

## Перспективная технология размножения платана испанского для зеленого строительства на юго-западе Ростовской области

М.М. Серeda, Б.Л. Козловский, Е.В. Луценко

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону

**Аннотация:** Для введения платана испанского в культуру *in vitro* наиболее эффективно использовать в качестве эксплантов семядольные листья, полученные из трехнедельных проростков. Установлено, что оптимальной средой для индукции каллусогенеза является среда МС с добавлением 2 мг БАП + 0,02 мг 2,4 Д + 0,2 мг ИУК. Эмбриогенез в каллусных клетках платана с довольно высокой частотой индуцируется на среде МС с добавлением 1 мг БАП + 0,1 мг НУК.

**Ключевые слова:** микрклональное размножение, безвирусные растения, платан испанский, зеленое строительство.

Зеленое строительство в Ростовской области остро нуждается в высоко декоративных, быстрорастущих, долговечных и, при этом устойчивых к комплексу неблагоприятных факторов окружающей среды, древесных растениях.

К таким растениям следует отнести малораспространенный в озеленении региона платан испанский или кленолистный (*Platanus × hispanica* Mill. ex Muenchh.). В местной культуре это дерево до 20 м высотой, с широко раскидистой, шатровидной кроной и прямым, стройным стволом. Кора отслаивается крупными пластинами, от чего ствол приобретает красивый пятнистый узор. Листья крупные, плотные, дланевидные, с лопастями, остропильчатыми по краю. Цветки неприметные. Узкопирамидальные семянки собраны в плотные шаровидные соплодия, повисающие на длинных плодоножках. В условиях населенных пунктов юго-запада области достаточно зимостоек. В молодом возрасте подмерзает однолетний прирост, но с возрастом зимостойкость повышается. Не пригоден для озеленения открытых пространств с преобладающими восточными ветрами в зимний период, здесь может вымерзнуть до уровня снегового покрова или почвы. Засухоустойчив. Повреждения вредителями

---

незначительны. На некоторых питомниках юга России заражен раком и другими заболеваниями. Аккумуляции болезней способствует вегетативный способ размножения этого вида (черенкование). Размножение семян непродуктивно и может приводить к утрате свойств исходного образца. Платан испанский цветет в мае, плодоносит в октябре – ноябре. Предпочитает плодородные, хорошо увлажненные почвы. Растет быстро. Декоративная долговечность 40–50 лет. Декоративен корой, красивой кроной, листьями, окрашивающимися осенью в красновато-бронзовые тона и шаровидными плодами, сохраняющимися на ветвях после листопада. Перспективен для одиночных, групповых и аллейных посадок в населенных пунктах юго-запада Ростовской области.

Наряду с необходимостью расширения ассортимента декоративных растений, особую проблему для региона в настоящее время представляет высокая степень поражения древесных культур вредителями и болезнями [1], что приводит к снижению декоративных качеств, сокращению продолжительности онтогенеза, а для ряда видов к гибели. По этой причине ряд древесных пород, таких как березы, черные тополя, вязы и др. стали непригодны для озеленения и исключены из основного и дополнительного ассортимента населенных пунктов юго-запада Ростовской области [2].

Существующая проблема осложняется следующим:

1. В России и мире практически не ведется селекция декоративных растений на устойчивость к вредителям и болезням, за исключением некоторых культур, например, роз;

2. В пределах населенных пунктов невозможно вести эффективную борьбу с вредителями и болезнями растений с помощью химических средств, а биологические методы не дают практических результатов;

3. Для многих вирусных, бактериальных и грибных заболеваний, отсутствуют действенные средства борьбы.

---

Одним из путей решения этой проблемы является повышение резистентности растений путем получения безвирусного материала в процессе микроклонирования. Этот метод хорошо зарекомендовал себя на плодовых культурах [3], но не нашел еще широкого применения в сфере зеленого строительства. Комплексная методика получения посадочного материала, свободного от вирусов и микроорганизмов, включает в себя несколько этапов: выделение меристемы, введение в культуру *in vitro*, микроклональное размножение, укоренение мериклонов, адаптация регенерантов к почвенным условиям. Решающим звеном является процесс введения в культуру эксплантов, взятых с маточного растения и дальнейшее тиражирование материала или микроклонирование.

Поэтому целью работы было разработка технологии размножения платана испанского микроклональным методом. Особым требованием к технологии является ее производительность, которая должна не уступать таковой при размножении платана черенками.

### **Методы и материалы исследования**

Для введения в культуру *in vitro* платана испанского в качестве эксплантов были выбраны фрагменты молодых побегов длиной не более 2 см, молодые весенние листья и фрагменты проростков (семядоли с гипокотилем) на второй неделе развития. Побег собирали со взрослых экземпляров платана испанского в конце февраля 2014 года и ставили на проращивание при  $t$  25 С на свету. Молодые побеги и листья промывались в теплой мыльной воде 20 минут, затем отмывались в проточной воде. Последующие этапы стерилизации осуществлялись в условиях ламинар-бокса. Вначале экспланты обрабатывались 70% раствором этанола, а затем соответствующим стерилизующим агентом, в разных режимах с применением 0,1% сулемы, 5% раствора гипохлорита натрия, либо 3% раствором перекиси водорода. После трехкратно промывались в стерильной

---

дистиллированной воде по 15 минут. Эффективность стерилизации определяли по доле выживших свободных от микроорганизмов эксплантов, выраженной в процентах. Выборка составляла 20 экплантов на каждый вариант опыта.

Для введения в культуру *in vitro* использовалась среда Мурасиге-Скуга [4], широко применяемая для культивирования древесных растений [5-8]. В качестве гелеобразующего средства добавляли 7 г/л агар, кроме того, 30 г/л сахарозы, 6-бензиламинопурина (БАП), тидиазурона (ТДЗ), из ауксинов: индолилуксусную кислоту (ИУК), нафтилуксусную кислоту (НУК), 2,4 – дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д). РН среды доводился до значения 5,8 с помощью 1 М КОН. Стерилизация сред проводилась в автоклаве при температуре 121 °С в течение 20 минут. Культура помещалась в условия 16-часового фотопериода при температуре 25 °С.

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Выбор экспланта для введения в культуру *in vitro*, как правило, определяется целью исследования. Учитывая, что наиболее быстрым способом микрклонального размножения является метод микрочеренкования в асептических условиях, в качестве экспланта первоначально были взяты побеги с 1-2 узлами. Попытки введения в культуру *in vitro* данных экплантов оказались безуспешными. Как правило, на 2-3 неделю культивирования на поверхности побегов обнаруживались микроорганизмы, развивающиеся, по-видимому, из внутренних тканей. Таким образом, исследования были направлены на получение каллусных культур по опыту наших предыдущих работ [9]. Индукцию каллусогенеза пытались осуществить из тканей молодых весенних листьев, взятых из распускающихся почек. Оптимальная схема поверхностной стерилизации таких листьев выглядела следующим образом: 70% спирт – 30 секунд, промывка в стерильной дистиллированной воде – 1 минута, 0,1% раствор

---

сулемы – 5 минут, трехкратная промывка в стерильной дисстилизованной воде – по 15 минут. Варианты поверхностной стерилизации различных эксплантов и ее эффективность отражены в таблице 1.

Таблица № 1.

Эффективность поверхностной стерилизации экплантов платана испанского с применением различных стерилизующих агентов.

Вещество	Экспозиция, минуты	Эффективность стерилизации, %		
		побеги	листья	семядоли
Гипохлорит натрия, 5 %	3	0	10	20
	5	0	15	25
	10	0	10	5
Перекись водорода, 3 %	5	0	1	10
	10	0	5	15
	15	0	7	15
Сулема, 0,1 %	3	0	40	90
	5	0	60	70
	10	2	30	5

Попытки индуцирования каллусообразования на листовых экплантах заключались в применении среды Мурасиге-Скуга с различным сочетанием фитогормонов, что отражено в таблице 2.

Таблица № 2

Индукция каллусогенеза на средах с различным сочетанием фитогормонов

Варианты использования фитогормонов	Листья	Семядоли
Безгормональная среда	-	-
БАП 2 мг/л	-	-
ТДЗ 0,4 мг/л	-	-

БАП 2 мг/л + 2,4 Д 0,02 мг/л + ИУК 0,2 мг/л	+	+
БАП – 2 мг/л + 2,4 Д 0,02 мг/л	+	-
БАП 2 мг/л + ИУК 0,2 мг/л	-	-

На пятой неделе культивирования на фрагментах молодых листовых пластинок отмечалось развитие каллуса. Морфологически каллус описывался, как плотная масса светло-желтого цвета (рис. 1). Наибольший эффект индукции каллуса наблюдался на среде MS в сочетании с фитогармонами БАП – 2 мг/л и 2,4 Д – 0,02 мг/л. Тройная комбинация фитогормонов, таких как БАП – 2 мг/л, 2,4 Д – 0,02 мг/л и ИУК – 0,2 мг/л, также индуцировала каллусообразование, но в существенно меньшей степени. В ходе дальнейшей работы этот вид каллуса не удалось стимулировать к образованию соматических зародышей. По данным Y. Sun и др. [10] в качестве экспланта для получения каллуса успешно можно использовать листья, полученные из семян. Этот метод слишком растянут во времени, поэтому было решено использовать для получения каллуса семядоли с гипокотилем. Семядольные листья платана в условиях темноты на третью неделю образовывали каллусные клетки. Каллусная масса имела плотную структуру светло-серого цвета. Культивирование этого каллуса на свету в течение 2 недель приводило к смене окраски на светло-зеленый (рис.3).

Эксперименты по индукции соматического эмбриогенеза в каллусных клетках платана проводили на разных комбинациях фитогормонов, используя приблизительно равные по массе участки каллусной ткани (табл. 3).

Таблица №3

Частота органогенеза в каллусе платана испанского на среде MS с различными комбинациями фитогармонов

---

№	БАП + НУК, мг	Число очагов соматического эмбриогенеза	Число повторностей
1	1+0,1		10
2	1+0,2		10
3	1+0,3		10
4	2+0,1		10
5	2+0,2		10

Наиболее удачным сочетанием оказалась среда MS с добавлением цитокининов и ауксинов, а именно, БАП — 1 мг и НУК — 0,1. На третьей неделе культивирования на участках каллусной ткани отмечено появление 3-4 морфогенетических очагов, впоследствии, регенерирующих полноценные растения.

### Заключение

В ходе работы выяснено, что для введения платана испанского в культуру *in vitro* наиболее эффективно использовать в качестве эксплантов семядольные листья, полученные из трехнедельных проростков.

Установлено, что оптимальной средой для индукции каллусогенеза является среда MS с добавлением 2мг БАП, 0,02 мг 2,4 Д, 0,2 мг ИУК.

Эмбриогенез в каллусных клетках платана с довольно высокой частотой индуцируется на среде MS с добавлением 1 мг БАП и 0,1 мг НУК.

### Литература

1. Козловский Б.Л., Огородникова Т.К., Федоринова О.И., Куропятников М.В. Оценка устойчивости видов семейства Betulaceae S.F. Gray к болезням при



- интродукции в Ростовской области // Экологический Вестник Северного Кавказа. Т.8, №4. Краснодар, 2012. С. 51-53.
2. Козловский Б.Л., Куропятников М.В., Федоринова О.И. Основной и дополнительный ассортимент древесных растений для зеленого строительства на юго-западе ростовской области // Инженерный вестник Дона, 2013, №2 URL: [ivdon.ru/magazine/archive/n2y2013/1633](http://ivdon.ru/magazine/archive/n2y2013/1633).
3. Knapp E., Câmara Machado A., Pühringer H. Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp. // Journal of Virological Methods. Vol. 55, Iss. 2. 1995, pp. 157-173.
4. Murashige T, Skoog F A revised medium for growth and rapid bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant*. Vol.15. 1962, pp. 473-497.
5. Bonga J.M., Aderkas P. In vitro culture of tree. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 238 p.
6. Kim M.K., Sommer H.E., Bongarten B.C., Merkle S.A. Highfrequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron // *Plant Cell Rep*. Vol.16. 1997, pp. 536-540.
7. Vieitez, A.M., San-José M., Vieitez E. In vitro plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. // *J. Hortic. Sci*. Vol.60. 1985, pp. 99-106.
8. Peternel S., Gabrovsek K., Gogala N., Regvar M. In vitro propagation of European aspen (*Populus tremula* L.) from axillary buds via organogenesis // *J. Hortic. Sci*. Vol.121. 2009, pp. 109-112.
9. Козловский Б.Л., Серeda М.М., Вардуни Т.В., Богословенко М.В. Технология размножения плосковetchника восточного (*Platycladus orientalis* (L.) Franco) для целей зеленого строительства в Ростовской области // Инженерный вестник Дона, 2014, №3 URL: [ivdon.ru/magazine/archive/n2y2014/2386](http://ivdon.ru/magazine/archive/n2y2014/2386).
-



10. Yuehua S., Yanling Zh., Xiaojuan W. Adventitious bud regeneration from leaf explants of *Platanus occidentalis* L. and genetic stability assessment // *Acta Physiol Plant*. Vol. 31. 2009, pp. 33-41.

### References

1. Kozlovskij B.L., Ogorodnikova T.K., Fedorinova O.I., Kuropyatnikov M.V. *Ekologicheskij Vestnik Severnogo Kavkaza*. T.8, №4. Krasnodar, 2012. pp. 51-53.
2. Kozlovskij B.L., Kuropyatnikov M.V., Fedorinova O.I. *Inženernyj vestnik Dona (Rus)*, 2013, №2 URL: [ivdon.ru/magazine/archive/n2y2013/1](http://ivdon.ru/magazine/archive/n2y2013/1)
3. Knapp E., Câmara Machado A., Pühringer H. Localization of fruit tree viruses by immuno-tissue printing in infected shoots of *Malus* sp. and *Prunus* sp. // *Journal of Virological Methods*. Vol. 55, Iss. 2. 1995, pp. 157-173.
4. Murashige T, Skoog F A revised medium for growth and rapid bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol Plant*. Vol.15. 1962, pp. 473-497.
5. Bonga J.M., Aderkas P. *In vitro culture of tree*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1992. 238 p.
6. Kim M.K., Sommer H.E., Bongarten B.C., Merkle S.A. Highfrequency induction of adventitious shoots from hypocotyl segments of *Liquidambar styraciflua* L. by thidiazuron // *Plant Cell Rep*. Vol.16. 1997, pp. 536-540.
7. Vieitez, A.M., San-José M., Vieitez E. *In vitro* plantlet regeneration from juvenile and mature *Quercus robur* L. // *J. Hortic. Sci*. Vol.60. 1985, pp. 99-106.
8. Peternel S., Gabrovsek K., Gogala N., Regvar M. *In vitro* propagation of European aspen (*Populus tremula* L.) from axillary buds via organogenesis // *J. Hortic. Sci*. Vol.121. 2009, pp. 109-112.
9. Kozlovskij B.L., Sereda M.M., Varduni T.V., Bogoslovenko M.V. *Inženernyj vestnik Dona (Rus)*, 2014, №3 URL: [ivdon.ru/magazine/archive/n2y2014/2386](http://ivdon.ru/magazine/archive/n2y2014/2386).



10. Yuehua S., Yanling Zh., Xiaojuan W. Adventitious bud regeneration from leaf explants of *Platanus occidentalis* L. and genetic stability assessment // *Acta Physiol Plant*. Vol. 31. 2009, pp. 33-41.