



ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ ПОБЕГОВ ФОРСАЙТИИ ЕВРОПЕЙСКОЙ (*FORSYTHIA EUROPAEA* DEGEN ET BALD.) В СТЕРИЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

Андрей В. Константинов

Аннотация. В статье описаны эксперименты по изучению влияния фитогормонального состава питательных сред и типа исходного экспланта на эффективность введения в асептическую культуру и микроразмножения форсайтии европейской. Показано, что фрагменты средней части зеленых черенков, срезанных с вегетирующих растений являются подходящим материалом для получения перевиваемой культуры. Первичные регенеранты форсайтии интенсивно развиваются на питательной среде WPM, дополненной 6-БАП и НУК в концентрации $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Высокий коэффициент мультипликации ($4,8 \pm 0,9$ шт. междуузлий на эксплант) достигается в случае культивирования регенерантов развившихся на фрагментах средней части побега на среде MS с добавлением $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ 6-БАП. На средах без регуляторов роста наблюдается спонтанный ризогенез регенерантов. Полученные растения успешно акклиматизированы к условиям *ex vitro*, их приживаемость достигает 96% на субстрате из торфа песка и перлита в соотношении 3:1:2.

Ключевые слова: *Forsythia europaea*, эксплант, стерилизация, регуляторы роста, культивирование *in vitro*

Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская, 71, Гомель, 246001, Беларусь; avkonstantinof@mail.ru

Введение

Кустарниковые растения являются необходимым элементом для создания устойчивых городских насаждений, характеризующихся формированием специфических растительных сообществ, доля интродуцентов в которых может достигать до 40% (Золотарева 2012). Форсайтия (*Forsythia* spp.) – род листопадных декоративно-цветущих кустарников семейства маслинные (*Oleaceae*) из Восточной Азии и Европы, насчитывающий 12 видов, 5 из которых используются в культуре (Карпун 2010). Одним из наиболее широко применяемых в озеленении урбанизированных территорий видов является форсайтия европейская (*Forsythia europaea* Degen et Bald.) – кустарник, достигающий 2 м в высоту с восходящими раскидистыми ветвями. Цветение растений проходит в апреле-мае (до распускания листьев) желтыми колокольчатыми цветами и последующий интенсивный рост побегов обуславливают ее декоративность и делают

ценным видом для создания сложных композиций, живых изгородей, посадки в миксбордерах, в качестве солитерных растений на газонах (Антипов 2000).

Размножают форсайтию корневыми отпрысками, одревесневшими и зелеными черенками (Колесников 1974). При использовании традиционных методов вегетативного размножения наблюдаются такие явления как снижение укореняемости черенков и депрессии роста черенковых саженцев за счет старения маточников. Кроме того, производство посадочного материала в коммерческих целях обуславливает необходимость получения крупных партий посадочного материала к конкретному сроку. Возникает необходимость поиска других методов и способов размножения, не требующих больших площадей теплиц для маточных растений и позволяющих круглогодично проводить работы на этапе размножения без значительных материальных затрат благодаря снижению рисков, связанных с питомниководческой практикой (повреждение болезнями, вредителями,

заморозками и др.) (Титок 2012). Данным требованиям отвечает использование метода клонального микроразмножения.

Древесно-кустарниковые растения являются наиболее сложными объектами для культивирования в условиях *in vitro* и требуют разработки методологических подходов ко всем основным этапам микроразмножения, таким, как выбор типа исходного экспланта, стерилизация материала, соотношение регуляторов роста, применяемых на этапах мультипликации и ризогенеза (Калашникова и Родин 2001).

Возраст экспланта и его физиологическое состояние играют определяющую роль в регенерационных процессах, протекающих в культуре тканей, в то же время и разные части одного и того же побега разного возраста характеризуются различной способностью к морфогенезу (Кутас и др. 2011). Для разработки эффективной методики культивирования форсайтии в условиях *in vitro*, требуется определение источника экспланта, обладающего наибольшей морфогенной способностью на этапе инициации асептической культуры и обуславливающего высокую эффективность микроразмножения.

В связи с вышесказанным, целью данной работы являлось определение типа эксплантов, дающих максимальное побегообразование и обеспечивающих получение регенерантов, пригодных для эффективного размножения в стерильной культуре.

Материалы и методы исследований

Процесс инициации асептической культуры заключается в выборе типа экспланта, его изолирования, стерилизации и помещения на питательную среду. Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* форсайтии служили однолетние побеги нового годичного прироста из перезимовавших почек длиной 7-12 см, включающие апикальную и 3-6 пазушных почек. Сбор материала проводили в середине мая в городских посадках г. Гомеля.

После удаления листьев зеленые

черенки помещали в раствор моющих и дезинфицирующих средств. Для элиминации эпифитной микрофлоры на вегетирующем материале необходимо применять мягкие по характеру своего действия стерилизующие агенты, кроме того, требуется сократить время их воздействия на ткани растений для минимизации химических повреждений. Черенки обрабатывали в течение 20 минут на шейкере 0,5% раствором моющего средства торговой марки «AOS» («Нэфис Косметикс», Россия) с добавлением препарата «Хлороцид» («БелАсептика», РБ) до концентрации 0,4%. Далее промывали проточной водопроводной водой 30 минут, после чего проводили 3 минутную обработку 12% раствором перекиси водорода. Дальнейшие манипуляции проводились в стерильных условиях, материал 1 минуту выдерживали в 70% этаноле и 3 минуты в 0,1% растворе $HgCl_2$, после чего несколько раз промывали стерильной дистиллированной водой. Черенки разделяли на отдельные сегменты (первичные экспланты), содержащие меристемы апикального и/или пазушного происхождения (почки) для получения регенерантов форсайтии в условиях *in vitro*.

С целью определения морфогенетического потенциала эксплантов различного происхождения их разделили на 3 группы по локализации включенных в него почек на исходном побеге. Отдельно культивировали верхушечные сегменты, содержащие одну апикальную и одну аксиллярную почки (1), фрагменты средней (2) и базальной (3) частей побега с 1-2 аксиллярными почками. Всего использовано 90 эксплантов (по 30 шт. на каждый из указанных вариантов).

В экспериментах использовали питательные среды по прописи WPM (SMITH & McCOWN 1983) и MS (MURASHIGE & SCOOG 1962), с добавлением $8 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ пищевого агара, $30 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$ сахарозы в качестве источника углерода. Доводили pH раствора до 5,6-5,8. Автоклавировали среды при 1,21 атм. (121°C) в течение 40 минут. На этапе инициации асептической культуры среды

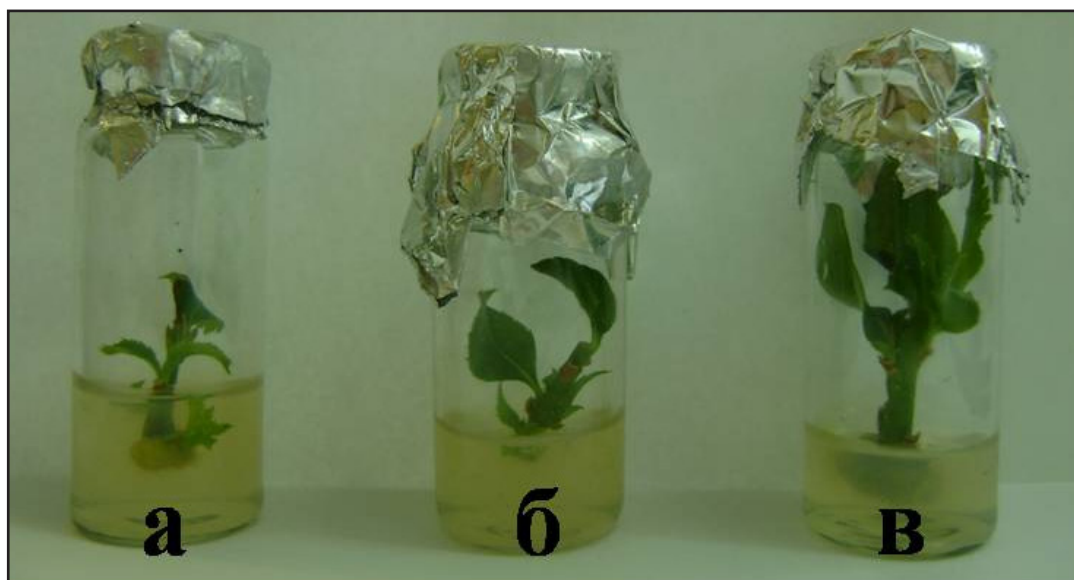


Рис. 1. Регенерация микропобегов на эксплантах изолированных от различных частей зеленого черенка: **а** – базальной (имеется адвентивный побег); **б** – апикальной; **в** – средней.

Fig. 1. Microshoots regeneration on the explants isolated from different parts of the green cutting: **a** – basal part (adventitious shoot present); **б** – apical part; **в** – middle part.

дополняли $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ 6-бензиламинопурина (6-БАП) и $0,5 \text{ мг}\cdot\text{л}^{-1}$ α -нафтилуксусной кислоты (НУК), на этапе мультипликации добавляли только БАП в указанной концентрации, регуляторы роста вносили до автоклавирования. Ризогенез осуществляли на питательной среде без добавления фитогормонов. Первоначально материал помещали в индивидуальные сосуды объемом 10 мл, микроразмножение проводили в культуральных сосудах объемом 250 мл. Выращивание проводили при постоянном освещении теплым белым светом интенсивностью около 2 тыс. люкс под лампами «Lisma» (ГУП РМ «Лисма», РФ) и температуре $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Продолжительность пассажей на всех этапах микроразмножения составляла 30 суток.

Каждую неделю в ходе культивирования проводили учёт результатов экспериментов, отмечая появление недифференцированной ткани на эксплантах и развитие различных органогенных структур. Данные подвергали статистической обработке и использованием пакета анализа Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Эффективность стерилизации (процент эксплантов, свободных от бактериального или грибного заражения) была различной для изучаемых групп. Наиболее эффективными использованные приемы стерилизации были для апикальных и средних частей черенков: 77% и 70% стерильных эксплантов соответственно. В то время как выход стерильного материала базальных частей черенков составил 53%, что можно объяснить наличием начального одревеснения тканей, приводящего к возникновению неровностей на их поверхностях, где сохраняется контаминирующая микрофлора. Жизнеспособность эксплантов всех типов была очень высокой и варьировала от 80% до 90%.

В конце третьей недели культивирования на среде для инициации, отметили развитие базального каллуса на эксплантах, характеризующегося ярко-зеленым или бурозеленым цветом и плотной консистенцией. Отмечали развитие адвентивных побегов

Табл. 1. Морфометрические характеристики микропобегов форсайтии европейской.**Table 1.** Morphometric characteristics of European forsythia microshoots.

Исходная локализация экспланта	Средняя высота побега, мм	Количество междоузлий, шт./регенерант
Апикальная часть	38,9±8,9	2,9±0,7
Средняя часть	61,9±12,3	4,8±0,9
Базальная часть	27,4±9,2	2,1±1,2

de novo на каллусах в нижней части ряда базальных эксплантов (Рис. 1 а). Побегообразование на всех типах эксплантов наблюдали после 1-2 недель культивирования, не зависимо от типа почек и их исходной локализации. В то же время интенсивность развития побегов была неодинакова на сегментах, изолированных от различных частей зеленых черенков. Развитие побегов на эксплантах разных типов представлено на Рис. 1.

В конце нулевого пассажа средняя высота побегов, развившихся на эксплантах изолированных из средней части зеленых черенков была наибольшей и составляла 70,7±16,9 мм. Изучаемые показатели побегов, формировавшихся на эксплантах базальной и апикальной частей черенков были достоверно ($F_{ст} = 52,7; 40,7 > F_{кр} = 4,2$ при $p < 0,01$) ниже и равны 35,6±8,1 мм и 40,1±7,8 мм соответственно, достоверно ($F_{ст} = 2,4 > F_{кр} = 4,2$ при $p > 0,05$) не отличаясь между собой. При этом регенеранты базальных эксплантов визуальнo характеризовались большей толщиной стебля и развитием более крупных листьев.

На начальном этапе необходимо получить хорошо растущую стерильную культуру. С целью интенсификации развития побегов на первичных эксплантах материал субкультивировали на безгормональные среды WPM, предполагая, что отсутствие экзогенных регуляторов роста приведет к интенсификации ростовых процессов, вызванного стимуляцией синтеза собственных фитогормонов. Однако результатом явилось интенсивное укоренение культивируемого материала (71-84% эксплантов) на фоне отсутствия видимого развития побегов. Корни развивались непосредственно из

микропобегов, образовавшихся из аксилярных почек и характеризовались зеленой окраской и толщиной более 2 мм.

Первичные экспланты с развившимися побегами и корнями субкультивировали на среду для мультипликации (MS с добавлением 0,5 мг·л⁻¹ 6-БАП) с целью их дальнейшего выращивания в культуре *in vitro*. После 30 суток наблюдали элонгацию побегов, что позволило перейти к следующему этапу работы.

Клональное микроразмножение форсайтии осуществляли с использованием общепринятой методики пролиферации пазушных побегов, в которой введение в питательную среду цитокининов позволяет снять апикальное доминирование и стимулировать образование побегов из аксилярных почек. Для реализации описанной модели, микропобеги развившиеся в нулевом и первом пассажах (этапе введения в культуру) отделяли, разрезали на отдельные экспланты длиной около 1 см, содержащие пазушные почки и субкультивировали на свежие среды для мультипликации. Их интенсивность роста и развития зависела от происхождения почек (пазушные или верхушечные) и их расположения на исходном зеленом черенке. Морфометрические показатели побегов развившихся *in vitro* представлены в Табл. 1.

После 30 суток культивирования средняя высота побегов, полученных в результате мультипликации регенерантов развившихся на базальных эксплантах была наименьшей 27,4±9,2 мм. Показатели для побегов, происходящих из средней и апикальной частей зеленых черенков были выше и составляли 61,9±12,3 мм и 38,9±8,9 мм соответственно. Все значения представленные в Табл. 1 отличались

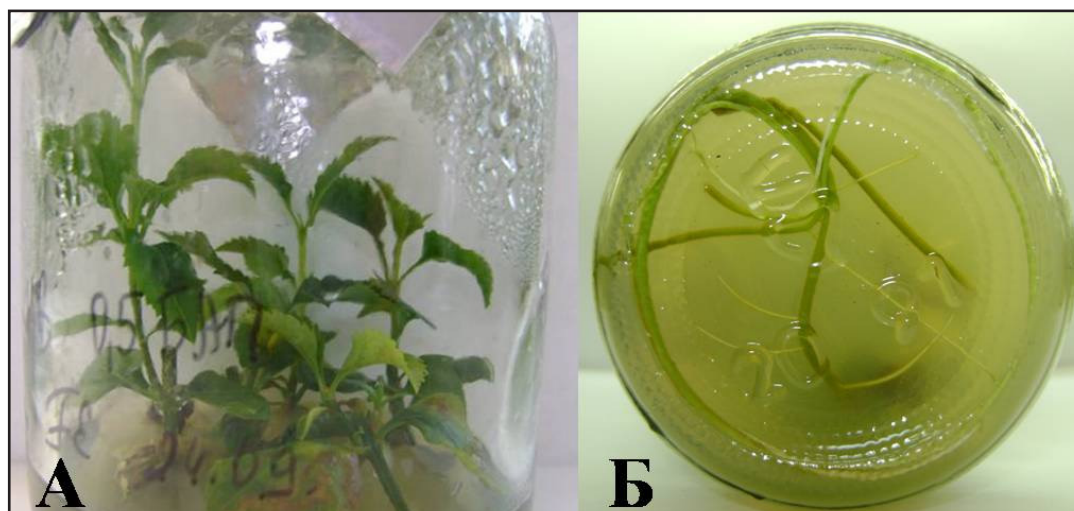


Рис. 2. Мультипликация микрорастений (А) и корнеобразование на регенерантах (Б) форсайтии европейской.

Fig. 2. Microplants multiplication (А) and root formation on microshoots (Б) in European forsythia.

достоверно. Коэффициенты мультипликации (количество получаемых микрочеренков из одного регенеранта) по вариантам опыта имели высокую корреляцию по отношению к размерам побегов и количеству междоузлий. Наибольший потенциальный выход материала для клонального микроразмножения (на основании среднего количества междоузлий, приходящихся на один регенерант: $4,8 \pm 0,9$ шт./эксплант) получен в случае культивирования микропобегов, развившихся на сегментах средней части зеленых черенков. На Рис. 2 представлены микрорастения форсайтии европейской на этапах мультипликации (А) и ризогенеза (Б).

Регенеранты, укорененные на безгормональных средах, переносили из условий *in vitro* в условия *ex vitro* (акклиматизация). Дорастивание растений проводили в климатической камере под фитолампами «Fluora» (Osram, Германия) в условиях освещённости интенсивностью 2-4 тыс. люкс и фотопериоде 16/8. Температуру поддерживали на уровне $24 \pm 3^\circ\text{C}$, относительную влажность воздуха – около 90%. В качестве субстрата использовали смесь верхового торфа с песком и перлитом в соотношении 3:1:2. После 1 месяца акклиматизации растения

были успешно адаптированы к нестерильным почвенным условиям, а их приживаемость составила 96%.

Заключение

Таким образом, в процессе изучения регенерационного потенциала различных типов эксплантов, определено, что наиболее целесообразно использовать сегменты средних частей зеленых черенков для введения форсайтии в культуру *in vitro*.

В результате экспериментальных исследований, нами отработана методика стерилизации вегетирующих побегов форсайтии, позволяющей получать до 77% стерильных эксплантов. Были получены растения *in vitro* и определены среды, для поддержания стерильной культуры побегов на различных этапах, обеспечивающие коэффициент мультипликации равный $4,8 \pm 0,9$ и ризогенез 71-84% микрорастений.

Цитируемые источники

- ЗОЛОТАРЕВА Е.В.** 2012. Видовой состав и состояние древесных интродуцентов в насаждениях г. Орла. *Лесной журнал* 3: 33–36.
- КАРПУН Ю.Н.** 2010. Субтропическая декоративная дендрология: справочник. ВВМ, Санкт-Петербург.

- Антипов В.Г. 2000.** Декоративная дендрология. Дизайн ПРО, Минск.
- Колесников А.И. 1974.** Декоративная дендрология. Лесная промышленность, Москва.
- Титок В.В. 2012.** Центральный ботанический сад НАН Беларуси: сохранение, изучение и использование биоразнообразия мировой флоры. Белорусская Наука, Минск.
- Калашникова Е.А., Родин А.Р. 2001.** Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов биотехнологии: учебное пособие. МГУД, Москва.
- Кутас Е.Н., Малахова И.Н., Горецкая А.А. 2011.** Регенерационный потенциал селекционных гибридов (сем. Vacciniaceae S.F.Gray) в зависимости от типа explанта. *Изв. НАН Беларуси* **1**: 13–15
- Smith M.A., McCown V.H. 1983.** A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species. *Plant Sci. Lett.* **28**: 149–156.
- Murashige T.A., Scoog F.A. 1962.** Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15**: 473–497.

THE FEATURES OF SHOOTS REGENERATION OF EUROPEAN FORSYTHIA (*FORSYTHIA EUROPAEA* DEGEN ET BALD.) IN STERILE CULTURE

ANDREI V. KONSTANTINOV

Abstract. The effects of several factors such as medium, the source of cutting material and plant growth regulators concentration on *in vitro* culture and rapid propagation of *Forsythia europaea* were investigated. The buds from middle part of shoots sprouted in spring were the optimum type of explants, because of the highest shoot growth rate during initiation procedure and biggest amount of formed shoots per microcutting during subsequent multiplication. The best medium during initiation was WPM supplemented with 0.5 mg·l⁻¹ 6-BAP and 0.5 mg·l⁻¹ NAA. Multiplication coefficient was up to 4.8±0,9 on MS medium supplemented with 0.5 mg·l⁻¹ 6-BAP at. Shoots were rooted on the WPM medium without growth regulators and the rate of rooting was 71-84%. The microplants obtained transferred to acclimatization substrate (mixture of peat, sand and perlite in proportions 3:1:2) with up to 96% survival.

Key words: *Forsythia europaea*, explants, sterilization, growth regulators, cultivation *in vitro*

Forest Research Institute, NAS of Belarus, Proletarian str. 71, 246001 Gomel, Belarus; avkonstantinof@mail.ru