20 мин.,

после чего их стерилизовали путем последовательного замачивания в 0,2% растворе «Фундазол» (40 мин.), 70% этиловом спирте (2 мин.), 3% растворе «Лизоформин-3000» (20 мин.). После трехкратной отмывки стерильной дистиллированной водой семена помещали на 0,9% агаризованную среду без дополнительных минеральных и органических компонентов. Через 5 суток набухшие семена в стерильных условиях вскрывали, зародыш отделяли от эндосперма и помещали на питательную среду МС (Murashige, Skoog, 1962) с добавлением 30 г/л сахарозы, 0,1 или 0,5 мг/л гибберелловой кислоты (ГК). Инкубацию зародышей проводили при 22°C при фотопериоде 16 ч день/ 8 ч ночь.

Через 4–5 недель, после того, как активный рост корня и семядолей останавливался, проростки пересаживали на свежую питательную среду того же состава и перемещали на +4°C в темноту. Инкубация при положительной пониженной температуре длилась до начала видимых ростовых процессов в меристемном комплексе. После этого растения выращивали при температуре 22–24°C и фотопериоде 16 ч день/ 8 ч ночь до развития двух настоящих листьев. После этого развившийся побег с апикальной меристемой отделяли от первичного корня и помещали на питательную среду МС с добавлением 30 г/л сахарозы, 0,5 или 1,5 мг/л бензиламинопурина (БАП) в сочетании с 0,1 мг/л индолил-уксусной кислоты (ИУК) и 0,1 мг/л ГК. Дальнейшее культивирование проводили в течение 4–6 месяцев, проводя периодическую пересадку на свежую питательную среду того же состава.

Результаты и обсуждение

В результате было показано, что описанный протокол стерилизации позволяет получить полностью стерильные семена. При культивировании на агаре семян *P. wittmanniana* и *P. obovata*, после применения данного протокола, визуальной контаминации не наблюдалось. Сроки набухания семян различных видов пионов в стерильных условиях составляют 3–7 суток. В работе Е. Ветчинкиной (2012) было показано, что зародыши из семян *P. wittmanniana* и *P. obovata*, хранившихся в течение года, после 5 суток набухания погибали. При использовании для получения культуры зародышей свежих семян, их культивирование на агаризованной среде в течение 7 суток к гибели зародышей не приводит. Возможно, это связано с изменениями биохимического состава семян, которые происходят при их хранении.

У обоих видов пионов зародыши в собранных семенах состояли из зародышевого корешка, гипокотилия и двух семядолей. Такое же строение зародыша отмечается у многих видов пиона, например, у *P. lactiflora* и *P. suffruticosa* (Рудая и др., 2016).

Развитие изолированных зародышей на питательной среде с добавлением ГК начиналось с активного роста корня. При этом различий в скорости роста и степени развития корня на средах с различными концентрациями ГК не наблюдали. Замедление активного роста корня и семядо-

лей у обоих видов пионов как на среде с 0,1 мг/л ГК, так и на среде с 0,5 мг/л ГК происходило примерно через 35–40 суток после начала инкубации. Активация апикальной меристемы проростков *P. wittmanniana* и *P. obovata* начинается через 6–7 недель инкубации при низких положительных температурах. У обоих видов примерно в одни и те же сроки апикальная меристема трогается в рост, и начинается развитие первого настоящего листа. Сроки прохождения второго этапа стратификации не зависели от концентрации ГК в питательной среде. Применение низких положительных температур при культивировании семян в культуре *in vitro* ГК в концентрации 0,5 мг/л так же использовали при культивировании зародышей *P. lactiflora* (Shen et al., 2012; Sun et al., 2013).

Формирование первых двух настоящих листьев в условиях культуры *in vitro* у проростков *P. wittmanniana* и *P. obovata* занимает одинаковое время – около 6 недель. После указанного периода развитие проростка прекращалось. Ростовые процессы: закладка и развитие новых листьев, закладка пазушных почек, рост побега в длину, возобновлялись только после отделения верхней части проростка от зародышевого корешка и перемещения его на свежую питательную среду с добавлением 0,5 мг/л БАП в сочетании с 0,1 мг/л ИУК и 0,1 мг/л ГК. При такой комбинации регуляторов роста у регенерантов *P. wittmanniana* происходило формирование раневого каллуса, в точке роста закладывались новые листовые примордии, которые развивались в настоящие листья. Пазушная почка самого нижнего листа трогалась в рост после полного развития третьего настоящего листа. У регенерантов *P. obovata* на среде того же состава раневого каллуса практически не образовывалось, побег вытягивался и закладывались и развивались новые листья. На питательной среде с 1,5 мг/л БАП у регенерантов *P. wittmanniana* полностью прекращалось образование новых листьев, развивался мощный раневой неморфогенный каллус. Сходная картина наблюдается и для регенерантов *P. obovata*. Наличие в питательной среде БАП приводило к формированию неморфогенного каллуса у других видов пионов. Так, у *P. lactiflora* каллус образуется при наличии в среде 3,5 мг/л БАП, тогда как у *P. anomala* при 0,5 мг/л БАП в сочетании с 1 мг/л нафтилуксусной кислотой (НУК) (Shen et al., 2012).

Выводы

Таким образом, продолжительность первого теплового этапа стратификации, когда снимается покой корневой меристемы, у зародышей *P. wittmanniana* и *P. obovata* в культуре *in vitro* составляет около 5–6 недель, длительность второго (холодового) этапа стратификации – 6–7 недель. Увеличение концентрации ГК в питательной среде до 0,5 мг/л не ускоряет прохождение этапа тепловой стратификации. При дальнейшем культивировании и размножении *P. obovata* и *P. wittmanniana* в условиях культуры *in vitro* концентрация БАП 0,5 мг/л в сочетании с 0,1 мг/л ИУК и 0,1 мг/л ГК более предпочтительна, чем концентрация 1,5 мг/л в сочетании с теми же регуляторами роста.

Работа выполнена при поддержке РФФ, проект №14-50-00029 (направление «Растения»).

ЛИТЕРАТУРА

- Ветчинкина Е. М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян из зародышей редких видов растений: Дисс... канд. биол. наук. – М., 2010. – 172 с.
 Красная книга Российской Федерации (Растения и грибы). – Москва: КМК, 2008. – 885 с.
 Николаева М. Г., Разумова М. В., Гладкова В. Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Ленинград: Наука, 1985. – 347 с.
 Рудая О. А., Чернышенко О. В., Ефимов С. В., Кононов Г. Н. Причины покоя семян некоторых видов рода *Paeonia* L. // Вестник МГУЛ – Лесной вестник, 2016. – №2 – С.66–73.
 Halda J. J. The genus *Paeonia*. – Portland: Timber Press, 2004. – 226 p.
 Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia plantarum, 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.
 Shena M., Wanga Q., Yua X. N., da Silva J.A.T. Micropropagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) // Scientia Hort., 2012. – Vol. 148. – P. 30–38.
 Sun X.-M., Wang H.-C., Zhou W.-Q., Yang H.-G., Wang D. Preliminary study on embryo culture *in vitro* of *Paeonia lactiflora* Pall. // Northern Horticulture, 2013. 10.

Доклад представлен на седьмой научной конференции с международным участием «Растения в муссонном климате: острова и растения» (26–29 сентября 2016 г., г. Южно-Сахалинск)

THE CULTIVATION *IN VITRO* EMBRYOS OF CERTAIN *PAEONIA*

A. A. Krintsina, M. S. Uspenskaya, V. V. Murashev

Moscow State University, Moscow, Russia

Botanical Garden of Moscow State University, Moscow, Russia

Biotech approach of embryo culture *in vitro* are reasonable to use for successful preservation of rare species of peonies *Paeonia obovata* Maxim and *P. wittmanniana* Hartwiss ex Lindl. It was shown that the duration of the first stage of stratification in aseptic embryo cultures of *P. wittmanniana* and *P. obovata* is about 5–6 weeks; the second stage is about of 6–7 weeks. The increase of GA concentration to 0.5mg/l in culture medium does not influence does not accelerate the passage of heat stratification stage. The BAP concentration should not be above 0.5 mg/l for farther cultivation and propagation of *P. obovata* and *P. wittmanniana* in tissue culture conditions.

Key words: *Paeonia obovata*, *Paeonia wittmanniana*, embryo culture

Bibl. 8