

## КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ МИНДАЛЯ ТРЕХЛОПАСТНОГО (*PRUNUS TRILOBA* LINDL.)

А.В. Рудиковский, К.З. Гамбург

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, [rudikovalex@mail.ru](mailto:rudikovalex@mail.ru), [gamburg@sifibr.irk.ru](mailto:gamburg@sifibr.irk.ru)

**Аннотация.** Разработан протокол клонального микроразмножения высоко декоративного растения – миндаля трехлопастного. Успешное размножение было достигнуто с использованием питательной среды, содержащей ½ минеральных солей МС, 2% сахарозы, тиамин 1, пиридоксин 0.5, никотиновая кислота 0.5, БАП 0.5, ИМК 0.1, агар 6000 мг/л. Укорененные стебельки адаптировали к условиям теплицы в стерильных контейнерах со стерильными торфяными таблетками в течение двух недель, а затем подращивали в теплице. Рассадку выращивали в открытом грунте в течение двух лет, после чего они были пригодны для озеленения.

**Ключевые слова:** *Prunus triloba* Lindl., клональное микроразмножение

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1353-1357

Луизеания трехлопастная (*Prunus triloba* Lindl.) – это декоративное кустовое растение, которое обильно цветет в течение двух недель до распускания листьев. Махровая форма (*Louiseania triloba* (Lindl.) Pachom. f. plena) еще более декоративна (рисунок). Она была впервые обнаружена в Китае в 1851 году [Lu, Bartolomew, 2003]. Произрастает в Китае и Северной Корее в горных лесах на высоте 600-2000 м. В настоящее время она широко используется как высоко декоративное растение во многих странах [Kalinina, Brown, 2007; Глаз и др., 2014].



**Рисунок.** Цветущая луизеания.

Луизеанию размножают семенами, зелеными черенками, отводками и прививками [Kalinina, Brown, 2007; Глаз и др., 2014]. Однако такое размножение требует больших

трудовых затрат и много времени. Кроме того, махровая форма не образует семян, и ее черенки практически не способны к укоренению. Клональное микроразмножение можно было бы использовать вместо способов, указанных выше, но оно было описано только в одной публикации [Kalina, Brown, 2007], и неизвестно, годится ли этот протокол для махровой формы и для условий нашего региона.

Исходные растения были доставлены в Иркутск из Ботанического Сада–Института Дальневосточного Научного Центра РАН (Владивосток) и распространились на частных участках путем прививки на песчаную вишню (*Prunus tomentosa* (Thunb.) Wall)).

Исходные вегетативные ветки были взяты в июне 2014 года с растения, показанного на рисунке. Апикальные отрезки длиной 5 см с удаленными листьями промывали водопроводной водой в течение 30 минут, инкубировали в 70%-ном этаноле 30 сек и затем в 0.5% растворе NaOCl с Твин 20 15 мин. После 4-х кратной отмычки стерильной водой апексы длиной 1 см высаживали в пробирки 20×150 мм с 10 мл среды для интродукции (таблица). Пробирки находились 3 дня в темноте и затем переносились в ростовую комнату с 23 °С и освещением 16 часов в сутки люминесцентными лампами с интенсивностью 25  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Появляющиеся конгломераты, состоящие из каллуса и побегов, разделяли на 3-4 части и пересаживали в стеклянные банки для детского питания объемом 200  $\text{cm}^3$  с 30  $\text{cm}^3$  питательной среды для размножения (таблица) и культивировали 25-30 дней. После этого проводили следующий цикл размножения.

Для того, чтобы получить достаточно длинные побеги, культивирование, предшествующее укоренению, проводили на среде без БАП. Отделенные побеги длиной 1.5-2 см укореняли на среде для укоренения (таблица).

Таблица.

Питательные среды для культивирования луизеани *in vitro*

Компоненты (мг $\text{дм}^{-3}$ )	Интродукция	Размножение	Укоренение
МС*	1	1/2	WPM
Сахароза	30000	20000	30000
Тиамин	1	1	1
Пиридоксин	0.5	0.5	0.5
Никот. к-та	0.5	0.5	0.5
БА**	0.25	0.5,	0
ИМК**	0.25	0.05	0.5
ГК**	0.1	0	0
ДТТ	5	0	0
ДЭДТК**	0	5	5
Агар	7000	6000	6000

\*минеральные соли среды Мурашиге и Скуга [Murashige, Skoog, 1962; Lloyd, McCown, 1980]; \*\*БА – N6-бензиладенин, ДТТ – дитиотреитол (вносили после автоклавирования), ИМК – 3-индолилмасляная кислота, ГК – гибберелловая кислота, ДЭДТК – диэтилдитиокарбамат натрия – антиоксидант.

Укорененные побеги высаживали в стерилизованные торфяные таблетки (“gi-fi”, диаметр 24 мм), увлажненные солевой средой  $\frac{1}{2}$  WPM, помещали в стерильные сосуды “Magenta-G7” (Sigma-Aldrich) и культивировали в ростовой комнате 10-15 дней. Растения адаптировали к наружному воздуху, открывая крышки сосудов, постепенно увеличивая продолжительность открывания. Адаптированные растения пересаживали в пластиковые стаканы с грунтом объемом 200  $\text{cm}^3$  и культивировали в теплице при

естественном освещении. Через 15-20 дней полученную рассаду переносили в открытый грунт.

При размножении луизеании *in vitro* происходило образование и увеличение размеров конгломератов, состоящих из каллуса, множества мелких регенерантов и некоторого числа регенерантов с удлинённым стеблем. При этом оказалось, что уменьшение концентрации солей среды МС в 2 раза способствует лучшему образованию одиночных удлинённых стеблей. Некоторая часть конгломерата отмирала в ходе культивирования и приобретала бурю окраску. Новые регенеранты возникали в основном на той части конгломерата, которая была погружена в питательную среду. Иногда на этой же части появлялись корни, которые не были связаны напрямую со стеблевыми регенерантами.

Показано что в отсутствие БА у конгломератов имелось некоторое число удлинённых стеблей, значительная часть конгломератов была некротизирована (до 80%), регенеранты в агаре отсутствовали, и в 8 культуральных сосудах, в которые было высажено по 2-3 эксплантата, появился лишь один корень. Это позволяет считать, что в отсутствие БА размножение луизеании не может происходить.

При введении БА в питательную среду число удлинённых регенерантов увеличивалось, а отмирание в конгломератах уменьшалось, и происходило новообразование регенерантов в агаре. Значимое различие между концентрациями БА наблюдалось в отношении новообразования регенерантов, которое было выше при 0.5 мг/л. При 0.25 мг/л БА происходило образование 3-х корней на 9 сосудов, а при 0.5 мг/л БА корни не появлялись. Можно сделать вывод, что для размножения луизеании 0.5 мг/л БА предпочтительнее по сравнению с 0.25 мг/л. Более высокая концентрация БА (1 мг/л) подавляла удлинение одиночных стеблей в конгломератах и не использовалась в дальнейшем для размножения луизеании.

*Оптимизация среды для укоренения.* Для получения корней стебли длиной 1 см и более, образовавшиеся на среде для размножения, срезали и высаживали по 4-5 штук в банки с 30 мл среды для укоренения, в которую была включена ИМК (0.5 и 1 мг дм<sup>-3</sup>), а БА был исключен (таблица). На среде без ИМК на стеблях корни не появлялись. Через 16 дней после высадки на эти среды более 60% стеблей образовывали корни при обеих концентрациях ИМК. Это несколько слабее, чем у других растений, где % укоренения достигал 95-100%. Отчетливая разница наблюдалась по числу корней на 1 стебель, где преимущество концентрации ИМК 0.5 мг/л было статистически значимым при  $p < 0.05$ . Разница по длине корней также была в пользу концентрации 0.5 мг/л, но она была недостаточно значимой.

*Оптимизация условий для акклиматизации.* Неоднократные попытки провести акклиматизацию укоренённых *in vitro* стеблей в нестерильном грунте оказались неудачными, потому что большинство высаженных растений заплесневали и погибали. Kalinina, Brown [2007], по-видимому, тоже столкнулись с этой проблемой. Вероятно, поэтому они проводили адаптацию выращенных *in vitro* растений в стерильных условиях в сосудах "Magenta" с вермикулитом. Мы тоже решили применить такой способ адаптации. Акклиматизированные растения продолжали вегетировать и в дальнейшем при пересадке в нестерильный грунт и пересадки в открытый грунт. Особенностью полученных растений явилось то, что они долго не удлинялись и с трудом осуществляли новообразование листьев. Лишь к концу вегетационного периода они превращались в одностебельные растения со стеблями длиной 25-40 см. Следует отметить, что конечный выход стеблевых грунтовых растений составлял 25-30% от числа стеблей, использованных для укоренения. Тем не менее, и этот результат можно считать удовлетворительным. Возможно, в дальнейшем можно будет подобрать условия для более эффективного укоренения и акклиматизации.

Большинство растений успешно перезимовали и продолжили расти на следующий год. Весной 2017 года были высажены на постоянное место.

В результате проведенного изучения мы установили, что луизеанию махровой формы можно размножать на среде, содержащей  $\frac{1}{2}$  минеральных солей МС, 2% сахарозы, тиамин 1, пиридоксин 0.5, никотиновая кислота 0.5, БАП 0.5, ИМК 0.1, агар 6000 мг/л. Укоренение образовавшихся стеблевых регенерантов происходило успешно на среде WPM с ИМК 0.5 мг/л. Первоначальный этап акклиматизации необходимо было проводить в стерильных контейнерах со стерильными торфяными таблеткам (“gifi”), увлажненными половинной дозой солей WPM в течение двух недель. После этого адаптированные растения превращались в рассаду, пригодную для высадки в открытый грунт. Растения успешно пережили зиму 2016-2017 гг. и некоторые из них даже зацвели весной.

Особенностью луизеании явилось то, что при превращении культивируемых *in vitro* укорененных стебельков в рассаду они долго оставались в виде розетки листьев, и стебли не удлинялись. Удлинение стебля начиналось лишь после высадки в открытый грунт во второй половине лета. Выдерживание рассады, полученной в сентябре, в холодном погребе в течение зимы приводило к появлению способности к удлинению стебля весной. Можно полагать, что получаемые в культуре *in vitro* растения не получают полноценных условий для выхода апикальной меристемы из состояния покоя. Отсюда следует вывод, что проводить укоренение *in vitro* и получать рассаду в горшках желательно ближе к осени. Это позволит дать растениям холод в течении зимы и выйти из состояния покоя к весне. Тогда они будут активно расти в течение лета.

Известно, что зеленые и одревесневшие черенки луизеании плохо укореняются [Reighard et al., 1990]. Особенно это характерно для ее махровой формы. Поэтому в большинстве случаев ее прививают на различные подвои, в частности на войлочную вишню (*Prunus tomentosa*). Кроме того, прививка на этот подвой придает растениям устойчивость к вымоканию, которой луизеания не обладает. Однако в случае гибели надземной части возобновление растения происходит за счет подвоя, и его приходится удалять. Укоренение луизеании *in vitro* позволяет получать корнесобственные растения, а устойчивость к вымоканию можно обеспечивать другими методами. Важно отметить, что уже сейчас описанный в этой статье метод применим для промышленного размножения луизеании для зеленого строительства в населенных пунктах страны.

#### Литература

Глаз Н.В., Раздобреева В.А., Рязанцева А.А. Изучение развития луизеании в Ботаническом саду ТОГУ// Ученые заметки ТОГУ – 2014.– Т. 5, № 2. – С. 58–65.

Kalinina A., Brown C.W. Micropropagation of ornamental *Prunus* spp. and GF305 peach, a *Prunus* viral indicator // Plant Cell Reports. – 2007. – V. 26, No. 7. – P. 927–935.

Lu L.T., Bartolomew B. 3. *Amygdalus triloba* (Lindley) Ricker // Flora of China. — 2003. – V. 9. – P. 392–393.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.

Reighard G.L., Cain D.W., Newall, Jr.W.C. Rooting and survival potential of hardwood cuttings of 406 species, cultivars, and hybrids of *Prunus* // Hortscience. – 1990. – V. 25, No. 5. – P. 517–518.

## CLONAL MICROPROPAGATION OF *PRUNUS TRILOBA* LINDL. (FLOWERING ALMOND)

A.V. Rudikovskii, K.Z. Gamburg

Siberian institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, [rudikovalex@mail.ru](mailto:rudikovalex@mail.ru), [gamburg@sifibr.irk.ru](mailto:gamburg@sifibr.irk.ru)

**Abstract.** The protocol for clonal micropropagation of one very attractively flowering representative of almond species – *Prunus triloba* Lindl was elaborated. Successful micropropagation was achieved on the medium containing half-dose MS salts, 2% sucrose, thiamin 1, pyridoxine 0.5, nicotinic acid 0.5, N<sup>6</sup>-benzylaminopurin (BAP) 0.5, 3-indolylbutyric acid (IBA) 0.1 mg·dm<sup>-3</sup>. Single shootlets were rooted with the use of the medium containing half-dose WPM salts, 2% sucrose, thiamin 1, pyridoxine 0.5, nicotinic acid 0.5 and IBA 0.5 mg·dm<sup>-3</sup>. Rooted shootlets were weaned in sterile containers with sterilized peat tablets (“gi-fi”) watered with half-dose WPM salts for two weeks and then transformed to transplants by growing them in 200 cm<sup>3</sup> pots in the greenhouse. The transplants were grown in the field during following two years and they were ready for greening after that.

**Keywords:** *Prunus triloba* Lindl, clonal micropropagation