

derived from primordial leaves // Hort Science. – 1988. – Vol. 23. – P. 1055-1056.

17. *Tetsumura T.* Effect of tupes of cytokinin used vor *in vitro* shoot proliferation of persimmon on the subsequent rooting of shoots // Acta Hort. – 1997. – Vol. 436. – P. 143-148.

18. *Wood B.W.* Axillary shoot abscission in pecan and its relationship to growth regulators // Journal of American Society of Horticultural Science. – Vol. 113. – P. 713-717.

Статья поступила в редакцию 01.08.2016 г.

Ivanova N.N., Mitrofanova I.V., Khokhlov S.Yu. Various regeneration ways of *Diospyros kaki* Thunb. cultivar “Zolotistaya” *in vitro* // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 24-30.

The article covers study analysis of such growth regulators influence as 6-benzylaminopurine (BAP) and indoline-3- butyric acid (IBA) on regeneration of microshoots from vegetative buds of *Diospyros kaki* Thunb., cultivar Zolotistaya. Increasing concentration of biologically active substances (BAS) significantly influenced on regeneration of microshoots and much more intensified if IBA was added into culture medium MS with half concentration of such macroelements as KNO₃ and NH₄NO₃. Maximum rate of shoots regeneration (75%) was obtained in medium ½ MS, supplied with 8,80 mkM BAS and 0,98 mkM IBA in 8 weeks after experiment was launched. The findings reveal that active regeneration of *Diospyros* microshoots *in vitro* is possible if to enrich culture medium with BAS and IBA. The article presents results of primary stages of microshoots regeneration applying leaf excision as initial explants. 6,0 and 9,0 mkM of thidiazuron (TDZ) in culture medium favored further formation of morphogenic callus and organogenesis. Based on leaf excision 6-8 *Diospyros* (“Zolotistaya” cultivar) microshoots became experiment result.

Key words: *Diospyros; explants; growth regulators; microshoot; organogenesis*

УДК 581.165

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *LABURNUM ANAGYROIDES* MEDIC.

Светлана Николаевна Тимофеева¹, Ольга Ивановна Юдакова²,
Анна Игоревна Степанова²

¹ УНЦ «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени
Н.Г. Чернышевского, г. Саратов
410010, г. Саратов, ул. Навашина, 1
timofeevasn@mail.ru

² Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, г. Саратов
410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83
yudakovaoi@info.sgu.ru

Изучены особенности клонального микроразмножения *Laburnum anagyroides* Medic. (сем. Leguminosae) с использованием тканей сеянцев на среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП. Проведен гистологический анализ морфогенеза. Показано, что развитие пазушных и адвентивных побегов является результатом пролиферативной активности меристем первичного экспланта. Для увеличения количества получаемого посадочного материала по разработанной методике допустимо использование как пазушных, так и адвентивных побегов.

Ключевые слова: бобовник анагировидный; микроразмножение; морфогенез *in vitro*.

Введение

При озеленении городов важно учитывать не только эколого-физиологические особенности растений, но и их эстетические характеристики. Ценными декоративными показателями обладает Бобовник анагировидный или «золотой дождь» (*Laburnum*

anagyroides Medic.) – кустарник или небольшое дерево из сем. *Leguminosae*. Во время цветения многочисленные кисти золотисто-желтых соцветий, длиной до 30 см, буквально осыпают растение. Кроме того, во всех частях растения содержится алкалоид цитизин, широко применяемый в медицинской практике как стимулятор дыхания и кровообращения. Также цитизин входит в состав таблеток «Табекс», используемых для борьбы с курением [2].

L. anagyroides широко культивируется в странах Средиземноморья [4, 9], однако в России он до сих пор встречается главным образом в ботанических садах. Его интродукция часто осложняется малой эффективностью размножения традиционными способами (черенками, прививкой, семенами) [1, 7]. Решить данную проблему можно с привлечением методов клонального микроразмножения. В отделе генетики и репродуктивной биологии УНЦ «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского была разработана методика клонального микроразмножения *L. anagyroides* с использованием вегетативных почек зрелого дерева [13]. Известно, что ювенильные ткани сеянцев в стерильной культуре обычно характеризуются более высоким регенерационным потенциалом [6]. В связи с этим, целью данного исследования было изучение возможности клонального микроразмножения *L. anagyroides* с использованием тканей сеянцев и определение путей морфогенеза побегов в стерильной культуре.

Объекты и методы исследования

Донором растительного материала было 12-летнее деревце *L. anagyroides*, которое растет в полевых условиях УНЦ «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского. Для наших экспериментов семена были собраны в конце сентября, после чего их хранили в темноте при комнатной температуре.

В работе использовали общепринятые в биотехнологии методы культуры тканей [3]. Для поверхностной стерилизации сухие семена помещали в 1% р-р синтетического моющего средства «Ариэль» («Проктер энд Гембел», Новомосковск, Россия), при постоянном помешивании выдерживали 20 мин, промывали 20 мин проточной водой. Для преодоления физического покоя семена заливали горячей водой ($\approx 90^{\circ}\text{C}$), выдерживали в таких условиях 20-30 мин до остывания воды. В стерильных условиях ламинар-бокса семена помещали в 0,1% раствор сулемы (Sigma-Aldrich, Германия) на 15 мин, трижды промывали стерильной дистиллированной водой, после чего семена помещали на поверхность твердой питательной среды.

Для проращивания семян использовали питательную среду Мурасиге-Скуга, MS [10], с добавлением витаминов по прописи среды, 20 г/л сахарозы (Реахим, Россия), 7 г/л агара (Panreas, Испания). В качестве индуктора морфогенеза использовали 6-бензиламинопурин (БАП) (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрации 0,5 мг/л. рН сред был скорректирован до 5,8 – 6,0 до автоклавирования. Среду автоклавировали 20 мин при 120°C .

После раскрытия семядольных листьев и появления первого настоящего листа корни проростков отсекали и экспланты, состоящие из части гипокотыля, пары семядольных листьев и эпикотыля, пассировали на среды для размножения.

Для множественного побегообразования использовали среды различного минерального состава: MS, $\frac{1}{2}$ MS и WPM [10]. В качестве индукторов морфогенеза были изучены БАП (0,5; 2,0 и 4,0 мг/л) и тидиазурон (ТДЗ) (Sigma-Aldrich, Германия) (0,5; 2,0 и 4,0 мг/л). Все среды содержали витамины по прописи соответствующей среды, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара. Всего было использовано 10 вариантов сред.

Для проращивания семян использовали чашки Петри, последующие этапы размножения осуществляли в стеклянных колбах объемом 200 мл. Как в чашки Петри, так и в колбы добавляли по 25 мл питательной среды. Культуры выращивали в культуральной комнате при температуре $24 \pm 2^\circ\text{C}$ при 14 ч фотопериоде, используя Osram Fluora лампы (3 клк).

Продолжительность каждого субкультивирования составляла 8 недель. По окончании субкультивирования учитывали количество эксплантов, из которых образовывались побеги, количество и длину вновь образовавшихся побегов, наличие/отсутствие каллусной ткани. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ AGROS.

Морфогенез побегов изучали на гистологических препаратах, приготовленных по разработанной нами ускоренной методике с использованием техники просветления растительных тканей [5]. Экспланты фиксировали ацетоалкоголем (3:1) темпорально через 4, 5, 6, 7, 8 недель, 3 и 4 месяца после пассирования. Зафиксированные экспланты промывали проточной водой в течение 1 сут, затем помещали их в пробирки Эпиндорфа с глицерином, где выдерживали не менее 5 сут. После этого на предметном стекле с помощью лезвия делали вертикальные и горизонтальные срезы экспланта толщиной около 0,5 мм. Полученные срезы переносили на другое предметное стекло в каплю просветляющей жидкости Герра [8], закрывали покровным стеклом. Препарат помещали в чашку Петри и оставляли на 3 – 5 сут для просветления. Анализ препарата проводили с помощью стереомикроскопа «Discovery» (С. Zeiss, Германия). Фотографирование препарата осуществляли с использованием фотоадаптера Canon и программы визуализации изображения Zoombrauser.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что через 4 недели первичного культивирования проросло $85 \pm 5\%$ семян. Большинство проростков не имели аномалий развития. Для микроразмножения использовали только нормально развитые проростки.

После переноса на среды для размножения экспланты начинали активно расти и развиваться. Одновременно с ростом первичного и пазушных побегов в базальной части экспланта формировалась каллусная ткань. На всех изученных вариантах сред из всех инициированных эксплантов (100%) образовывались как побеги, так и каллус. Однако состав питательной среды существенно влиял на количество и длину вновь образующихся побегов (Табл.). Среднее количество вновь образующихся побегов варьировало от 3,0 до 4,7, средняя длина побегов – от 11,0 до 29,7 мм. Максимальное число побегов (4,7) было зафиксировано на среде MS с добавлением 0,5 мг/л БАП. Максимальная средняя длина побегов (29,7 мм) – на среде MS с добавлением 2,0 мг/л БАП.

Таблица

Влияние состава питательной среды на микроразмножение побегов *L. anagyroides*

минеральный состав	Питательная среда		Количество побегов, шт.	Длина побегов, мм
	цитокинин, мг/л			
1	БАП	ТДЗ	4	5
MS	0,5		4,7 d	21,5 d
	2,0		3,1 ab	29,7 e
	4,0		3,4 ab	14,5 bc
		0,5	4,4 cd	16,7 c
		2,0	3,1 ab	15,8 bc
		4,0	3,2 ab	15,5 bc

Продолжение таблицы				
1	2	3	4	5
½MS	0,5		3,5 abc	16,8 с
	2,0		3,2 ab	16,9 с
WPM	0,5		4,1 bcd	11,0 a
	2,0		3,0 a	13,0 ab
<i>F</i>			4,5*	28,1*

Примечание: Средние значения по двум повторностям, в каждой повторности по 10 эксплантов. Данные, обозначенные разными буквами в одном столбце, достоверно различаются друг от друга при $P \leq 0.05$ по результатам однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA, Duncan's Multiple Range Test). * $P \leq 0.05$.

При культивировании на среде MS как БАП, так и ТДЗ в концентрации 0,5 мг/л стимулировали развитие максимального количества побегов (4,7 и 4,4, соответственно), при этом средняя длина побегов на среде с БАП была достоверно выше (21,5 мм), чем на среде с ТДЗ (16,7 мм). Кроме того, на среде с БАП развивались нормальные побеги, тогда как на среде с ТДЗ формировались побеги с различными морфозами (недоразвитие листовых пластинок, «бутылочное» разрастание базальной части побега, сильно сближенные междоузлия). Аналогичные данные были получены в культуре семян *Cassia siamea* (Leguminosae) [12]. Следует отметить, что на средах различного минерального состава цитокинины БАП и ТДЗ в низких концентрациях (0,5 мг/л) стимулировали формирование максимального количества побегов. С увеличением концентрации цитокинина в среде количество и длина вновь образующихся побегов уменьшались, появлялись признаки витрификации тканей.

Тестирование сред различного состава показало, что среда MS, дополненная 0,5 мг/л БАП, является оптимальной как для инициации стерильной культуры, так и для собственно микроразмножения побегов. При помещении побега на вышеуказанную среду в базальной части побега через 4–5 недели культивирования появлялась каллусная ткань светло-желтого цвета, которая активно нарастала одновременно с ростом и развитием первичного и пазушных побегов. Через 6–7 недель в каллусной ткани формировались плотные округлые структуры, из которых затем прорастали адвентивные побеги (в среднем 4–5 побегов). Через 8 недель эксплант, как правило, представлял собой конгломерат побегов разного возраста и стадий развития (Рис.).

Как известно, развитие побегов в стерильной культуре может быть результатом прямого органогенеза из тканей экспланта или непрямого органогенеза из каллуса. В последнем случае существует риск соматоклональной изменчивости [6]. Для определения путей морфогенеза нами было проведено гистологическое исследование эксплантов.

Анализ продольных срезов эксплантов, зафиксированных через 4 недели культивирования на среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП, показал гистологическую неоднородность каллуса. Верхняя часть его состояла из недифференцированных клеток. Центральную область занимала разросшаяся в зоне среза базальная часть побега. Она состояла из паренхимных клеток сердцевин и проводящих пучков. Форма и анатомическое строение гипертрофированной части побега свидетельствуют о том, что разрастание явилось результатом пролиферативной активности как клеток камбия, так и клеток феллогена, перимедулярной зоны сердцевин и лучевой паренхимы. Нижняя часть каллуса была представлена двумя слоями клеток: темноокрашенными клетками феллемы и светлоокрашенными клетками феллодермы.

Через 6–7 недель культивирования базальная часть первичного побега продолжала разрастаться за счет увеличения объема формирующихся проводящих пучков. Через 7–8 недель на проводящих пучках образовывались глобулярные

структуры. Они представляют собой очаги повышенной пролиферативной активности, дающие начало адвентивным побегам.

Через 3 – 4 месяцев культивирования количество зон повышенной пролиферативной активности, способных дать начало адвентивным побегам, продолжало возрастать и достигало нескольких десятков, что свидетельствует о высокой регенерационной способности культуры *L. anagyroides*.

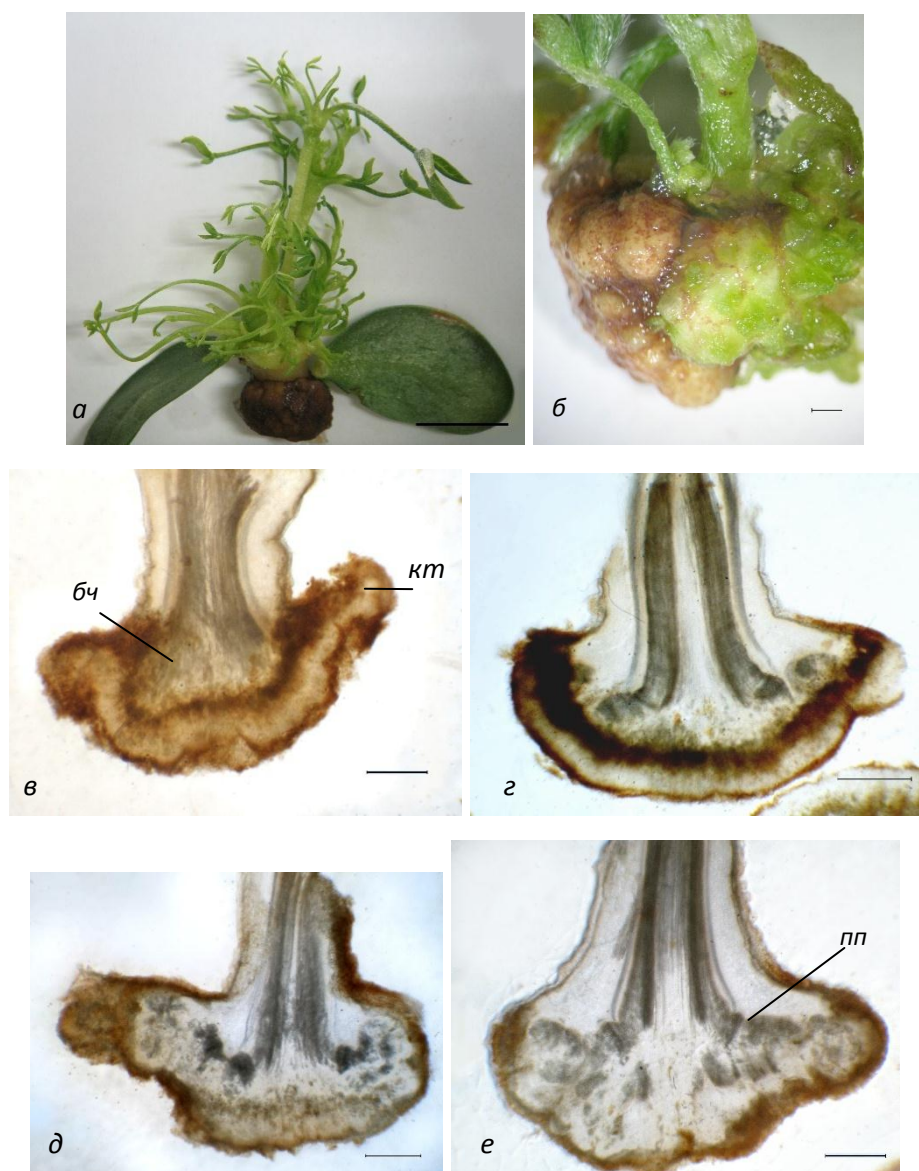


Рис. Культура побегов *L. anagyroides*, полученная на среде MS с добавлением 0,5 мг/л БАП:
a – побеги и калусная ткань, развившиеся через 6 недели культивирования; *б* – глобулярные структуры, сформировавшиеся в калусной ткани (8 недель культивирования); *в* – калусная ткань (*кт*), сформировавшаяся в базальной части (*бч*) экспланта (4 недели культивирования); *г-е* – пролиферация базальной части первичного побега внутри каллуса и дифференциация в ней проводящих пучков (*пп*) (6, 7 и 8 недель культивирования, соответственно). Масштаб: *a* – 1 см; *б-е* – 0,1 см

Выводы

Проведенное исследование показало, что питательная среда MS, дополненная 0,5 мг/л БАП, является оптимальной для клонального микроразмножения *L. anagyroides* в культуре семян. Результаты проведенного гистологического анализа позволяют констатировать несколько последовательных этапов морфогенеза на данной

питательной среде. Пролиферативная активность клеток феллогена, камбия, перимедулярной зоны сердцевины, клеток лучевой паренхимы приводит к формированию каллуса, нижняя часть которой подвергается опробковению за счет дифференциации клеток феллемы. В каллусе происходит инициация проводящих пучков, на которых образуются очаги с повышенной пролиферативной активностью, дающие начало адвентивным побегам. Таким образом, все вновь образующиеся побеги (как пазушные, так и адвентивные) являются результатом пролиферативной активности меристем первичного побега и могут быть использованы для массового размножения растительного материала *L. anagyroides*.

Список литературы

1. Балабушка В.К. Результаты испытания регуляторов роста при размножении древесных интродуцентов летними черенками / В.К. Балабушка // Бюлл. ГБС. – 1990. – Вып. 156. – С. 65 – 67.
2. Волынский Б.Г., Бендер К.И., Фрейдман С.Л., Богословская С.И., Глазырина Г.А., Капрелова Т.С., Колоскова И.Г., Кузнецова С.Г., Мартынов Л.А., Хлебников А.Н., Хохлова Д.С. Растения в медицине. – Саратов: изд-во Саратов. ун-та, 1983. – 440 с.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. Думка, 1980. – 488 с.
4. Колесников А.И. Декоративная дендрология. – М.: Лесная промышленность, 1974. – 704 с.
5. Юдакова О.И., Гупорова О.В., Беляченко Ю.А. Методы исследования репродуктивных структур и органов растений. – Саратов: изд-во Саратов. ун-та, 2012. – 38 с.
6. George E.F., Hall M.A., De Klerk G.-J. Plant Propagation by Tissue Culture. – Springer, 2008. – 300 p.
7. Hartmann H.T., Kester D.E., Davies F.T., Geneve R. Plant propagation: principles and practices. – Verlag, 2010. – 864 p.
8. Herr Jm.J.M. A new clearing-squash technique for study of ovule, development in angiosperms // Amer. J. Bot. – 1971. – Vol. 20, № 8. – P. 785 – 790.
9. Heywood V.H. Flowering plants of the world. – Batsford: BT Londres, 1993. – 336 p.
10. Lloyd G., McCown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Comb Proc Intl Plant Prop Soc. – 1980. – Vol. 30. – P. 421 – 427.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473 – 497.
12. Parveen S., Shahzad A., Saema S. In vitro plant regeneration system for *Cassia siamea* Lam., a leguminous tree of economic importance // Agrofor Syst. – 2010. – Vol. 80. – P. 109 – 116.
13. Timofeyeva S.N., Elkonin L.A., Tyrnov V.S. Micropropagation of *Laburnum anagyroides* Medic. through axillary shoot regeneration // In Vitro Cell Dev Biol. Plant. – 2014. – Vol. 50. – P. 561 – 567.

Статья поступила в редакцию 09.08.2016 г.

Timofeyeva S.N., Yudakova O.I., Stepanova A.I. Histological aspects of clonal micropropagation of *Laburnum anagyroides* Medic // Bull. of the State Nikit. Botan. Gard. – 2016. – № 120. – P. 30-35.

The special features of clonal micropropagation of *Laburnum anagyroides* Medic. (Leguminosae) were studied, based on cultivation of seedlings explants on the MS medium supplemented with 0.5 mg/l BAP. The histological study of the explant tissue to determine morphogenesis pathways was conducted in terms of the research. It was found that axillary and adventitious shoots arise as a result of proliferation of meristematic tissues of primary explant. Axillary and adventitious shoots may be used to increase the efficiency of micropropagation.

Keywords: *Laburnum anagyroides*; micropropagation; morphogenesis in vitro