

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ *PAEONIA SUFFRUTICOSA* ANDREWS С ЦЕЛЮ ИНТРОДУКЦИИ В УРБАНОФИТОЦЕНОЗЫ

А.А. Криницына¹, В.В. Мурашев¹, М.С. Успенская²

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
Биологический факультет
лаборатория биологии развития растений; 2 – ботанический сад

Созданная ботсадом МГУ уникальная коллекция растений и накопленный за много лет теоретический потенциал коллективов ботанического сада и лаборатории биологии развития растений позволяют в настоящее время перейти к разработке конкретных методик интенсивного размножения видов растений, ценных и актуальных для озеленения.

Растительный покров города обычно состоит из остатков в той или иной степени нарушенной природной растительности бедной флористически и имеющей низкую декоративность, а также из созданных человеком посадок – урбанофитоценозов. Одной из наиболее значимых в настоящий момент остается проблема создания декоративных, в значительной степени толерантных урбанофитоценозов как одного из компонентов структуры лесопарков и парков крупных городов [3]. Однако вопрос о том, какими, с точки зрения структуры, должны быть эти сообщества остается открытым.

Для решения этих проблем Ботанические сады могут играть ведущую роль посредников, которые соединяют одновременно научные исследования, сохранение природы и восстановление биоразнообразия, образование и просвещение, коммерциализацию растений-интродуцентов и вовлечение инноваций в экономический оборот [6].

Разработка эффективных приемов озеленения населенных пунктов должна способствовать оптимизации среды, как в микроклиматическом, так и в эстетическом отношениях. Это, прежде всего, связано с подбором ассортимента растений, их размещением, систематическим уходом и содержанием по специальным технологиям. Таким образом, в этом направлении деятельности важным становится правильно отобрать и оценить наиболее подходящие для использования при создании искусственных сообществ виды интродуцированных растений. Совершенно очевидно, что с целью предотвращения активной инвазии в естественные сообщества преобладающими типами стратегий используемых интродуцированных видов должны стать пациентный или виолентно-пациентный. Риск их внедрения в окружающие естественные сообщества будет

минимален. И в этом плане особый интерес представляет растение солитерного типа пион древовидный (*Paeonia suffruticosa* Andrews).

Род *Paeonia* L. очень древний и представлен разными жизненными формами - кустарниковыми, полукустарниковыми и травянистыми видами [1; 12]. Область распространения пионов охватывает довольно обширную территорию: более 30 видов этого рода распространены в умеренных и отчасти в субтропических областях Европы, Восточной и Юго-Восточной Азии, Северной Америки, Северной Африки. Наиболее примитивные представители рода (пион древовидный – *P. suffruticosa* Andrews и полукустарниковые виды – *P. lutea* Franch. и *P. delavayi* Franch.) произрастают в Юго-Западном Китае.

В Россию древовидные пионы попали только в 1863 году, в течение 80 лет их выращивали в горшечной культуре в холодных оранжереях ботанического сада БИН РАН (Санкт-Петербург) и только с 1939 года в открытом грунте. В ботаническом саду МГУ на проспекте Мира с 1951 года А.А.Сосновец стала заниматься интродукцией и селекцией древовидных пионов, а с 1981 год эта работа была продолжена на основной территории сада на Воробьевых горах. За несколько десятилетий работы в Ботаническом саду МГУ автором этой статьи и куратором коллекции древовидных пионов Марианной Сергеевной Успенской создано более 30 сортов, занесенных в Каталог сортов, допущенных к использованию в производстве в Российской Федерации. Некоторые сорта российской селекции приведены на фотографиях 1-8.

К сожалению, древовидные пионы в условиях России очень медленно растущее растение, что затрудняет быстрое введение в культуру новых сортов. Для массового внедрения древовидных пионов в озеленение существуют некоторые сложности: медленное прорастание семян, как правило, семена прорастают на второй или третий год, и очень медленный рост сеянцев в первые годы жизни. Кроме того, древовидные пионы в отличие от травянистых пионов значительно сложнее размножаются вегетативным путем.

С конца 80-х годов на базе лаборатории биологии развития растений биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова проводятся исследования по изучению морфогенеза в культуре растительных клеток, тканей и органов *in vitro*, травянистых и древесных представителей различных таксономических групп. Разработанные нами методики микрклонального размножения позволяют получать в короткие сроки оздоровленный посадочный материал редких и ценных генотипов растений для



Август



300 лет БС



В. Новиков



Ак. Садовничий



Сосновец



Тит Трофимов



Юлия Друнина



Коралл

реинтродукции в природные места распространения, а так же для использования в озеленении населенных пунктов [5].

Цели и задачи

Целью нашей работы было выявление особенностей формирования интродукционных популяций *Paeonia suffruticosa* Andrews в ходе онтогенеза в Ботаническом саду биологического факультета МГУ, создание новых зимостойких сортов древовидных пионов и разработка технологий их ускоренного размножения.

В связи с поставленной целью были сформулированы следующие задачи: оценить экологическую стратегию, декоративные качества и зимостойкость выведенных на базе Ботанического сада МГУ имени М.В.Ломоносова новых сортов древовидных пионов и разработать методики микроклонального размножения этих сортов.

Объекты и методика исследований

Для достижения поставленной цели были выбраны 4 сорта древовидных пионов - «Владимир Новиков», «Коралл», «Куинджи» и «Николай Вавилов» имеющих различное селекционное происхождение.

Сезонные наблюдения за популяциями выбранных сортов проводили в течение 30 лет. При этом учитывали структуру биомассы, скорость роста, продолжительность ювенильного периода, массовость цветения в зависимости от возраста растений, декоративные качества сорта, варьирование степени махровости цветков и интенсивности их окраски в зависимости от агрометеорологических условий, органогенный потенциал меристем побега в зависимости от местоположения почек, их зимостойкость, устойчивость к грибными и иными болезням и т.д.

Для отработки методов микроклонального размножения выбранных сортов в качестве эксплантов использовали апикальные и боковые почки с одревесневших 4-5 летних побегов. Побеги с почками отделяли от растений в самом начале периода вегетации, во время активного цветения растений, плодоношения и после полного опадания листьев и во время полного физиологического покоя.

Срезанные с куста побеги с почками предварительно тщательно промывали в проточной воде хозяйственным мылом. Стерилизацию отделенных почек проводили путем погружения в 30% раствор гипохлорита натрия на 15 минут, далее в 10% раствор перекиси водорода в 70% спирте, где инкубировали 20

секунд, а затем промывали трижды по 10 минут стерильной дистиллированной водой. Очищенные от чешуи зачаточные побеги высаживали в ламинаре на агаризованную (6 г/л) стерильную (автоклавированную) среду (рН=6) для индукции морфогенеза WPM (Woody Plant Medium [14]) с удвоенной концентрацией солей кальция и добавлением 50 мг/л лимонной кислоты, 100 мг/л аскорбиновой кислоты, 1 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 0.2 мг/л 3-индолилуксусной (ИУК) или 4-[3-индолил]-масляной (ИМК) кислот. Пересадка на свежую среду того же состава культивируемых эксплантов производилась каждые 3 недели. При появлении черного экссудата в питательной среде первое пересаживание эксплантов производили через сутки.

Отделение развившихся из аксиллярных почек побегов – первичных регенерантов осуществляли при формировании ими 2-4 полностью развившихся листьев (через 30-40 дней). Размер отделяемых побегов составлял 0,5-1 см. Первичные регенеранты отсаживали по 3 в один стакан и культивировали на среде для индукции морфогенеза с соответствующими гормональными добавками до разворачивания 3-5 листьев – от 2 до 5 недель. Обновление среды проводили каждые 3 недели. На протяжении всего этого срока обеспечивали условия необходимые для нормального роста и развития культиваров: температура $21 \pm 2^\circ \text{C}$, освещенность 7000 люкс, фотопериод 16 ч день, 8 ч ночь.

Укоренение полученных черенков с 3-4 нормально развитыми листьями, проводили в два этапа. Сначала осуществляли индукцию корнеобразования, после чего в течение довольно длительного времени проходило непосредственно формирование и развитие корней. Для индукции корнеобразования использовали модифицированную питательную среду WPM с уменьшенной в 2 раза концентрацией макросолей с добавлением ИМК в концентрации 1 мг/л, 2 мг/л и 4 мг/л и 4% сахарозой. Стаканы с укореняемыми черенками на 14 дней помещали в темноту при температуре 18°C . Рост и развитие корней протекал на среде WPM без гормональных добавок и с добавлением 0,3% активированного угля и 3% сахарозы. Во время культивирования поддерживалась пониженная интенсивность освещения (4000-5000 люкс) и температура 18°C . При этом развитие корней начиналось через 5-12 недель.

Перед переводом растений на почвенную смесь корневую систему предварительно освобождали от агаризованной среды. Нами было предложено в качестве субстрата использовать смесь: 50% торф, 25% кварцевого стерильного песка, 25% стерильного керамзита. В качестве комплексного удобрения ис-

пользовали раствор макро- и микросолей для среды WPM. Кварцевый песок стерилизовали сухим жаром в течение 2 часов при 130°C, керамзит промывали в проточной воде и стерилизовали кипячением в дистиллированной воде в течение 15 минут. Вазоны, с высаженными растениями, помещали в климатическую камеру с влажностью не менее 90%, но не допускать застоя воды в поддоне.

Результаты исследований и их обсуждение

Чем больше и разнообразнее источников устойчивости включается в селекцию, тем больше возникает возможностей получить совершенно новые формы растений с обогащенным генофондом. Особое значение имеет источник устойчивости, обеспечивающий эффективную и длительную защиту культуры от патогенов. В этом плане наиболее надежными являются дикие сородичи культурных растений, о чем писал Н.И. Вавилов еще в 1935 г. Поэтому основным направлением селекционных работ в Ботаническом саду МГУ является привлечение при создании новых сортов диких видов, более устойчивых к холоду, засухе и болезням, вызываемыми фитопатогенными грибами [9]. Изучаемые нами сорта «Владимир Новиков», «Коралл», «Куинджи» и «Николай Вавилов» имеют декоративные кусты, которые достигают 1,5 – 2 м. При этом многолетние наблюдения показали, что в континентальных условиях эти сорта древовидного пиона прекрасно переносят морозные зимы без укрытия. Древовидный пион исключительно вынослив, зимостоек, долговечен, достаточно неприхотлив. На каждом кусте может формироваться от 30 до 70 цветков. Диаметр каждого от 20 до 25 см. На одном месте без пересадки древовидный пион может находиться более 20 лет. Этот вид с типичной пациентной экологической стратегией практически идеальное растение, способное украсить любой участок в течение всего вегетационного периода.

С целью ускорения воспроизводства качественного посадочного материала в настоящее время разработаны схемы микроклонального размножения древовидного пиона многих сортов европейского и китайского происхождения [10]. Однако для каждого нового сорта этой культуры необходимо уточнять и подбирать свои оптимальные режимы размножения в стерильных условиях. Для микроклонального размножения пиона древовидного нами был использован самый распространенный метод – активизация деятельности пазушных меристем. При этом процесс размножения *in vitro* различных сортов пионов имеет ту же последовательность операций, что и у остальных культур: введение в

стерильную культуру, индукция морфогенеза, размножение, укоренение и адаптация полученных растений к условиям *in vivo*.

Поскольку для успешности метода важным является выбор материала для размножения, то необходимы исследования онтогенеза видов рода *Paeonia*, причем особое внимание нами уделялось нарастанию побегов в культуре в условиях европейской части России. Поскольку при выведении новых сортов используются различные виды пионов, то учет селекционной истории каждого сорта сильно ускоряет получение необходимого количества материала. В процессе работы было показано, что оптимальным материалом для размножения древовидных пионов в культуре *in vitro* являются крупные (от 25 мм в длину и более) и средние (10-20 мм в длину) апикальные и боковые почки. Причем для сортов, при получении которых использовали *P. suffruticosa* («Николай Вавилов» и «Владимир Новиков») с акросимподиальным нарастанием побегов [8] лучшая регенерация наблюдалась у апикальных или ближайших к ним почек. Для сортов «Куинджи» и «Коралл», при получении которых использовали *P. lutea* с мезосимподиальным типом нарастания побегов [8], лучшими эксплантами оказались почки указанных размеров, взятых со средней части побега.

Кроме физиологического возраста исходного экспланта, который имеет несомненное значение в проявлении способности к морфогенезу, не менее значимым фактором является время (сезон) его изоляции от материнского растения. По нашим наблюдениям в условиях центральной полосы России почки размножаемых нами сортов оптимально отделять от материнского растения в самом начале периода вегетации – в конце марта, начале апреля. Так ткани и органы, изолированные в момент вегетации, обладают более высокой чувствительностью к составу питательной среды и способностью образовывать адвентивные почки, формировать побеги и укореняться по сравнению с таковыми, изолированными в период глубокого и вынужденного покоя.

Для нормальной регенерации сортов «Владимир Новиков» и «Куинджи» оказалось необходимым и достаточным присутствие в среде ИУК (0.2 мг/л) и ВАР (1 мг/л), тогда как для сортов «Николай Вавилов» и «Коралл» требуется среда с добавлением ИМК (0.2 мг/л) и ВАР (1 мг/л). Для размножения китайских сортов древовидных пионов так же используют ИУК [10] и б-нафтилуксусную кислоту (НУК) [15].

Индукция и последующее развитие корней, а так же их количество у регенеранта зависит от определенных концентраций ауксинов в среде. Для ин-

дукции корнеобразования и последующего укоренения регенерантов сортов китайской селекции используют ИМК в концентрации 15 мг/л [11]. Уменьшение концентрации ИМК до 2 мг/л при размножении сортов отечественной селекции привело к такому же выходу укорененных растений (около 60%). Использование при индукции корнеобразования меньшей концентрации ауксина не вызывает необходимого эффекта. Увеличение концентрации ИМК в 2 раза не приводит к увеличению выхода укорененных растений ни у одного изученного нами сорта.

Примерный выход укорененных растений при применении предложенной нами методики микроклонального размножения составляет около 20 растений на один эксплант. При этом при умелом делении куста тех же сортов получается не более 3-4 единиц посадочного материала, а при успехе прививки на корни травянистого пиона – 9-10 единиц [9].

Выводы

Созданная ботсадом МГУ уникальная коллекция пионов и накопленный за много лет теоретический потенциал коллективов ботанического сада и лаборатории биологии развития растений, позволяют в настоящее время перейти к разработке конкретных методик интенсивного размножения видов растений, ценных и актуальных для озеленения.

Широкое внедрение в культуру новых, малораспространенных растений с ценными декоративными свойствами, к которым можно причислить пион древовидный и его сорта, тесным образом связано с их способностью к вегетативному размножению. Редкость и дороговизна посадочного материала связана со сложностями, которые возникают при размножении новых сортов. Применение методов микроклонального размножения позволяют сильно сократить трудовые и временные затраты на получение посадочного материала древовидного пиона.

При использовании почек в качестве эксплантов *P. suffruticosa* для размножения в культуре *in vitro*, необходимо знать особенности формообразования куста и учитывать биологию исходных родительских форм сорта.

Полученные нами результаты и данные, доступные в открытой печати, еще раз подтверждают необходимость оптимизации гормональных добавок, применяемых в средах для регенерации и укоренения для каждого нового сорта.

Морфогенез *in vivo* и *in vitro*, микрклональное размножение, онтогенез *Paeonia suffruticosa* Andrews, формирование интродукционных популяций

Morphogenesis *in vivo* and *in vitro*, micropropagation, ontogenesis *Paeonia suffruticosa* Andrews, formation the populations of introduced species

Литература

1. Барыкина Р.П. Жизненные формы пионов и возможные пути их структурной эволюции / Р.П. Барыкина // Вестн. МГУ. Сер.16. Биология – 1979. - N2. - С. 14-26.
2. Жукова И.Г. Прививка древовидного пиона (*Paeonia suffruticosa* Andr.) - анатомическая оценка и прогноз / И.Г. Жукова // Вестник Красноярского ГАУ - 2008. – Вып. 1. - С. 52 - 56.
3. Кабанов А. В. Принципы формирования устойчивых травянистых сообществ. Автореф. дис...канд. биол. наук: 03.00.05 / А. В. Кабанов. - М., 2007. – 22с.
4. Катаева Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М., 1983. - 96с.
5. Криницына А.А. Микрклональное размножение декоративных культур. Пион древовидный (*Paeonia suffruticosa*). (Учебно-методическое пособие) / А.А. Криницына, В.В. Мурашев, А.В. Раппопорт, А.С. Сперанская, М.С. Успенская, О.А. Чурикова. – М.: изд-во Моск. ун-та, 2008. - 40с.
6. Кузеванов В.Я. Ботанические сады как экологические ресурсы / В.Я. Кузеванов, С.В. Сизых // Вестник ИрГСХА, 2010. - Вып. 40. - С. 23 - 36.
7. Носов А.М. Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений / А.М. Носов // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. – М.: Наука, 1991. - С. 5 - 20.
8. Успенская М.С. Пионы (Род *Paeonia* L.) флоры СССР. Автореф. дис...канд. биол. наук: 03.00.05 / М.С. Успенская. – М., 1981. - 22 с.
9. Успенская М.С. Древовидные пионы: выбор, посадка, уход / М.С. Успенская. – М.: «Фитон+», 2007. - 32 с.
10. Beruto M. *In vitro* culture of tree peony through axillary budding / M. Beruto, P. Curir // Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. – Springer, 2007. - P. 477 – 497.
11. Bouza L. Relations between auxin and cytokinin contents and *in vitro* rooting of tree Peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) / L. Bouza, M. Jacques, B. Sotta, E. Miginiac // Plant Growth Regulation, 1994. – V.15. – P. 69 - 73.
12. Halda J.J. The Genus *Paeonia* / J.J. Halda, J.W. Waddick // Timber Press, 2004. - P. 227.
13. Lloyd G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kamia latifolia*, by use of shoot-tip culture / G. Lloyd G., B. McCown // Comb. Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 1980. - V. 30. - P. 421 - 427.
14. Owen H.R., Miller A.R. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations / H.R. Owen, A.R. Miller // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992. – V.28. – P. 147 - 150.
15. Cerna K. Micropropagation of *Paeonia arborea* Donn., syn. *P. suffruticosa* Andr. / K. Cerna, B. Dedicova, D. Borbelyova // Acta fytotechnica et zootechnica, 2001. – 4. Special Number. – P. 51-54.

UDC 582.675:581.143.6

Summary

**MICROCLONAL REPRODUCTION PAEONIA SUFFRUTICOSA ANDREVS
BY THE INTRODUCTION PURPOSE IN URBANOPHYTOCENOSE**

A.A. Krinizina, V.V. Murashov, M.S. Uspenskaya

The botanical garden of the Moscow State University has created unique a collection of plants. Chairs of the higher plants were saved up for many years by enormous theoretical potential. Now it allows developing concrete techniques of intensive reproduction of kinds of the plants valuable and actual for gardening.