

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ СИРЕНИ В МЕДЛЕННО РАСТУЩЕЙ КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

© О.А. Чурикова, А.А. Криницына

С целью поддержания живых коллекций растений необходимо разрабатывать методы и подходы, позволяющие увеличивать продолжительность беспересадочного культивирования. Получение медленно растущей коллекции растений в асептической культуре возможно с использованием низких положительных температур. В настоящей работе приведены данные, описывающие влияние пониженной положительной температуры на рост и развитие микропобегов семи различных сортов сирени в стерильной культуре в течение девяти месяцев. Реакция сирени на продолжительное воздействие низкой положительной температуры оказалась сортоспецифичной. У сортов ‘Великая Победа’, ‘П.П. Кончаловский’, ‘Виолетта’, ‘Лебедушка’ и ‘Обманщица’ происходило формирование раневого каллуса, наличие которого не наблюдали у микропобегов сортов ‘Сенсация’ и ‘Лунный свет’. У микропобегов только двух сортов ‘Виолетта’ и ‘Лунный свет’ не было отмечено ветвления, у остальных начинали развиваться пазушные побеги в самом нижнем (‘Обманщица’) или третьем от основания узлах (‘П.П. Кончаловский’, ‘Великая Победа’, ‘Сенсация’ и ‘Лебедушка’). У микропобегов всех изученных сортов продолжали закладываться новые узлы, однако вытягивания междоузлий не происходило. Практически у всех сортов было отмечено изменение окраски листовых пластинок и стеблей микропобегов. Очевидно, это обусловлено накоплением в них антоцианов в связи с защитой растений от воздействия стрессовых факторов, в том числе и низкой температуры. В результате анализа содержания общих антоцианов в микропобегах сирени было показано, что способность растений накапливать антоцианы при пониженной температуре, по-видимому, коррелирует с окраской венчика. У сорта с белой окраской венчика (‘Лебедушка’) содержание антоцианов в листьях практически не изменилось, тогда как у остальных, имеющих фиолетовую или лиловую окраску, за исключением сорта ‘Виолетта’, их уровень при пониженной температуре увеличился. У последнего наоборот, при изначально высоком их содержании наблюдалось снижение их количества в тканях листовых пластинок, что требует последующего более подробного изучения. Полученные результаты послужат основой для разработки и усовершенствования технологии выращивания сирени в медленно растущей культуре *in vitro*.

Ключевые слова: *Syringa vulgaris* L., медленно растущая культура *in vitro*, стрессовые факторы, антоцианы.

Введение. Для поддержания живых коллекций растений в стерильной культуре необходимо разрабатывать методы, которые позволяют длительно сохранять большое количество растений с высокой эффективностью и низкими затратами. Одним из путей решения данного вопроса является увеличение сроков беспереса-

дочного культивирования растений на питательной среде в условиях, замедляющих их рост и развитие, в частности, при пониженной положительной температуре [1].

Однако, такие условия культивирования являются стрессовыми для большинства видов растений. Низкие температуры оказывают

ЧУРИКОВА Ольга Альбертовна, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, e-mail: ochurikova@yandex.ru

КРИНИЦЫНА Анастасия Александровна, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, e-mail: ankrina@gmail.com

Т а б л и ц а 1

Характеристика сортов сирени обыкновенной

Сорт (происхождение сорта)	Цвет венчика	махровость	Время цветения
‘Великая Победа’	лиловый с голубизной	махровый	Средние сроки
‘П.П. Кончаловский’ (‘Victor Lemoine’ x ‘Jules Simon’) x ‘President Poincare’)	голубовато-лиловый	махровый	Средние сроки
‘Виолетта’	фиолетовый	простой	Средние сроки
‘Сенсация’ (спорт от ‘Hugo de Vries’, периклиальная химера)	пурпурно-красные с белой полоской	простой	Поздние сроки
‘Обманщица’	голубой-лиловый-розоватый	махровый	Средние сроки
‘Лебедушка’ (‘Mme Abel Chatenay’ x ‘Reaumur’)	белый с кремовым оттенком	простой	Средние сроки
‘Лунный свет’ (‘Mme Abel Chatenay’ x ‘Reaumur’)	белый с кремовым оттенком	махровый, полумахровый	Средние сроки

негативное влияние на протекание многих физиологических процессов и могут привести к сильным повреждениям или даже полной гибели растения. Защитной реакцией на снижение температуры может быть увеличение содержания общих антоцианов - веществ фенольной природы, которые образуются во всех тканях растения [2].

Для успешной оптимизации протокола культивирования при пониженных температурах необходимо учитывать не только размер, возраст и физиологическое состояние эксплантов, но и видовую и сортовую принадлежность культуры. В зависимости от вида продолжительность культивирования в условиях низкой положительной температуры может варьировать от 6 до 12 месяцев [3]. Основные исследования в настоящее время проводятся для видов растений, имеющих сельскохозяйственную ценность, например, плодово-ягодных культур, тогда как для декоративных растений таких исследований намного меньше. В частности, для сирени была показана возможность сохранения сортов при помощи создания искусственных семян [4], но работ, описывающих влияние низких положительных температур на растения в стерильной культуре, практически нет.

Материалы и методы исследования.

В качестве объекта использовали микропобеги сирени семи сортов, морфологически отличающихся друг от друга. Список сортов и их характеристики указаны в таблице 1.

Вышеуказанные сорта сирени были введены в культуру *in vitro* в период 2010-2015 гг. и прошли не менее 15 пересадок на питательную среду по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением 20 г/л сахарозы и 1,5 мг/л 2-иР (N6-(2-изопентил) аденин). Культивирование растений в стерильных условиях осуществляли при температуре $22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ и стандартном фотопериоде (16 часов день/8 часов ночь). Подробнее состав питательных сред и условия культивирования описаны ранее [5]. Для оценки возможности культивирования сирени в условиях пониженной температуры микропобеги, состоящие из 3 узлов, помещали в пробирки на свежую питательную среду того же состава, инкубировали в течение 7 дней в стандартных условиях, после чего пробирки с растениями перемещали в климатическую камеру. Дальнейшее выращивание микропобегов проводили при постоянной температуре $+10^{\circ}\text{C}$ при стандартном фотопериоде.

Дважды, через 5 и 9 месяцев после начала культивирования, у микропобегов подсчитывали

вали количество узлов, отмечали наличие/отсутствие каллуса на базальной части, оценивали внешний вид: окраску листьев, количество отмерших листьев, развитие пазушных побегов, наличие придаточных корней.

Содержание общих антоцианов в листовых пластинках микропобегов сирени (в условиях пониженной температуры и в стандартных условиях) определяли спектрофотометрическим методом путем измерения оптической плотности кислотного извлечения при длине волны 520 нм с использованием спектрофотометра LEKI SS1207UV (Радиян, Россия). Экстракцию суммарных антоцианов проводили из целых листовых пластинок (размер около 0,5 см²) кислым этанолом (1% раствор HCl в 75% этиловом спирте) при +4°C в темноте в течение 24 часов. Расчет количества суммарных антоцианов проводили согласно Ribereau-Gayon (1972) (цит. по [6]).

Для каждого сорта в условия пониженной температуры помещали не менее 10 растений в двух независимых повторностях. Для всех значений определяли среднее и стандартное отклонение с использованием пакета программ MS Excell.

Результаты и обсуждение. Реакция сирени на продолжительное воздействие низких положительных температур оказалась сортоспецифичной. Через 5 месяцев у всех микропобегов сирени сорта 'П.П. Кончаловский' на базальной части формировался раневой каллус. У 40% микропобегов в пазухах листьев третьего снизу узла начинали развиваться побеги. В среднем за этот период сформировалось 1-3 новых узла.

У всех микропобегов сирени сорта 'Великая Победа' на базальной части также формировался раневой каллус, однако его диаметр был в 2 раза меньше, чем у микропобегов сорта 'П.П. Кончаловский' (таблица 2). У единичных растений-регенерантов начинали развиваться пазушные почки третьего от верхушки узла. В среднем за этот период сформировалось два новых узла, причем рост междоузлий происходил равномерно.

У всех микропобегов сирени сорта 'Виолетта' на базальной части формировался небольшой раневой каллус (диаметр 2,4±1,16 мм), у некоторых растений наблюдалось отмирание листовых пластинок. За указанный период у большей части растений происходило развитие 2-3 новых узлов, которые оставались сближенными. У некоторых растений развивалось 7 новых узлов, индукции развития пазушных почек ни в одном узле не происходило.

Ни у одного из заложенных в условия пониженной температуры микропобегов сирени сорта 'Сенсация' формирования раневого каллуса на базальной части не наблюдалось. За 5 месяцев развивалось, в среднем, 3 новых узла, которые оставались сильно сближенными. У единичных растений трогались в рост пазушные почки третьего снизу узла.

Побеги и листья всех выше описанных сортов приобретали красно-фиолетовую окраску.

У микропобегов сирени сорта 'Лунный свет' формирования раневого каллуса на базальной части микропобега также, как и у сорта 'Сенсация', не происходило, их рост продолжался, количество узлов увеличивалось в 2 раза, часть побега, формировавшаяся в условиях пониженной температуры, сильно вытягивалась. Развития пазушных почек ни в одном узле не наблюдалось.

У микропобегов сирени сорта 'Лебедушка' на раневой поверхности формировался раневой каллус, сходный с таковым у сорта 'Великая Победа' (Таблица 2). У половины микропобегов начинали активно развиваться почки второго и третьего снизу узлов. У развившихся пазушных побегов в пазухах их листьев, в свою очередь, трогались в рост побеги второго порядка. У этого сорта также, как и у сорта 'Лунный свет' в 2,5 раза увеличилось число заложившихся и развивающихся, впоследствии, в условиях низкой положительной температуры узлов.

У микропобегов сирени сорта 'Обманщица' на раневой поверхности базальной части формировался небольшой раневой каллус. За 5 месяцев культивирования при пониженной температуре происходило увеличение числа уз-

Характеристика микропобегов различных сортов сирени после 9 месяцев культивирования при +10°C.

Сорт	Раневой каллус (диаметр мм)	Число узлов	Развитие пазушных побегов	Общие антоцианы/100 мг ткани при +22°C	Общие антоцианы/100 мг ткани при +10°C
‘Великая Победа’	6,67±2,21	4,57±0,98	есть	0,025±0,012	0,252±0,016
‘П.П. Кончаловский’	15,5±2,78	5±1,15	есть	0,089±0,009	0,177±0,018
‘Виолетта’	2,4±1,16	5,7±1,77	нет	0,319±0,047	0,145±0,032
‘Сенсация’	0	6±1,41	есть	0,024±0,006	0,348±0,198
‘Лебедушка’	6,33±2,06	6,86±1,77	есть	0,144±0,094	0,081±0,037
‘Обманщица’	5,22±1,19	6,9±2,5	есть	0,036±0,002	0,074±0,034
‘Лунный свет’	0	6,56±1,13	нет	0,064±0,036	0

лов, в среднем, в 2 раза. При этом у отдельных побегов количество узлов увеличивалось в 4 раза, однако вытягивания междоузлий не происходило. У 80% растений обе почки нижнего узла развивались в побеги.

Побеги и листья этих трех сортов практически не меняли окраску. У сорта ‘Обманщица’ нижняя поверхность некоторых листьев становилась красновато-фиолетовой, у двух других таких изменений окраски не наблюдали.

За следующие 4 месяца изменений с микропобегами сортов ‘П.П. Кончаловский’ и ‘Великая Победа’ не происходило, они оставались темно-красно-фиолетовыми также, как и сорта ‘Виолетта’ и ‘Сенсация’, новых узлов не закладывалось. У двух микропобегов сорта ‘Виолетта’ было отмечено формирование придаточных корней, при этом дальнейшего роста побега не происходило. У остальных сортов (‘Сенсация’, ‘Лунный свет’ и ‘Обманщица’) наблюдалась гибель единичных растений-регенерантов, а у сорта ‘Лебедушка’ у большей части микропобегов произошло отмирание практически всех листьев и началось отмирание базальной части побега.

У микропобегов сорта ‘Лунный свет’ при длительном культивировании при пониженной температуре (+10°C) через 6 месяцев в акропетальном направлении начинали отмирать листья

и стебель. У всех остальных сортов в условиях пониженной температуры закладывались узлы, которые оставались сближенными. У большинства сортов (кроме сорта ‘Сенсация’) происходило формирование раневого каллуса на базальной части микропобегов. Практически у всех сортов (кроме сорта ‘Виолетта’), начинали развиваться пазушные почки самого нижнего (‘Обманщица’) или третьего от основания узла. Ветвления микропобегов при культивировании их в стандартных условиях и при температуре +15°C отмечено не было [5, 7].

Частичное или полное изменение окраски листовых пластинок растений-регенерантов связано с изменением содержания общих антоцианов. Накопление антоцианов связано с защитой растений от воздействия стрессовых факторов, в том числе и низкой температуры [2]. Кроме того, состав и уровень содержания антоцианов в листьях и стеблях коррелирует с окраской венчика цветка: в венчиках фиолетово-голубой окраски детектируется, в том числе и цианидин (основной компонент антоцианового комплекса), наличие которого было показано, в частности, в листьях сирени [8]. В стерильной культуре в листьях всех изученных сортов, кроме сорта ‘Виолетта’, в стандартных условиях (22°±2°C) количество общих антоцианов находилось практически на одном уровне и составляло

0,025-0,144 мг на 100 мг ткани. Увеличение количества общих антоцианов в ответ на понижение температуры до +10°C наблюдалось не у всех сортов. У сорта 'Лебедушка' содержание антоцианов практически не изменилось, а у сорта 'Виолетта', наоборот, при изначально высоком их содержании наблюдали снижение их количества в тканях листовых пластинок (таблица 2), что требует последующего более подробного анализа. Культивирование сирени при температуре +15°C при использовании питательной среды сходного состава не приводило к изменению цвета побегов и листьев [7].

Таким образом, как показали результаты проведенных исследований, успех длительного культивирования сирени при пониженной температуре зависит, прежде всего, от генотипа. Продолжительность культивирования сирени при +10 °C в течение 5 месяцев практически не оказывает отрицательного влияния на микропобеги данной культуры. Тогда как более продолжительное культивирование при такой температуре может приводить к гибели растений сортов сирени, в листьях которых не происходит увеличения количества общих антоцианов. Способность растений накапливать антоцианы в листовых пластинках и побегах при пониженной температуре, по-видимому, коррелирует с окраской венчика. У сортов сирени с лилово-голубой ('Великая Победа', 'П.П. Кончаловский') или пурпурной ('Сенсация') окраской венчика цветка при культивировании *in vitro* в условиях пониженной температуры содержание общих антоцианов в листьях увеличивается от 1,5 до 10 раз.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029 (направление "Растения")).

ЛИТЕРАТУРА

1. Решетников В. Н., Спиридович Е. В., Носов А. М. Биотехнология растений и перспективы ее развития // Физиология растений и генетика. 2014. Т. 46, № 1. С. 3–18.
2. Cheynier V., Comte G., Davis K.M., Lattanzio V., Martens S. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology // Plant Physiol. Biochem., 2013. Vol. 72. P. 1-20.
3. Renau-Morata B., Arrillaga I., Segura J. In vitro storage of cedar shoot cultures under minimal growth conditions // Cell Biology and morphogenesis. 2006. Vol. 25. P. 636-642
4. Refouvelet E., Le Nours S., Tallon C., Daguin F. A new method for in vitro propagation of lilac (*Syringa vulgaris* L.): Regrowth and storage conditions for axillary bud encapsulation in alginate beads, development of a preacclimatisation stage // Sci. Hortic. 1998. Vol. 74. P. 233–241
5. Молканова О. И., Чурикова О. А., Конова Л. Н., Окунева И. Б. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2002. № 4. С. 8–14.
6. Lapornik B., Prosek M., Wondra A.G. Comparison of extracts prepared from plant by products using different solvents and extraction time. // Journal of Food Engineering. 2005. Vol. 71. P. 214–222
7. Gabryszewska E. Effect of various levels of sucrose, nitrogen salts and temperature on the growth and development of *Syringa vulgaris* L. shoots in vitro // Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 2011. Vol. 19, №2. P. 133-148
8. Price J. R., Sturgess V. C. A survey of anthocyanins. VI // Biochem J. 1938. Vol. 32, № 9. P. 1658–1660.

SOME SPECIAL FEATURES OF LILAC DEVELOPMENT IN SLOW GROWTH CULTURE *IN VITRO*

© O.A. Churikova, A.A. Krinitsina

Lomonosov Moscow State University,
1, Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russian Federation

The elaboration of methods and approaches which allow to increase the continuance of long-term cultivation is necessary for alive plant collections maintaining. Lilac cultivation in slow growth aseptic culture is possible at low positive temperatures. Data on low positive temperature influence on growth and development of microshoots from 7 different lilac cultivars in sterile culture during 9 months are given. The reaction to low positive temperature prolonged influence turned to be genotype-specific. In microshoots of 'Velikaya Pobeda', 'P.P. Konchalovsky', 'Violetta', 'Lebyodushka' and 'Obmanschitsa' cultivars wound callus formed contrary to 'Sensation' and 'Lunnii svet' cultivars. Only in microshoots of 'Violetta' and 'Lunnii svet' branching wasn't noticed. In other cultivars axillar shoots in very low ('Obmanschitsa') or third node from the base ('P.P. Konchalovsky', 'Velikaya Pobeda', 'Sensation' and 'Lebyodushka') developed. In microshoots of all studied cultivars new nodes developed, but internodes didn't elongate. Practically in all cultivars the changing of color of microshoots leaves and stems was noticed. Obviously it is due to presence of anthocyanins there. Accumulation of anthocyanins is connected with the defense of plants under stress factors, including low temperature. Analysis of total anthocyanins content in lilac microshoots showed that the ability of plants to accumulate anthocyanins in shoots in low temperature, apparently, correlates with flowers color. Thus in white-coloured 'Lebyodushka' the content of anthocyanins practically didn't change, while in other cultivars, with violet-coloured flowers, except for 'Violetta', their amount in low temperature increased. In 'Violetta' in contrary their amount in leaves in low temperature reduced. So this fact requires subsequent more detailed study. Attained results are the basis for elaboration and improvement of technology of slow growth lilac culture *in vitro*.

Key words: *Syringa vulgaris* L., slow growth culture in vitro, stress factors, anthocyanins.