

Мякишева Е.П., Бычкова О.В., Мироненко О.Н., Небылица А.В., Полтарацкая Ю.Р.

Создание коллекции *in vitro* сирени обыкновенной (*Syringa L.*)

.....
Электронный научно-производственный журнал
«АгроЭкоИнфо»
=====

УДК 57.084.1; 58.084.1

Создание коллекции *in vitro* сирени обыкновенной (*Syringa L.*)

Мякишева Е.П., Бычкова О.В., Мироненко О.Н., Небылица А.В., Полтарацкая Ю.Р.

*Алтайский государственный университет,
Алтайский центр прикладной биотехнологии*

Аннотация

Представлены результаты исследования по введению в культуру *in vitro* 19 сортов сирени обыкновенной (*Syringa L.*). Основным стерилизующим компонентом являлась перекись водорода (30%). Выход стерильных эксплантов варьировал от 48,0 до 100%, за исключением сорта 'Сумерки'. Уровень жизнеспособности асептических эксплантов в зависимости от сорта варьировал от 66,7 до 100%. Для инициации первичной культуры использовали питательные среды MS + 30 г/л сахарозы + 1,5 мг/л БАП и MS + 30 г/л сахарозы + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л ТДЗ. Доля пролиферирующих эксплантов у сортов 'Валентина Гризодубова' и 'Защитникам Бреста' на среде, содержащей 1,5 мг/л БАП, составила 63,1 и 57,1 %, соответственно. Сорта 'Сумерки', 'Изобилие' и 'Надежда' не проявили сортоспецифичной реакции на гормональный состав среды. Большая часть сортов (68,4%) активно пролифелировали на питательной среде MS + 0,5 мг/л БАП + 0,1 мг/л ТДЗ. Уровень регенерации варьировал от 55,3 ('Огни Донбасса') до 78,6% ('Небо Москвы'). Практические результаты работы легли в основу для формирования коллекции сортов сирени *in vitro*.

Ключевые слова: КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ, *SYRINGA L.*, ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ, *IN VITRO*, СТЕРИЛИЗАЦИЯ, РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ

Введение

Род *Syringa L.* относится к семейству Маслинные (*Oleaceae*), его представляют растения, обладающие высокими декоративными свойствами. Сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris L.*) славится большим разнообразием декоративных сортов и гибридов что придает ей популярность в использовании для озеленения. Однако клонирование

декоративных генотипов генеративным способом невозможно ввиду гетерозиготности вида [1]. В настоящее время силами собственной и зарубежной селекции создано более 2300 сортов, различающихся по окраске, форме, размеру цветков, срокам цветения, габитусу кустов [2].

Популярность и широкое распространение в декоративном садоводстве и озеленении данного вида обеспечивают разнообразие окрасок, массовое цветение, неприхотливость при выращивании. Сирень обыкновенная демонстрирует высокую адаптивную способность к внешним факторам среды и может использоваться при создании культурных ландшафтов, озеленении городов и различных населенных пунктов [3, 4]. Кроме активного использования в озеленении сирень так же используется в парфюмерной и лекарственной промышленности, косметологии, обладает фитонцидными свойствами [5, 6].

В настоящее время активно создаются сортовые коллекции и сортовые фонды сиреней с целью сохранения, обмена, классификации [7-9]. Создание сортовых коллекций с применением современных методов биотехнологии является одним из передовых методов сохранения генофонда. При разработке методов культивирования растений в условиях *in vitro* необходимо учитывать биологические особенности отдельных видов и сортов [10]. Работы по созданию, поддержанию и сохранению растений в живой коллекции *in vitro* имеют большое значение для селекционеров, популяризации и распространении новых сортов, сохранению и классификации имеющихся. В работах по клональному микроразмножению введение в культуру *in vitro*, а также, этапы адаптации являются особенно сложными для данного вида [11].

Целью настоящего исследования является получение асептической культуры сортов сирени обыкновенной для дальнейших работ по созданию живой коллекции *in vitro*.

Материалы и методы

Исследования проводились в 2023–2024 годах в Алтайском центре прикладной биотехнологии (Алтайский государственный университет, г. Барнаул). Методика основывалась на общепринятых классических приемах работы с культурами

изолированных тканей и органов растений. При приготовлении питательных сред, стерилизации инструментов и оборудования, работы в условиях асептики придерживались общепринятых методик [12, 13].

В качестве объекта служили 19 сортов сирени обыкновенной: 'Заря Коммунизма', 'Комсомолка', 'Памяти Колесникова', 'Красавица Москвы', 'Петр Кончаловский', 'Полина Осипенко', 'Московский Университет', 'Сумерки', 'Гортензия', 'Великая Победа', 'Знамя Ленина', 'Валентина Гризодубова', 'Огни Донбасса', 'Мечта', 'Защитникам Бреста', 'Изобилие', 'Надежда', 'Небо Москвы', 'Адмирал Нахимов'. В качестве источников первичной культуры использовали черенки длиной 10-15 мм, взятые от зеленых побегов в I декаде июня.

Для получения асептической культуры проводили поверхностную стерилизацию побегов в три этапа: предстерилизация – промывание в мыльном растворе (10 минут), промывание проточной водой (30 минут); собственно стерилизация (10 минут) с использованием перекиси водорода 30%; постстерилизация – трехкратное промывание эксплантов в стерильной воде (×5 минут).

В качестве основной питательной среды использовали среду по прописи Мурасиге и Скуга (MS) [14] дополненную агаром 7,4 г/л, в качестве источника углевода использовали сахарозу 30 г/л. На этапе введения в культуру *in vitro* использовали два варианта питательных сред: MS + 0,5 мг/л БАП (*6-Benzylaminopurine*) + 0,1 мг/л ТДЗ (*Thidiazuron*) и MS + 1,5 мг/л БАП (*6-Benzylaminopurine*).

Питательные среды автоклавировали при температуре 121°C в течение 20 минут. Стерильные культуры *in vitro* содержались в условиях искусственного освещения 16 часов день / 8 часов ночь, температура воздуха 22-24°C, относительная влажность воздуха 70%. Продолжительность пассажа составляла 28-30 суток.

Эффективность введения в культуру *in vitro* оценивали путем расчета процента стерильных и жизнеспособных микрочеренков от общего числа эксплантов. Эффективность пролиферации на различных вариантах питательных сред оценивали путем расчета процента микрочеренков, пазушные почки, которых проросли и дали первичную культуру микрорастений. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Office 2010.

Результаты исследований и их обсуждение

Многие авторы [15-17] изучают влияние сроков введения в культуру *in vitro* [15] на уровень жизнеспособности и инфицированности эксплантов. Период активного роста побегов является оптимальным для получения стерильной культуры, зависит не только от биологии растения, но и от природно-климатических условий территории региона, где проходят исследования. В работе В.А. Крючковой (2005), посвященной изучению влияния фенофаз развития маточных растений на их инфицированность и приживаемость установлено, что оптимальным периодом для введения в культуру *in vitro* сирени на территории Московской области является июнь. Для территории Красноярского края сроки наступления фенофаз наступают раньше и оптимальным сроком введения в культуру является III декада апреля. [18]. В этот период происходит активный рост побега и обеспечивается максимальная жизнеспособность экспланта.

В виду этого I декада июня, когда исследуемая группа сортов сирени, относящихся к средней группе цветения (исключение сорт 'Знамя Ленина', 'Огни Донбасса' – ранняя и 'Надежда' – поздняя группы цветения) находятся в фенофазе активного роста побегов, является оптимальной для начала работы по созданию активно растущей *in vitro* коллекции.

Одно из главных условий успешного микроразмножения является подготовка эксплантов к последующему введению в культуру *in vitro* [19]. Повысить эффективность введения в культуру помогают такие приемы как выгонка или выращивание маточных растений в условиях закрытого грунта. Это ведет к стимуляции регенерационных процессов в результате попадания организма в стрессовые условия, а также к снижению уровня обсеменения эксплантов патогенными микроорганизмами. Эффективная поверхностная стерилизация, проводимая с целью обеззараживания первичных эксплантов, включает подбор стерилизующего агента, его концентрации, времени экспозиции и т.д., для получения асептической культуры, обладающей максимальной жизнеспособностью.

Эффективность введения в культуру *in vitro* сортов сирени обыкновенной представлена в таблице 1.

Таблица 1. Эффективность введения в культуру *in vitro* сортов сирени обыкновенной

Сорт	Экспланты		
	Всего, шт.	Стерильные, %	Жизнеспособные, %
Заря Коммунизма	25	64,0	87,5
Комсомолка	25	64,0	100
Памяти Колесникова	50	98,0	87,7
Красавица Москвы	50	96,0	85,4
Петр Кончаловский	25	60,0	73,3
Полина Осипенко	25	84,0	85,7
Московский Университет	25	52,0	76,9
Сумерки	25	16,0	100
Гортензия	35	94,3	90,9
Великая Победа	25	100	84,0
Знамя Ленина	30	100	66,7
Валентина Гризодубова	25	92,0	82,6
Огни Донбасса	40	95,0	100
Мечта	25	60,0	96,3
Защитникам Бреста	25	92,0	91,0
Изобилие	25	48,0	83,3
Надежда	25	80,0	90,0
Небо Москвы	25	68,0	82,3
Адмирал Нахимов	11	100	100

Использование зеленых микрочеренков с парой почек (рис. 1А) позволило получить хорошо растущую культуру всех представленных сортов, однако процент стерильности и жизнеспособности, полученных первичных эксплантов, был различен.

Так, Н.В. Кухарчик, отмечает, что для плодовых и ягодных культур уровень стерилизации считается хорошим, если асептических эксплантов 75% и выше [20]. Таким образом, представленную схему стерилизации можно считать эффективной для большинства сортов сирени (57,8%). Минимальное количество стерильных эксплантов удалось получить у сорта 'Сумерки' (рис. 1Б-Г), однако все 4 экспланта оказались жизнеспособными. Максимальная жизнеспособность наблюдалась не только у представленного выше сорта, но и у сорта 'Адмирал Нахимов', 'Огни Донбасса' и 'Комсомолка', при этом последний входил в группу сортов с низкой эффективностью стерилизации. Уровень пролиферации пазушных почек был достаточно высоким и варьировал от 66,7 до 100%, составляя в среднем 87,6%.

Подавляющее число авторов, работающих в области культуры клеток и тканей, отмечают влияние состава питательной среды в т.ч. гормонального. На этапе активации

пазушных почек микрочеренков или меристем, как правило, используют среды, обогащенные цитокининами или синтетическими регуляторами роста цитокининовой природы [21, 22].

В ходе нашего эксперимента использовали питательные среды, различающиеся по содержанию регуляторов роста - содержащие БАП в концентрации 1,5 мг/л, и среду с уменьшенной концентрацией БАП в сочетании с 0,1 мг/л ТДЗ. В зависимости от сорта, развитие пазушных почек на обоих вариантах питательных сред начиналось на 10-13 сутки, на 21 день проводили пассирование микрорастений от донорных микрочеренков на свежую питательную среду (рис. 1Д). На каждом микрочеренке прорастали 1-2 пазушные почки, при этом, корреляционной зависимости от типа питательной среды или сортовой принадлежности выявлено не было.

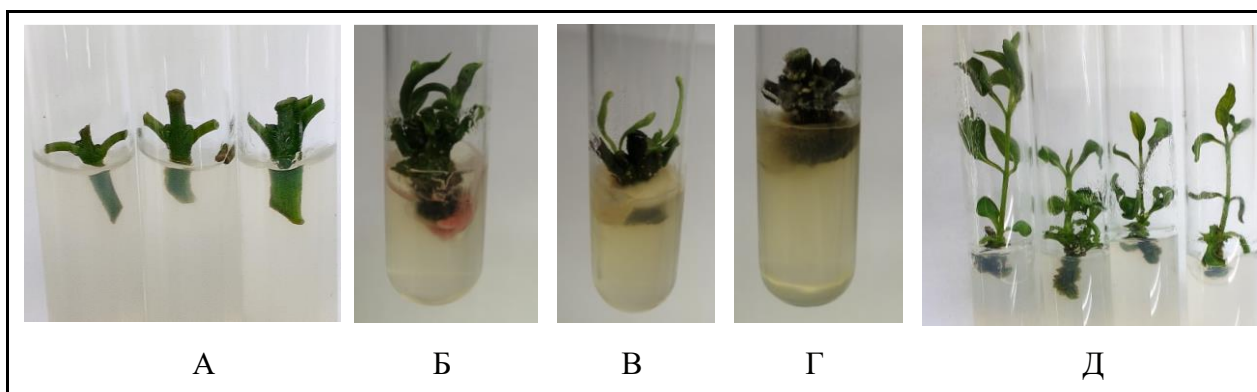


Рис. 1. Микрочеренки сирени на этапе введения в культуру *in vitro*

Примечание: А – стерильные жизнеспособные на 5 день культивирования; Б-Г – бактериальная и грибковая инфекция; Д – проросшие пазушные почки на 21 день культивирования.

Эффективность пролиферации пазушных почек сортов сирени обыкновенной на разных составах питательных сред представлена на рис. 2. Согласно полученным данным наиболее эффективной оказалась среда с одновременным добавлением БАП и ТДЗ. Так, варьирование уровня пролиферации происходило от 36,8 до 78,8%, в среднем составляя 58,4%. Тогда как на среде с 1,5 мг/л БАП данный признак был ниже и в среднем составлял 39,9%, варьируя от 4,8 до 63,1%. В работе Молокановой с коллегами, также отмечено, что на этапе собственно микроразмножения, среда, содержащая регулятор роста ТДЗ, позволяет получить коэффициент размножения выше, чем на средах, содержащих БАП даже в высокой концентрации – 1,5 мг/л [23]. Следует отметить, что при использовании

сред с добавлением ТДЗ на базальной части микрочеренка происходило активное развитие каллусной ткани, которое, однако, не влияло на прорастание пазушных почек. При последующем культивировании на данной питательной среде у ряда сортов к концу пассажа отмечалось скручивание листьев, которое нивелировалось при пересадке на среду без добавления ТДЗ.

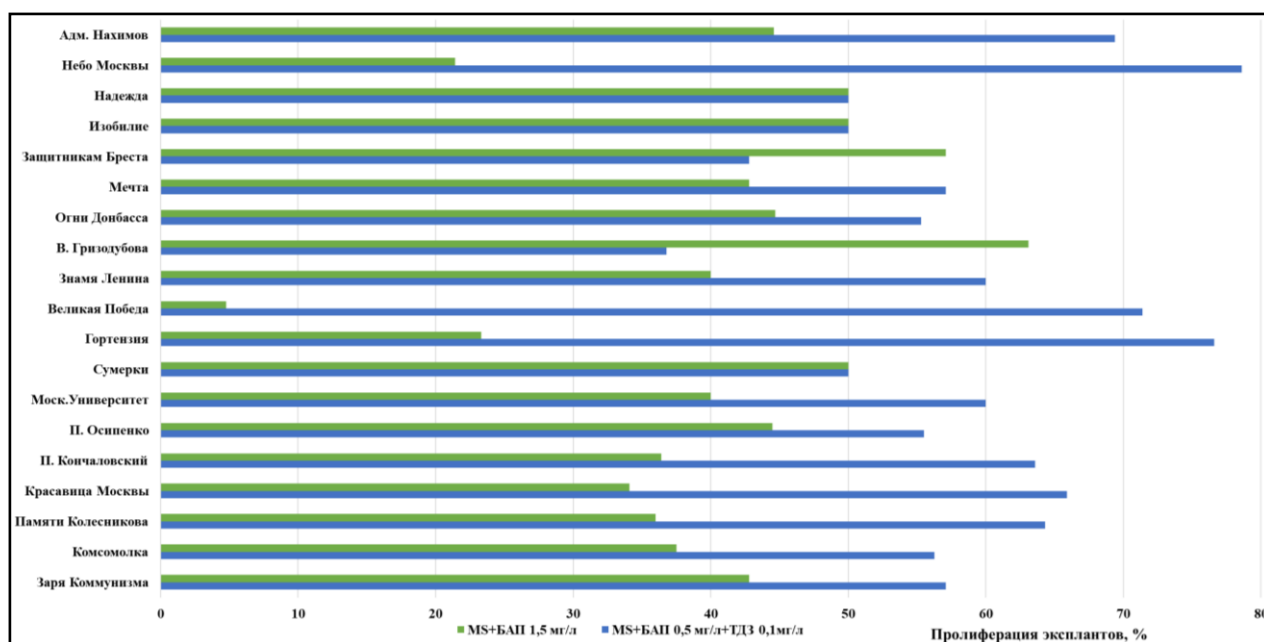


Рис. 2. Эффективность пролиферации эксплантов сирени в культуре *in vitro*, %

При культивировании на обоих вариантах питательных сред ответная реакция сортов 'Сумерки', 'Изобилие', 'Надежда' была идентичной. Регенерация пазушных почек составила 50%. Для таких сортов, как 'Валентина Гризодубова', 'Защитникам Бреста' процент проросших эксплантов на среде без добавления ТДЗ был выше и составлял 63,1 и 57,1%, соответственно.

Далее полученные стерильные микропобеги отделяли от первичного экспланта и субкультивировали на свежих питательных средах. На протяжении первых двух пассажей снижения ростовой активности и потери растительного материала вследствие контаминации отмечено не было. Полученная стерильная культура 19 сортов сирени обыкновенной стала основой для дальнейших исследований по созданию коллекционного фонда в активно растущем состоянии *in vitro*. Полученный растительный материал будет использован для разработки методики клонального микроразмножения сирени

обыкновенной (*Syringa L.*) с учетом сортовых особенностей.

Выводы

Предложенная схема стерилизации первичного растительного материала с использованием 30% раствора перекиси водорода позволила получить в среднем 77,0% асептических эксплантов. При этом, их жизнеспособность варьировала в зависимости от сорта от 66,7 до 100%.

Питательная среда MS, содержащая 0,5 мг/л БАП и 0,1 мг/л ТДЗ оказалась наиболее эффективной для большинства сортов сирени. При инициации первичной культуры *in vitro* для сортов 'Валентина Гризодубова', 'Защитникам Бреста' наибольший процент пролиферации пазушных почек отмечен на среде MS с добавлением 1,5 мг/л БАП. Для таких сортов как 'Сумерки', 'Изобилие', 'Надежда' процент пролиферации пазушных почек на обоих вариантах питательных сред составил 50,0%.

Была получена стерильная культура 19 сортов сирени, которая является основой для последующей работы по формированию коллекции *in vitro*.

Благодарности:

Данное исследование выполнено в рамках реализации Программы развития университета на 2021–2030 годы по программе стратегического академического лидерства «Приоритет 2030», проект «Расширение биотехнологической коллекции ценных генотипов декоративных и ягодных культур».

Коллектив авторов выражает свою благодарность частному коллекционеру сирени Привалихиной Ирине Николаевне за предоставленный исходный материал.

Список использованных источников:

1. Fiala J.L. Lilacs: a gardeners encyclopedia. 2-nd. Edition. Timber Press, Inc. Portland, Oregon. –2008. – 416 p.
2. Халлыев Б., Гурбаньязова Н., Якубов О. Сирень обыкновенная: распространение и экология // Вестник науки. – 2023. – №10 (67). – С.737-740.
3. Шакина Т.Н., Иванова Е.В., Ландшафтное размещение сортов сирени из коллекции УНЦ «Ботанический сад» СГУ // *Syringa L.*: коллекции, выращивание, использование. – 2023. – №4 – С.75-80.

4. Карпухин М.Ю., Абрамчук А.В., Особенности применения сирени в ландшафтном дизайне // АОН. – 2020. – №2. – С.7.
5. Рязанова Т.К., Серебрякова А.Д., Куркин В.А. Вклад российских ученых в изучение химического состава и фармакологической активности коры сирени обыкновенной // *Syringa L.*: коллекции, выращивание, использование. – 2022. – №3. – С.91-96.
6. Бобожонов А., Кароматов И. Лекарственное растение сирень обыкновенная // Биология и интегральная медицина. – 2017. – №6. – С.48-53.
7. Пшенникова Л.М., Колодин М.П. Современное состояние коллекции рода *Syringa* в Ботаническом саду-институте ДВО РАН (история создания, таксономический состав) // Бюллетень Ботанического сада-института ДВО РАН. – 2022. – № 28. – С.15-27.
8. Молканова О.И., Цицина Н.В., Королева О. В., Крахмалева И.Л., Мишанова Е.В. Биологическое разнообразие коллекции *in vitro* представителей рода *Syringa L.* в Главный ботанический сад РАН // Матер. междунар. научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия флоры»: – Минск. – 2022. – С. 135–137.
9. Тишкина Е.А., Кожухина И.А. Сорта сирени обыкновенной (*Syringa L., Oleaceae*), культивируемые в ботаническом саду УРО РАН // Леса и хозяйство в них. – 2021. – №4. – С. 75–85.
10. Молоканова О.И. Генетические банки растений в ботанических садах России // Биология растений и садоводство: теория, инновации. – 2009. – №131. – С. 22–27.
11. Аладина О.Н., Аладина А.С., Полякова Т.В., Аладин С.А. Сорты ‘Русской сирени’ в коллекциях, садах и парках // *Syringa L.*: коллекции, выращивание, использование. – 2023. – №4. – С.7-11.
12. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М: ФБК ПРЕСС, 1999. – 160 с.
13. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2014. – 251 с.
14. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassaya with Tobacco Tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – Vol. 15. – N4. – P. 473.
15. Лободина Е.В., Супрун И.И., Тыщенко Е.Л., Беленко Е.А. Влияние сроков отбора эксплантов сирени (*Syringa vulgaris L.*) на жизнеспособность и контаминацию при введении в культуру *in vitro* // Плодоводство и виноградарство Юга России. – 2020. – № 61(1). – С.98-107. DOI 10.30679/2219-5335-2020-1-61-98-107
16. Острикова О.В., Федотова И.Э., Лыкова О.В. Особенности микрклонального размножения отдалённых гибридов вишни на этапе введения в культуру *in vitro* // Ученые записки Орловского государственного университета. – 2014. – №3 (59). – С.169-173.

17. Мацнева О.В., Ташматова Л.В. Оптимизация сроков введения земляники в культуру *in vitro* // Современное садоводство. – 2018. – №2. – С. 78–83. DOI: 10.24411/2312–6701-2018-10210

18. Крючкова В.А. Биотехнологические приемы оптимизации микрклонального размножения и адаптации генотипов сирени (*Syringa vulgaris L.*): автореферат. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 – Москва. – 2005. – 18 с.

19. Шахов В.В., Ташматова Л.В., Мацнева О.В., Хромова Т.М. Эффективность стерилизующих агентов при введении сортов вишни в культуру *in vitro* // Современное садоводство. – 2018. – 4 (28), 2018. – С. 32-37. DOI: 10.24411/2312-6701-2018-10405

20. Размножение плодовых растений в культуре *in vitro* / под общ. ред. Н. В. Кухарчик. – Минск: Беларуская навука, 2016. – 208 с.

21. Семенова Д.А., Крахмалева И.Л., Мишанова Е.В., Молканова О.И., Митрофанова И.В. Особенности регенерации перспективных сортов *Actinidia arguta* в культуре *in vitro* // Таврический вестник аграрной науки. – 2023. – № 1(32). – С. 93-103. DOI: 10.5281/zenodo.7898485.

22. Амброс Е.В., Чертенкова Е.И., Толузакова С.Ю., Трофимова Е.Г., Новикова Т.И. Влияние антиоксидантов и регуляторов роста на органогенез побегов в культуре апикальных меристем *Fragaria × ananassa (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier* // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2021. – Т. 11. – № 4. – С. 549-560. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2021-11-4-549-560>.

23. Молканова О.И., Чурикова О.А., Коновалова Л.Н., Окунева И.Б. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris L.* // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2002. – № 4. – С. 8-14.

Цитирование:

Мякишева Е.П., Бычкова О.В., Мироненко О.Н., Небылица А.В., Полтарацкая Ю.Р. Создание коллекции *in vitro* сирени обыкновенной (*Syringa L.*) [Электрон. ресурс] // АгроЭкоИнфо: Электронный научно-производственный журнал. – 2024. – № 4. – Режим доступа: http://agroecoinfo.ru/STATYI/2024/4/st_410.pdf