

## НАЧАЛЬНЫЕ ЭТАПЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ПИОНА УКЛОНЯЮЩЕГОСЯ БОКОВЫМИ ПОЧКАМИ

**Выявлена высокая морфофизиологическая активность боковых почек пиона уклоняющегося в культуре *in vitro*, зависящая от места их расположения на побеге, эндогенного содержания фитогормонов и срока их изоляции. В качестве эксплантов для разработки клонального размножения рекомендуется использовать боковые почки.**

**Ключевые слова:** культура тканей и органов растений, клональное микроразмножение, пион уклоняющийся.

В основе клонального микроразмножения лежит использование уникальной способности растительных клеток реализовать присущую им тотипотентность под влиянием экспериментальных воздействий и дать начало целому растительному организму. Используя в качестве объекта боковые почки, зародыши, молодые ткани, можно клонировать растения, т.е. получать растения, генетически идентичные исходному.

Актуальным направлением в настоящее время является сохранение и воспроизводство редких видов растений. Пион уклоняющийся, марьин корень (*Paenonia anomala* L., семейство *Paeniaceae*), в Башкортостане чрезвычайно редок [5], включен в Красную книгу Республики Башкортостан [3], отнесен к I категории – виду, находящемуся под угрозой исчезновения. Общее число учтенных особей во всех известных популяциях не превышает 500–600 экз. [6].

Разработка технологии ускоренного размножения, основанная на изучении потенциальных возможностей культивируемых *in vitro* тканей *P. anomala*, является актуальной для решения проблемы сохранения ценных и редких генотипов и в то же время – расширения сырьевой базы.

Цель исследования состояла в выявлении особенностей морфогенеза *P. anomala* в культуре *in vitro* и разработке начальных этапов клонального микроразмножения вида.

В качестве эксплантов в культуре *in vitro* использовали боковые почки, изолированные с побега в период его внутрипочечного роста *P. anomala*.

В работе были использованы метод культуры *in vitro* органов, тканей и клеток [2, 1]; метод иммуноферментного анализа [4].

На первом этапе клонального микроразмножения необходимо получить стерильную, хорошо растущую культуру. Большое значение

имеет выбор стерилизующего раствора и способа дезинфекции, от которых зависит инфицированность эксплантов, их физиологическое состояние и уровень жизнеспособности. В связи с тем, что *P. anomala* является геофитом, получение стерильного материала при изоляции боковых почек для микроразмножения вида при введении в культуру *in vitro* требовало специальной разработки.

Установлено, что наиболее эффективным приемом стерилизации почек *P. anomala* являлось применение 0,1%-ного раствора диацита (экспозиция 20 мин.) с предварительной обработкой их 70%-ным раствором этанола (1 мин.) и 3%-ной перекиси водорода (5 мин.). По разработанной схеме ступенчатой стерилизации получен достаточно высокий процент стерильного материала: максимальное число жизнеспособных почек (78%), минимальное число инфицированных (12%) и некротированных почек (10%).

Изолирование боковых почек в августе позволило достичь максимальной жизнеспособности (75% для резервных почек и 81% для боковых почек возобновления) и минимальной инфицированности боковых почек (10 и 14% соответственно). Доля жизнеспособных спящих почек была очень низкой во все сроки изоляции (5–7%) (табл. 1).

Морфофизиологическая активность, по-видимому, связана с физиологическим состоянием исходного растения в период изолирования экспланта, с изменением биохимических ритмов метаболизма веществ, в том числе и содержанием фитогормонов при прохождении растением периодов роста и покоя. Учитывая большое значение баланса эндогенных гормонов в определении тотипотентности [1], естественно предположить, что компетентность клеток к регенерации

Таблица 1. Влияние сроков изоляции боковых почек *Paeonia anomala* L. на показатели их инфицированности и жизнеспособности в культуре *in vitro*

Боковые почки	Доля эксплантов, %											
	инфицированных				жизнеспособных				некротизированных			
	Срок изоляции*											
	март	май	август	октябрь	март	май	август	октябрь	март	май	август	октябрь
Резервные	32	62	10	37	49	23	75	20	19	15	15	43
Возобновления	54	74	14	49	36	12	81	13	10	14	5	38
Спящие	62	59	34	71	6	5	7	7	32	36	59	22

Примечание: \* Срок изоляции и фаза развития растения: в *марте* – до начала отрастания побегов, в *мае* – в период активного роста побегов, в *августе* – в период окончания формирования почек возобновления, в *октябре* – при переходе к периоду покоя. Жизнеспособные и некротизированные экспланты относили к неинфицированным.

в значительной степени обусловлена количеством и соотношением эндогенных гормонов. Сравнение содержания фитогормонов в эксплантах *P. anomala* в годичном цикле его развития позволило учесть уровень эндогенных гормонов в почках и выбрать оптимальное время их изоляции. Высокое содержание ИУК и цитокининов, низкое содержание АБК в боковых почках приходится на март и с августа по октябрь. Логично вводить в культуру *in vitro* боковые почки именно в эти периоды времени.

Исследования показали влияние срока изоляции эксплантов и фазы развития исходного растения на их регенерационную активность: самая низкая у почек, изолированных в мае, в период отрастания побегов, и в октябре, при переходе к покою, высокая – в августе, в период окончания формирования почек возобновления текущего года. Наибольшей регенерационной способностью обладали боковые почки возобновления и резервные боковые почки *P. anomala*, поэтому именно эти группы почек мы рекомендуем для микроразмножения.

С целью выявления оптимального содержания углеводов в питательной среде испытаны сахара, глюкоза, мальтоза, сорбит, маннит в концентрации от 20 до 60 г/л. По комплексу двух показателей (длине побега и количеству листьев у эксплантов) концентрация сахарозы 40 г/л была оптимальной (рис. 1).

При увеличении концентрации сахарозы (50 и 60 г/л) наблюдалось удлинение побега, однако количество листьев не возрастало.

На начальных этапах культивирования боковых почек были испытаны среды Мурасиге и

Скуга, Уайта, Хеллера. Более высокие показатели выживаемости и темпов развития эксплантов отмечены на среде Мурасиге и Скуга с половинной концентрацией минеральных солей (рис. 2).

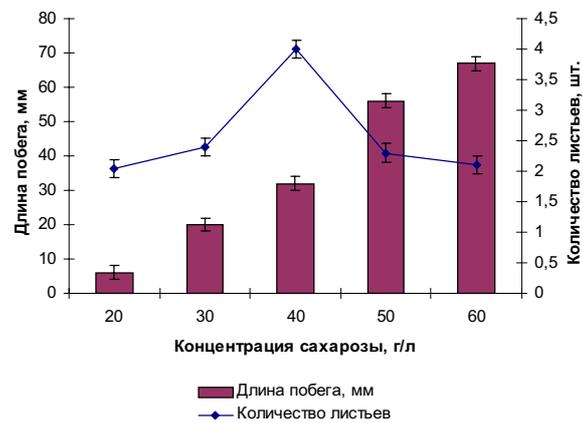


Рисунок 1. Влияние концентрации сахарозы на длину побега и количество листьев *Paeonia anomala* L. через 30 сут. культивирования *in vitro*

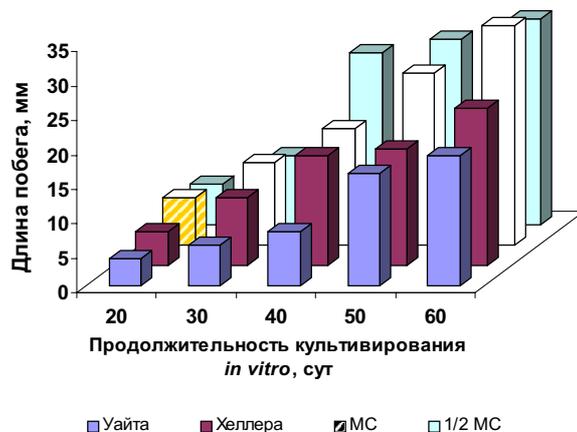


Рисунок 2. Влияние минерального состава питательной среды на рост побега *Paeonia anomala* L. в культуре *in vitro*

Таким образом, установлено, что степень морфофизиологической активности боковых почек пиона уклоняющегося в культуре *in vitro* зависит от места их расположения на побеге и срока изоляции экспланта. Определение уровня эндогенных гормонов в боковых почках *P. anomala* позволяет выбрать оптимальный срок изоляции эксплантов. Для размножения *in vitro*

рекомендуется использовать боковые почки возобновления и резервные боковые почки, которые обладают высокой регенерационной способностью. Исследование начальных этапов культивирования вида позволит в дальнейшем разработать технологию клонального микроразмножения для решения проблемы сохранения вида.

**Список использованной литературы:**

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
2. Калинин В.Ф., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. М.: Наук. думка, 1980. 488 с.
3. Красная книга республики Башкортостан. Т. 1. Редкие и исчезающие виды высших сосудистых растений. Уфа, 2001. 212 с.
4. Кудоярова Г.Р., Веселов С.Ю., Еркеев М.И. и др. Иммуноферментное определение содержания индолилуксусной кислоты в семенах кукурузы с использованием меченых тел // Физиол. раст. 1986. Т. 33. № 6. С. 1221-1227.
5. Кучеров Е.В., Мулдашев А.А., Галеева А.Х. Охрана редких видов растений на Южном Урале. М.: Наука, 1987. 204 с.
6. Мулдашев А.А., Галеева А.Х., Маслова Н.В. Проблемы охраны пиона уклоняющегося (*Paeonia anomala* L.) в республике Башкортостан // Проблемы сохранения биоразнообразия на Южном Урале. Уфа, 2004. С. 170-171.