

УДК 581.143.6

КУЛЬТУРА ЗАРОДЫШЕЙ *PAEONIA ANOMALA* L. (*PAEONIACEAE*)© А. А. Зарипова<sup>1\*</sup>, И. Ф. Шаяхметов<sup>2</sup>, Р. К. Байбурина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ботанический сад-институт Уфимского научного центра РАН  
Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, 450080, ул. Полярная, 8.  
Тел./факс: +7 (347) 228 13 55.

E-mail: [zaripova.al@mail.ru](mailto:zaripova.al@mail.ru)

<sup>2</sup> Башкирский государственный университет  
Россия, Республика Башкортостан, г. Уфа, 450074, ул. Фрунзе, 32.  
Тел./факс: +7 (347) 273 67 12.

Разработана технология культивирования *in vitro* зародышей *Raeonia anomala* L., позволяющая сократить период прорастания семян, что приводит к ускорению размножения этого вида.

**Ключевые слова:** *Raeonia anomala*, зародыши, культура *in vitro*.

Пион уклоняющийся, *Raeonia anomala* L. (сем. *Raeoniaceae*) – редкое лекарственное растение, находящееся под угрозой исчезновения, численность особей которого уменьшилась до критического уровня [1–3]. Лимитирующими факторами являются рубки леса, выпас скота в лесах и лугах, выкапывание корневищ населением, а также длительное прорастание семян.

Возобновление вида в природных условиях и размножение в интродукционной культуре затруднено в связи с медленным прорастанием семян (2–3 года). Семена *P. anomala* имеют недоразвитый зародыш, который отличается очень низким содержанием физиологически активных веществ и слабой активностью ферментов [4–6]. Кроме того, у *P. anomala* наблюдается продолжительный прегенеративный период развития особей [7], связанный с морфофизиологическим глубоким эпикотильным типом покоя [8, 9].

С целью сохранения и воспроизводства генофонда редких и исчезающих видов растений перед нами была поставлена задача разработать технологию ускоренного размножения *P. anomala* с использованием метода эмбриокультуры.

Материалом для работы служили семена *P. anomala*, собранные с растений, произрастающих в Татышлинском районе республики Башкортостан. Эксплантами являлись изолированные зародыши зрелых семян, которые не вступили в период покоя.

Приготовление и стерилизацию питательных сред для культивирования тканей и органов *P. anomala* проводили согласно предложенным рекомендациям [10, 11].

Перед извлечением зародышей проводили стерилизацию семян по следующей схеме: семена отмывали в мыльном растворе в течение 15 мин, затем промывали проточной водой в течение 10 мин., ополаскивали дистиллированной водой, далее в ламинар-боксе выдерживали в 70%-ном этаноле в течение 1 мин, в 3%-ном растворе перекиси водорода в течение 5 мин., в 0.1%-ном растворе диацетида в течение 20 мин., промывали дистиллированной водой 3 раза по 15 мин.

Зародыши вычленили из семян в асептических условиях ламинар-бокса на поверхности стерильной бумаги. Вдоль семени ближе к халазальному концу делали небольшой надрез семенной кожуры и окружающих зародыш тканей (эндосперм) при помощи ланцета. Затем зародыш извлекали и немедленно помещали в пробирки с питательной средой для избегания подсыхания. Зародыши выделяли осторожно, чтобы не повредить их, так как незначительные повреждения отрицательно сказывались на их развитии в культуре *in vitro*. В течение первых трех-четырех недель пробирки с зародышами находились в темноте при 26°C и относительной влажности воздуха 70%. После образования первичного корешка длиной 2–3 см проростки выставляли на светоплощадку с люминесцентными лампами 3000 лк и температурой 26°C.

Для изучения влияния различных добавок на рост и развитие изолированных зародышей *P. anomala* использовали среды Уайта, Хеллера и Мурасиге-Скуга с сахарозой, глюкозой и различными добавками стимулирующих рост веществ: индолуксусной кислотой (ИУК), индолилмасляной кислотой (ИМК),  $\alpha$ -нафтилуксусной кислотой (НУК), 6-бензиламинопурина (БАП), кокосового молока, дрожжевого экстракта, гидролизата казеина. В наших опытах все вышеперечисленные добавки приводили чаще всего к аномальному развитию зародыша. Наибольшая тератология наблюдалась на средах с ауксинами и дрожжевым экстрактом. При этом корневая система покрывалась каллусной тканью, чрезмерно разрастался гипокотиль, семядоли и почка также очень часто образовывали каллусную ткань. Добавление в питательную среду сахарозы приводило к более интенсивному росту по сравнению с использованием глюкозы. К тому же экономически выгоднее использование сахарозы. Развитие зародышей шло нормально на простой минерально-сахарозной среде Хеллера и с половинной концентрацией минеральных солей среде Мурасиге-Скуга. Всю последующую работу мы проводили с использованием 1/2 состава минеральной среды Мурасиге и Скуга с 2% сахарозы и 0.6% агара.

Были проведены исследования по влиянию глубины погружения зародышей *P. anomala* в питательную среду. Опыты показали, что при помещении зародышей на глубину 0.4–0.5 см от поверхности среды они гибнут через два пассажа, т. е. через 42–45 дней. Если зародыши помещали на поверхности среды, они засыхали. Оптимальное положение зародыша – это частичное погружение в питательную среду на 0.1–0.2 см. Полученные нами результаты согласуются с данными Т. Б. Батыгиной и Р. Г. Бутенко [12].

Таблица 1.  
Влияние размера экспланта на жизнеспособность зародышей *Paonia anomala* L.

№ п/п	Размер зародыша, мм	Жизнеспособные, %	Нежизнеспособные, %
1.	0.3–0.4	40 ± 3.2	60 ± 4.7
2.	0.5–0.6	80 ± 6.7	20 ± 1.2

Зародыши группировали по размерам: от 0.3 до 0.4 мм и от 0.5 до 0.6 мм. Жизнеспособность зародышей зависела от их размера при инокуляции (табл. 1). Хорошо сформированные растения были получены из зародышей размером от 0.5 до 0.6 мм. Присутствие в питательной среде Мурасиге и Скуга фитогормонов не являлось обязательным условием формирования растений из зародышей (табл. 2). Тем не менее, среда с низкими концентрациями цитокинина и ауксина также способствовала развитию зародыша.

Таблица 2.  
Влияние регуляторов роста на развитие зародышей *Paonia anomala* L. в культуре *in vitro*.

№ п/п	Концентрация ауксина, мг/л	Концентрация БАП, мг/л	Развитие проростка
1.	0	0	+
2.	ИМК 0.01	0.1	+
	0.01	0.3	±
	0.01	0.5	–
3.	ИУК 0.01	0.1	±
	0.01	0.3	–
	0.01	0.5	–
4.	НУК 0.01	0.1	±
	0.01	0.3	–
	0.01	0.5	–

Примечание: «+» – активное развитие, «±» – слабое развитие, «–» – деформированный проросток (различные нарушения в развитии).

Нормальный ход развития изолированных зародышей *P. anomala* на среде Мурасиге и Скуга с половинной концентрацией минеральных солей без гормонов выглядит следующим образом. На 5–7 сутки после вычленения зародыша раздвигались семядоли; на 12–14 сутки появлялся корешок; на 25–30 сутки корешок достигал 1.5–2.0 см длины, увеличивались семядоли. После переноса проростков в условия фотопериода через месяц начиналось

позеленение семядолей. Через 40 суток появлялась почка, корешок достигал 3–5 см длины.

В культуре изолированных зародышей *P. anomala* мы получали интенсивное развитие зародышей, активный рост их корневой системы, гипокотила и семядолей, но верхушечная почка проростка, при принятых условиях выращивания (температура 26°C), оставалась в состоянии покоя.

Для выведения из покоя верхушечной почки проростков нами использовано влияние пониженных температур и гибберелловой кислоты. При воздействии низкими положительными температурами (5–6°C) и добавлении в питательную среду гибберелловой кислоты в концентрации 1.0 мг/л первый лист появился через один месяц культивирования *in vitro*, в то время как контрольные растения оставались в семядольном состоянии.

Таким образом, разработанная технология включает асептическое вычленение зародыша, выращивание его на питательной среде Мурасиге и Скуга с половинной концентрацией минеральных солей и выведение из покоя верхушечной почки проростка с применением низких положительных температур и гибберелловой кислоты. Использование метода эмбриокультуры сокращает период прорастания и развития зародышей, что позволяет получить растения *P. anomala* через 1.5–2 месяца после вычленения и культивирования зародышей на искусственной питательной среде вместо 1–2 и более лет при обычном посеве семян в грунт.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мулдашев А. А., Кучеров Е. В., Галеева А. Х. Об охране и рациональном использовании флоры и растительности в северной зоне Башкортостана // Вопросы рационального использования и охраны растений в республике Башкортостан. Уфа: Гилем, 1998. С. 5–18.
2. Мулдашев А. А., Галеева А. Х., Маслова Н. В. Проблемы охраны пиона уклоняющегося (*Paonia anomala* L.) в республике Башкортостан // Проблемы сохранения биоразнообразия на Южном Урале. Уфа: Гилем, 2004. С. 1–11.
3. Красильник книга республики Башкортостан. Т. 1. Редкие и исчезающие виды высших сосудистых растений. Уфа: Китап, 2001. – 280 с.
4. Цингер Н. В. // Тр. Гл. Бот. сада. 1951. Т. II. С. 103–145.
5. Валишина В. П., Цингер Н. В. // Бюлл. ГБС. 1952. Вып. 13. С. 45–47.
6. Попцов А. В., Некрасов В. И., Иванова И. А. Очерки по семеноведению. М.: Наука, 1981. С. 1–113.
7. Игнатьева И. П. // Изв. ТСХА. 1995. Вып. 4. С. 108–134.
8. Николаева М. Г. // Физиология семян. М.: Наука, 1982. С. 125–183.
9. Николаева М. Г., Разумова М. В., Гладкова В. Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л.: Наука, 1985. С. 1–347.
10. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. – 272 с.
11. Калинин В. Ф., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. М.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
12. Батыгина Т. Б., Бутенко Р. Г. // Ботан. журн. 1981. Т. 66. № 11. С. 1531–1547.

Поступила в редакцию 05.07.2006 г.  
Поступила в редакцию после доработки 31.10.2007 г.