

15. Klem G.K. Planteavstandens virking pa granvizkets kvalitet // Meddelelser Fra Det Norske Skogforoksesvesen. – 1952. – Vol. 11, No. 3. – P. 473–506.

16. Merzlenko M.D., Kozhenkova A.A. Metodicheskie ukazaniya dlya uchebnoi praktiki po lesnym kul'turam v Losinom Ostrove. – M.: MGUL, 1996. – 32 s.

17. Georgievskii N.P. Nekotorye soobrazheniya o vyrashchivanii lesnykh kul'tur // Lesnoe khozyaistvo. – 1957. – № 6. – S. 40-43.

18. Babich N.A., Merzlenko M.D., Evdokimov I.V. Fitomassa kul'tur sosny i eli v Evropeiskoi chasti Rossii. – Arkhangel'sk, 2004. – 112 s.

19. Kuznetsov B.A. Predvaritel'nyi obzor statsionarnogo rasprostraneniya pozvonochnykh v Pogonno-Losinoostrovskom lesnichestve // Trudy po lesnomu opytному delu. – Vyp. IV (LXVIII). – Tsentral'naya lesnaya opytnaya stantsiya. – Vyp. I. – M.: Novaya derevnya, 1928. – S. 15-36.



УДК 582.734.3:57.085.23

М.В. Фирсова, А.Ю. Набиева
M.V. Firsova, A.Yu. Nabyeva

ОСОБЕННОСТИ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* БОЯРЫШНИКА ПЕРСТОНАДРЕЗАННОГО (*CRATAEGUS PINNATIFIDA* BUNGE)

IN VITRO CULTURE PECULIARITIES OF *CRATAEGUS PINNATIFIDA* BUNGE

Широкое использование *C. pinnatifida* в озеленении ограничено вследствие трудностей при размножении традиционными способами. Целью нашего исследования явилось изучение морфогенетического потенциала изолированных почек *C. pinnatifida* и особенностей введения их в культуру *in vitro*. Решались следующие задачи: выявление оптимальных сроков введения материала, подбор стерилизующих агентов и питательной среды для активной пролиферации побегов; изучение морфогенетических реакций почек *C. pinnatifida* в культуре *in vitro* в зависимости от их положения на стебле и внесённых регуляторов роста. Взятие эксплантов осуществлялось в 2 срока: с февраля по апрель и с сентября по ноябрь. Выяснено, что более высоким морфогенетическим потенциалом обладали почки, введенные в культуру в марте-апреле. Для стерилизации почек использовались 3 различных вещества. Наилучший эффект обеспечивало применение 0,1%-ного раствора сулемы – до 85% жизнеспособных пазушных почек. Использовали 5 различных питательных сред – MS, WPM, Kn, Nas and Read и DKW с агаром и сахарозой. Наиболее активно процесс стеблевого морфогенеза проходил на среде Nas and Read при совместном применении БАП и кинетина в концентрации 0,25-0,5 мг/л. Элонгация отдельных побегов достигалась добавлением в среду регенерации ГК₃ в концентрации 0,5 мг/л. Большинство апикальных почек *C. pinnatifida* в культуре *in vitro* образовали цветущие побеги. При внесении в среду MS 0,5 мг/л ИУК, 0,2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л 6-БАП частота индукции морфогенного каллуса достигала 81,0-86,0%. Для укоренения черенков мы использовали среду Кнудсона, либо S MS с добавлением ИМК. Таким образом, выявлены особенности клонального микроразмножения *C. pinnatifida* из пазушных почек и проанализировано влияние на процессы стеблевого морфогенеза абиотических и биотических факторов.

Ключевые слова: *Crataegus pinnatifida*, культура ткани, морфогенез, цитокинины.

The wide use of *C. pinnatifida* in landscaping is restricted because of the difficulties of its cloning by traditional methods. The goal of our investigation was the study of morphogenetic potential of *C. pinnatifida* isolated buds and the peculiarities of their tissue culture initiation. The following objectives were involved: to reveal the optimal time for buds initiation in tissue culture, to fit sterilization agent and the best culture medium for active shoot proliferation; to study buds morphogenetic reaction due to their position on the stem and growth regulators added. Explants were taken twice: from February to April and from September to November. It was found that buds isolated into tissue culture in March-April had the best morphogenetic potential. Three different agents were used for buds sterilization. The best effect of sterilization (85% viable buds) was obtained when 0.1% HgCl₂ solution was used. Five different nutrient media were used: MS, WPM, Kn, DKW, Nas and Read with agar and sucrose. The highest axillary shoot multiplication was obtained on Nas and Read medium when 6-benzylaminopurine and kinetin in concentration of 0.25-0.5 mg L were added simultaneously. The elongation of isolated microshoots was obtained by the use of 0.5 mg L GA₃ added to the regeneration medium. The majority of apical buds of *C. pinnatifida* gave microshoots with flowers *in vitro*. After adding to MS medium 0.5 mg L IAA, 0.2 mg L 2,4-D, 0.5 mg L kinetin and 0.5 mg L 6-benzylaminopurine, the frequency of morphogenic callus induction reached 81.0-86.0%. For rooting of the obtained microshoots we used Knudson medium or S MS medium with 0.5 mg L IBA added. The peculiarities of clonal micropropagation of *C. pinnatifida* using axillary bud explants were revealed and the role of biotic and abiotic factors influencing shoot morphogenesis was analyzed.

Keywords: *Crataegus pinnatifida*, tissue culture, morphogenesis, cytokinins.

Фирсова Мария Владимировна, м.н.с., лаб. дендрологии, Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск. Тел. 923-118-3857. E-mail: frsvmmary@mail.ru.

Набиева Александра Юрьевна, с.н.с., лаб. биотехнологии, Центральный Сибирский ботанический сад СО РАН, г. Новосибирск. Тел. 913-717-9824. E-mail: bluebird@list.ru.

Firsova Mariya Vladimirovna, Junior Staff Scientist, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of Rus. Acad. of Sci., Novosibirsk. Ph.: 923-118-3857. E-mail: frsvmmary@mail.ru.

Nabyeva Aleksandra Yuryevna, Senior Staff Scientist, Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of Rus. Acad. of Sci., Novosibirsk. Ph.: 913-717-9824. E-mail: bluebird@list.ru.

Введение

Род *Crataegus* L. является одним из наиболее крупных по видовому и формовому разнообразию среди древесно-кустарниковых растений, насчитывающий, по некоторым данным, от 1000 до 1500 видов [1]. Большинство видов боярышника произрастает в умеренной зоне Евразии и Северной Америки [2]. На территории бывшего СССР произрастает 74 дикорастущих вида боярышников. Боярышники очень декоративны, долговечны, т.к. могут жить до 300 лет, устойчивы к промышленному загрязнению и механическим повреждениям. Они отличаются быстрым ростом и побегообразованием, засухо- и морозоустойчивы, не требовательны к плодородию почв. Многие виды боярышников – ценные лекарственные, пищевые и медоносные растения. Боярышник широко распространен и возделывается как плодовая культура во многих странах мира: Испании, Алжире, Италии и др. В Китае она является третьей по значению семечковой культурой после яблони и груши, с этой целью выращивают *Crataegus pinnatifida* var. *major* N.E.Br [2]. В медицине используют плоды, цветы и листья боярышника. Для всех видов боярышников характерно наличие эпикатехина – одного из наиболее физиологически активных катехинов, обладающих капилляроукрепляющей активностью. Плоды богаты пектиновыми веществами, сорбитом (от 2 до 25% на сухой вес плодов). В них накапливается до 3,5 мг% каротина, 80 мг% витамина С, большое количество биофлавоноидов, тритерпеновых кислот и гликозидов.

C. pinnatifida произрастает в Приморье и на юге Приамурья, а также в Северном и Северо-Восточном Китае, Корее и Японии. Это один из наиболее декоративных и устойчивых видов среди боярышников, характеризующийся плотной кроной, ярко-зелеными лоснящимися листьями и блестящими красными плодами, он не поражается сажистым грибом и бурой пятнистостью. В России данный вид встречается в качестве декоративного растения в культуре, но в ограниченном числе экземпляров. Вегетативное размножение боярышников зелеными черенками для большинства видов малоэффективно, нет данных о положительном опыте размножения *C. pinnatifida* прививкой [3]. Широкое использование боярышника в зеленом строительстве ограничено практическим отсутствием посадочного материала. Для повышения коэффициента размножения используют методы культуры ткани. Работ по микроразмножению боярышников относительно немного, особенно мало их касается размножения взрослых особей. Введение в культуру

in vitro одноузловых черенков, взятых с 15-летних деревьев в период неактивного роста, позволило разработать способ успешного микроразмножения *C. aronia* L. [4]. Был разработан способ получения каллусных культур из вегетативных, генеративных почек и семядолей боярышника Поярковой [5]. Определено, что для индукции морфогенеза в длительно культивируемом каллусе наиболее оптимальной является среда MS, дополненная 1,0 мг/л 2,4-Д и БАП, в концентрации 0,1 мг/л [6]. Показано, что длительно пассируемая каллусная культура сохраняет высокий морфогенетический потенциал и может быть использована в качестве резерва для микроразмножения этого вида. Способность к регенерации побегов выявлена у 33% эксплантов семядолей и листьев *C. pinnatifida*, при этом укоренилось не более 50% побегов [7].

Целью исследования явилось изучение морфогенетического потенциала изолированных почек *C. pinnatifida* и особенностей введения их в культуру *in vitro*.

Материалы и методы

Материалом для проведения исследований являлись вегетативные и вегетативно-генеративные почки *C. pinnatifida*. Отбор растительного материала осуществляли с февраля по апрель и с сентября по ноябрь. В качестве первичных эксплантов использовали апикальные и пазушные почки с однолетних побегов растений, возраст которых насчитывал более 15 лет. Экспланты помещали в 70%-ный C_2H_5OH (1 мин.), после чего переносили на 10 мин. в один из следующих растворов: а) 1% сульфохлорантина; б) 0,1% $AgNO_3$; в) 0,1% сулемы. В качестве питательных сред использовали минеральную основу сред MS, WPM, Kn, Nas and Read и DKW в сочетании с агаром и сахарозой [8-11]. На каждый вариант питательной среды было высажено по 30 эксплантов в трехкратной повторности.

В качестве регуляторов роста в питательную среду добавляли цитокинины: кинетин (кин) – 0,5-1,0 мг/л; 6-бензиламинопуридин (6-БАП) – 0,1-1,0 мг/л, ауксины-3-индолилуксусную кислоту (ИУК), либо индолилмасляную кислоту (ИМК) в концентрации 0,1-1,0 мг/л. Условия культивирования: $24 \pm 1^\circ C$, 16-часовой фотопериод и интенсивность освещения 2000-3000 лк. Субкультивирование осуществляли каждые 6 недель.

На стадии пролиферации побегов использовали минеральную основу питательной среды MS в сочетании с агаром и сахарозой. Контролем являлась питательная среда MS без добавления регуляторов роста. Для укоренения

ренения микропобегов использовали ИМК в концентрации 0,3-0,5 мг/л, внесенную в среды Кнудсена или S MS с уменьшенным в 2 раза содержанием макросолей. Частоту каллусообразования оценивали по количеству эксплантов, образовавших каллус, от их общего числа.

Результаты и обсуждение

Наилучший стерилизующий эффект обеспечивало применение 0,1%-ного раствора сулемы (75-85% жизнеспособных стерильных эксплантов), тогда как стерилизация сульфохлорантинном и AgNO₃ обеспечивала только 32 и 25% соответственно. Более высоким морфогенетическим потенциалом обладали экспланты, введенные в культуру в марте-апреле, чем в сентябре-октябре.

Морфогенетически почки отличались в зависимости от положения на стебле: с удлиненных побегов выделяли самые крупные почки – терминальную и две пазушные, являющиеся вегетативно-генеративными, в то время как с укороченных побегов взяты вегетативные почки. Использование пазушных почек с небольшим участком стебля способствовало более быстрой индукции и развитию микропобегов.

У большинства апикальных почек в культуре *in vitro* мы наблюдали появление цветков одновременно с развитием побегов (рис. 1).



Рис. 1. Появление цветков на побеге из апикальной почки *S. pinnatifida*

В зависимости от этапа микроклонального размножения боярышника перистонадрезанного к питательным средам добавляли 6-БАП в концентрациях 0,2-1,5 мг/л. На этапе введения в культуру *in vitro* мы использовали низкую концентрацию цитокинина БАП – 0,2-0,3 мг/л. На 7-10-е сут. культивирования у 60-75% эксплантов происходила активизация развития микропобегов. Активные процессы морфогенеза наблюдали на среде Nas and Read, MS в нашей модификации – MSm, на модифицированной нами среде Kn-Knm, а также на среде WPM. На среде DKW про-

лиферация побегов из почек отмечена у единичных эксплантов (таб.).

Таблица

Регенерация микропобегов из латеральных почек *S. pinnatifida* в зависимости от состава питательных сред

Варианты сред	Минеральная основа	Регуляторы роста, мг/л	Частота регенерации, %
1	MSm	0,3 БАП + 0,5 Кин	75
2	MSm	0,5 БАП	50
3	N and R	0,3 БАП + 0,5 Кин	86
4	N and R	0,5 БАП	60
5	WPM	0,3 БАП + 0,5 Кин	63
6	Knm	0,5 БАП + 1 Кин	44
7	DKW	0,3 БАП + 0,5 Кин	17

В таблице представлены результаты эксперимента по инициации развития в условиях *in vitro* пазушных почек *S. pinnatifida*, отобранных в апреле. Наиболее подходящей для индукции развития латеральных почек *S. pinnatifida* нами отмечена среда Nas and Read, что согласуется с данными других исследователей [6]. Для регенерации микропобегов нами показано стимулирующее влияние совместного применения БАП и кинетина в концентрации 0,25-0,5 мг/л.

Для индукции пролиферации максимального числа побегов пазушные почки культивировали с добавлением БАП в концентрациях 0,5-2 мг/л (рис. 2). Также для увеличения коэффициента размножения в первых пассажах конгломераты почек и побегов *S. pinnatifida* не разделяли на отдельные единицы, а переносили на свежую питательную среду целиком.

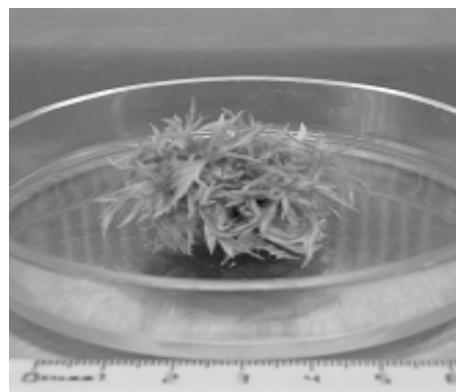


Рис. 2. Образование конгломерата побегов из пазушной почки *S. pinnatifida* под действием 0,75 мг/л 6-БАП (2-й пассаж)

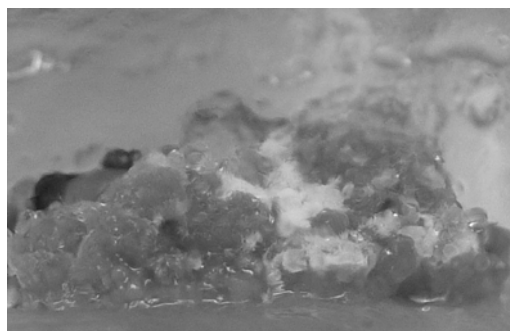
Элонгация отдельных побегов достигалась добавлением в среду регенерации ГК₃ в концентрации 0,5 мг/л (рис. 3).

При культивировании в темноте пазушных почек *S. pinnatifida* на модифицированной питательной среде MS, дополненной 2,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л 6-БАП,

была отмечена максимальная частота каллусообразования (94,0-95,0%), но образовавшийся каллус был неморфогенный, рыхлый, состоящий из паренхимоподобных клеток. В то время как при культивировании эксплантов на свету на питательной среде MS, содержащей 0,5 мг/л ИУК, 0,2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 0,5 мг/л 6-БАП, образовывался зеленый, плотный, морфогенный каллус, а частота индукции каллусообразования составила 81,0-86,0%. На других модификациях питательных сред частота каллусообразования не превышала 61%.



Рис. 3. Элонгация побега *C. pinnatifida* под действием 0,5 мг/л ГКЗ (4-й пассаж)



а



б

Рис. 4. Образование каллуса: а – плотный, морфогенный; б – неморфогенный рыхлый, образовавшийся в темноте

Изучение цитоморфометрических параметров каллусных клеток боярышника перистонадрезанного показало, что каллусная ткань различается как по цвету, форме, кон-

систенции, так и по типу клеток – меристемоподобных и паренхимоподобных (рис. 4 а, б).

Присутствие в плотном, морфогенном каллусе боярышника перистонадрезанного крупных локальных скоплений клеток меристематического типа делает их удачным объектом для возможной индукции органогенеза или соматического эмбриогенеза. Именно эти клетки, сохраняющие способность к пролиферации, обычно являются центрами индукции морфогенеза (рис. 5).

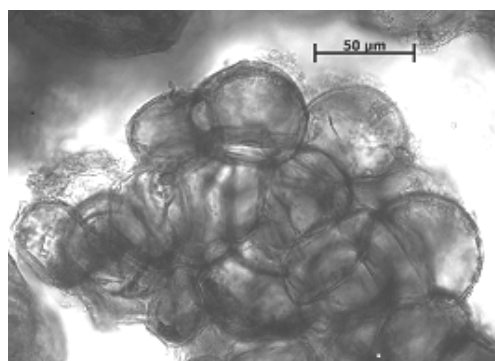


Рис. 5. Скопление делящихся клеток в морфогенном каллусе *C. pinnatifida*, образовавшемся на свету

Для укоренения черенков мы использовали среду Кнудсона, либо S MS с добавлением ИМК в концентрациях 0,3 0,5 мг/л (одноступенчатый метод). Двухступенчатый метод укоренения микрочеренков состоял в помещении на 2-3 дня на те же среды с добавлением 3 мг/л ИМК, в дальнейшем микрочеренки переносились на среды, содержащие ИМК в концентрациях 0,3-0,5 мг/л. Ризогенез у растений, полученных в культуре пазушных почек, выделенных от взрослых экземпляров *C. Pinnatifida*, не отмечен, что, очевидно, говорит о незаконченности процесса реювенилизации микропобегов.

Выводы

Разработаны биотехнологические приемы клонального микроразмножения *C. pinnatifida*, основанные на регенерации растений из пазушных вегетативных почек побегов. В результате исследований установлено влияние на процессы морфогенеза абиотических и биотических факторов, таких как сроки введения первичных эксплантов в культуру *in vitro*, составы питательных сред, концентрации регуляторов роста в среде. Наиболее подходящей для индукции развития пазушных почек *C. pinnatifida* нами отмечена среда Nas and Read. Результаты экспериментов показали, что на регенерацию побегов *C. pinnatifida in vitro* наибольшее влияние оказывает режим стерилизации, сроки отбора почек, их положение на стебле и содержание цитокининов в питательной среде.

Библиографический список

1. Борисова Е.А. Род боярышник (*Crataegus* L., Rosaceae) в городе Иванове // Вестник Ивановского государственного университета Сер. «Биология. Химия. Физика. Математика». – 2004. – Вып. 3. – С. 18-24.
2. Бобореко Е.З. Боярышник Нетрадиционные садовые культуры / Е.П. Куминов. – Мичуринск, 1994. – С. 65-75.
3. Вафин Р.В., Путенихин В.П. Боярышники: интродукция и биологические особенности. – М.: Наука, 2003. – 224 с.
4. Nas M.N., Gokbunar L., Sevgin N., Aydemir M., Dagli M., Susluoglu Z. Micropropagation of mature *Crataegus aronia* L., a medicinal and ornamental plant with rootstock potential for pome fruit // Plant Growth Regul. 2012. – V. 67. – P. 57-63.
5. Попкова Л.Л., Теплицкая Л.М. Процессы морфогенеза в длительно культивируемых каллусах боярышника Поярковой (*Crataegus pojarkovae* Kossykh) // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – Т. 22 (61). – 2009. – № 4. – С. 135-144.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. plant.* – 1962. – Vol. 15. – № 3. – P. 473-497.
7. Dai H., Zhang Z., Guo X. Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledon explants of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. var. major N.E.Br.). *In Vitro Cell Dev Biol Plant.* – 2007. – V. 43. – P. 2-8.
8. Lloyd G. and B.H. McCown. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture // *Int. Plant Prop. Soc., Comb. Proc.* – 1980. – V. 30. – P. 421-427.
9. Knudson L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed // *American Orchid Society Bulletin.* – 1946. – V.14. – P. 214-217.
10. Nas M.N. and P.E. Read. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts // *Sci. Hortic.* – 2006. – V.101. – P. 189-200.
11. Driver J.A., Kuniyuki A.H. In vitro propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock // *HortScience.* – 1984. – Vol. 19. – P. 507-509.

References

1. Borisova E.A. Rod boyaryshnik (*Crataegus* L., Rosaceae) v gorode Ivanove // *Vestnik Ivanovskogo gosudarstvennogo universiteta. Ser. «Biologiya. Khimiya. Fizika. Matematika».* – 2004. – Vyp. 3. – С. 18-24.
2. Boboreko E.Z. Boyaryshnik. Netraditsionnye sadovye kul'tury / Sost. E.P. Kuminov. – Michurinsk, 1994. – S. 65-75.
3. Vafin R.V., Putenikhin V.P. Boyaryshniki: Introduktsiya i biologicheskie osobennosti. – М.: Nauka, 2003. – 224 s.
4. Nas M.N., Gokbunar L., Sevgin N., Aydemir M., Dagli M., Susluoglu Z. Micropropagation of mature *Crataegus aronia* L., a medicinal and ornamental plant with rootstock potential for pome fruit // *Plant Growth Regul.* – 2012. – V. 67. – P. 57-63.
5. Popkova L.L., Teplitskaya L.M. Protsessy morfogeneza v dlitel'no kul'tiviruemykh kallusakh boyaryshnika Poyarkovoi (*Crataegus pojarkovae* Kossykh) // *Uchenye zapiski Tavricheskogo natsional'nogo universiteta im. V.I. Vernadskogo. - Seriya «Biologiya, khimiya».* – Tom 22 (61). – 2009. – № 4. – S. 135-144.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. plant.* – 1962. – Vol. 15. No. 3. – P. 473-497.
7. Dai H., Zhang Z., Guo X. Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledon explants of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bunge. var. major N.E.Br.) // *In Vitro Cell & Dev. Biol.* – 2007. – V. 43. – P. 2-8.
8. Lloyd G. and B.H. McCown. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip culture // *Int. Plant Prop. Soc., Comb. Proc.* – 1980. – V. 30. – P. 421-427.
9. Knudson L. A new nutrient solution for the germination of orchid seed // *American Orchid Society Bulletin.* – 1946. – V.14. – P. 214-217.
10. Nas M.N. and P.E. Read. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts // *Sci. Hortic.* – 2006. – V. 101. – P. 189-200.
11. Driver J.A., Kuniyuki A.H. In vitro propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock // *Hort. Science.* – 1984. – Vol. 19. – P. 507-509.

