



УДК 581.143.6:582.475

## Оптимизация протокола микроклонального размножения магнолии Суланжа (*Magnolia × soulangeana* Soul.-Bod.)

М. М. Середя, Е. В. Луценко, А. В. Верещагина

Южный федеральный университет, ул. Ботанический спуск, 7, г. Ростов-на-Дону, 344041, Россия.  
E-mail: seredam@yandex.ru

**Ключевые слова:** культура *in vitro*, микроклональное размножение, ризогенез, фитогормоны, *Magnolia × soulangeana*.

**Аннотация.** Исследование проведено с целью разработки эффективного протокола для микроклонального размножения *Magnolia × soulangeana* Soul.-Bod. (магнолии Суланжа) из пазушных почек. Найдена эффективная схема поверхностной стерилизации почек. Наилучшим стерилизующим раствором оказался тимеразол (мертиолят) в 0,1%-й концентрации. В культуре *in vitro* было испытано несколько вариантов питательных сред с различным сочетанием фитогормонов. В итоге была выявлена наиболее подходящая схема размножения. Наиболее эффективным составом для инициации побегов *in vitro* оказалась среда MS с половинным составом солей. Для мультипликации побегов наиболее подходящей оказалась среда QL с добавлением BAP (1 мг/л). Для стимуляции корнеобразования мериклоны переносили на среду WPM с добавлением НУК (0,5 мг/л). Укоренившиеся побеги адаптировали к тепличным условиям. Для этого использовали субстрат в виде смеси торфа, земли и песка в равных пропорциях. Адаптированные растения высаживали в открытый грунт.

## Optimization of *in vitro* micropropagation for *Magnolia × soulangeana* Soul.-Bod.

M. M. Sereda, E. V. Lutsenko, A. V. Vereshchagina

Southern Federal University, Botanicheskij Spusk st., 7, Rostov-on-Don, 344041, Russia.

**Key words:** *in vitro* culture, *Magnolia × soulangeana*, micropropagation, phytohormones, rhizogenesis.

**Summary.** This study was aimed to develop an efficiently repetitive protocol for micropropagation of *Magnolia × soulangeana* using shoot meristem. The effective scheme of bud surface sterilization was found. In our opinion the best sterilizing agent was thimerosal in concentration of 0,1 %. After growing *in vitro* cultures on different combinations of hormones, mediums supplemented with BAP, IAA, NAA, IBA were found to be most efficient and productive combination for shoot proliferation. MS medium with half salt composition showed itself as the most effective composition for shoot initiation *in vitro*. The most adequate for shoot multiplication was QL medium with adding BAP (1 mg/l). The proliferated shoots were transferred to different root induction media, which resultantly showed that WPM media supplemented with NAA (0.5 mg/l) was the most efficient root inducing media. Rooted plants were adapted to the green house conditions. For these purposes we used substrate consisted of turf, soil and sand in equal parts. Finally, these plants were successfully established in soil.

### Введение

Магнолия Суланжа (*Magnolia × soulangeana* Soul.-Bod.) – ценная декоративная культура. Представляет собой сильно ветвистый кустарник или небольшое дерево с чередующимися, простыми, блестящими, темно-зелеными овальными листьями на толстых стеблях. Цветки крупные, обычно 10–20 см в диаметре, окрашены в различные оттенки белого, розового и темно-бордового цветов, появляются до распускания листьев весной (Gardiner, 2000).

*Magnolia × soulangeana* является гибридом магнолии обнаженной и магнолии лилиецветной (*M. denudata* Desr. × *M. liliflora* Desr.), полученным Этьеном Суланжем во Франции в 1820 г. С тех пор было зарегистрировано более 50 форм этой магнолии. Практически каждый сеянец, выращенный из семян, полученных в результате обратного скрещивания и неконтролируемого опыления, представляет собой новый гибрид, поэтому использование семенного размножения нежелательно (Radomir, 2012).

Ряд видов рода *Magnolia* L. представляет фармакологическую ценность и также нуждаются в быстром и продуктивном размножении (Ziaev et al., 1999; Syu et al., 2004; Yu et al., 2012).

Разработка методов микроклонального размножения магнолии начиналась с применения соматического эмбриогенеза (Degivry, 1970; Merkle, Watson-Pauley, 1993; Merkle, 1999; Kim et al., 2007; Park et al., 2012), затем стал применяться метод активации пазушных меристем (Kamenicka, Valova, 1994; Kamenicka, Lanakova, 2000; Sokolov et al., 2014). Экземпляры магнолии Суланжа из коллекции Ботанического сада Южного федерального университета (далее ЮФУ) малоэффективно размножались методом активации пазушных меристем, как предлагают указанные выше авторы, а путь размножения через соматический эмбриогенез является более длительным по времени и трудоемким.

Цель настоящей работы состояла в оптимизации протокола микроразмножения *Magnolia × soulangeana*, генотипов, представленных в коллекции Ботанического сада ЮФУ.

### Материалы и методы

Микроразмножение осуществлялось методом активации пазушной меристемы. В качестве первичного экспланта была взята пазушная почка маточного растения из дендрологической коллекции Ботанического сада ЮФУ. Перед стерилизацией почки отмывались в водопроводной воде с несколькими каплями TWIN в течение 20

мин. Затем они обрабатывались 1%-м раствором фундазола (30 мин.) и промывались в стерильной воде. Дальнейшая стерилизация почек проводилась в двух вариантах с применением таких стерилизующих агентов, как 0,1%-й раствор тимеразола, либо 0,1%-й раствор сулемы. Время экспозиции варьировали. Стерилизация и высадка эксплантов на среду осуществлялась в ламинар-боксе.

Для культивирования были использованы среды Murashige and Skoog basal medium (МС) (Murashige, Skoog, 1962), Quoirin and Lepoivre (QL) (Quoirin, Lepoivre, 1977) и среда Maccown (WPM) (Maccown, 1981) с применением 6-бензиламинопурина (БАП), нафтилуксусной кислоты (НУК), индолилмасляной кислоты (ИМК) и глутамин.

Стерилизация сред проводилась в автоклаве при температуре 121 °С в течение 20 мин. В качестве гелеобразующего средства применялся агар (6 г/л). Ph среды доводился до значения 5,8 с помощью 1 М раствора КОН. Культуры помещались в условия 16-часового фотопериода при температуре 25 °С под флуоресцентные лампы, обеспечивающие фотосинтетически активную радиацию величиной в 18 μмоль/м<sup>2</sup>/сек.

### Результаты и их обсуждение

Стерилизация 0,1%-м раствором сулемы более 3 мин. приводила к гибели эксплантов. Наилучший результат наблюдался при стерилизации 0,1%-м раствором тимеразола (мертиолят) с экспозицией 20 мин. (табл.). Выяснилось, что оптимальная схема стерилизации почек *Magnolia × soulangeana* следующая: 1%-й раствор фундазола (30 мин.) → промывка в стерильной воде (5 мин.) → 70%-й этанол (1 мин.) → 0,1%-й тимеразол (15–5 мин.) → стерильная дистиллированная вода (3 раза по 15 мин.).

После стерилизации экспланты высаживались на среду МС с половинным содержанием солей с целью иницировать развитие меристемы. На 4-й неделе культивирования отмечалось появление новых листьев и рост побегов в длину. Для мультипликации побегов испытывались среды QL с добавлением 1 мг/л БАП и МС с добавлением 1,5 мг/л БАП или 0,5 мг/л БАП. Побегов, которые культивировались на среде МС, отставали в развитии от побегов на среде QL, что выражалось в укороченности побегов и меньших размерах листьев к четвертой неделе культивирования. Коэффициент размножения во всех вариантах не выходил за пределы 4–5. Таким образом, более продуктивная мультиплика-

Таблица

Эффективность поверхностной стерилизации *Magnolia × soulangeana*

Стерилизующий агент	Экспозиция, мин.	Свободные от контаминации экспланты, %	Погибшие экспланты, %
Сулема, 0,1%-й раствор	3	0	100
	5	10	100
	7	90	100
Тимеразол, 0,1%-й раствор	15	30	70
	20	90	20
	25	98	90

ция наблюдалась на среде QL с добавлением 1 мг/л БАП (рис. 1a, b).

Стоит отметить, что после 3–5 пассажей наблюдалось замедление роста и снижение эффективности мультипликации. Для восстановления коэффициента размножения каждый 4-й пассаж проводили на безгормональную среду.

Наибольшие затруднения вызвал этап укоренения. Данной проблеме в литературе уделяется особое внимание (Kamenicka, 1996, 1998).

Для укоренения нами были испробованы среды Уайта, МС с половинным содержанием солей без гормонов и с добавлением 4 мг/л ИМК, QL с добавлением 4 мг/л ИМК (Kamenicka, Lanakova, 2000; Radomir, 2012; Sokolov et al., 2014), а также среда WPM с половинным содержанием солей с добавлением 0,5 мг/л НУК (Boboshko-Bardin, 2015). После 3 недель культивирования ризогенез отмечался только на среде WPM с добавлением 0,5 мг/л НУК (рис. 1c), при этом уко-

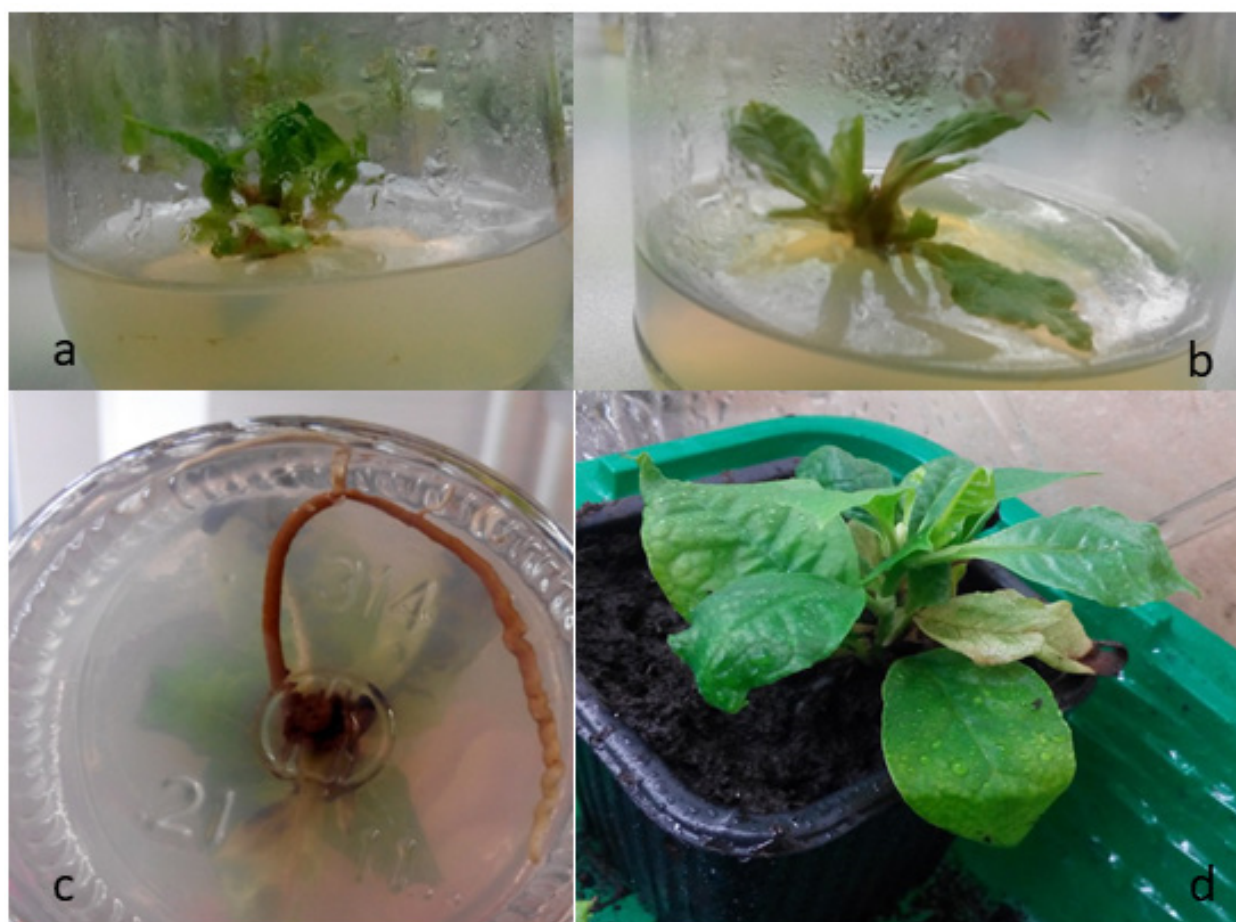


Рис. 1. *Magnolia × soulangeana* в условиях эксперимента: а, б – на среде QL с добавлением 1 мг/л БАП; с – развитие корней на среде WPM с добавлением 0,5 мг/л НУК; д – адаптация регенерантов к условиям теплицы.



ренилось лишь 80 % побегов, и на среде QL с добавлением 4 мг/л ИМК укоренилось только 20 % побегов.

После укоренения растения высаживались на торф и помещались в тепличные условия для адаптации к условиям закрытого грунта (рис. 1d).

### Выводы

В ходе проделанной работы был оптимизирован протокол микроразмножения магнолии Суланжа и выяснено, что наиболее эффективно стерилизация пазушных почек происходила в 0,1%-м растворе тимеразола в течение 20 мин.

Установлено, что оптимальной средой для мультипликации является среда QL с добавлением 1 мг/л БАП, а наиболее эффективный ризогенез наблюдается на среде WPM с половин-

ным содержанием солей с добавлением 0,5 мг/л НУК.

Наиболее эффективно адаптация к условиям закрытого грунта проходит с использованием торфяного субстрата.

### Благодарности

Работа выполнена в рамках базовой части НИР 6.6222.2017/БЧ «Разработка стратегии, методов и технологий сохранения и рационального использования биологического разнообразия в условиях природных и урбанизированных территорий степной зоны европейской части России» на базе лаборатории клеточных и геномных технологий растений Ботанического сада ЮФУ, а также с использованием оборудования ЦКП «Биотехнология, биомедицина и экологический мониторинг» и ЦКП «Высокие технологии».

### REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Boboshko-Bardin I. M.** 2015. Features rhizogeny explants *Kobus magnolia* (*Magnolia kobus* DC.) culture *in vitro*. *Scientific Bulletin of National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine* 216(1): 109–115.
- Degivry M. T.** 1970. Dormance de graine associée à une immaturité de l'embryon: Etude en culture *in vitro* chez *Magnolia soulangeana* Soul. Bod. et *Magnolia grandiflora* L. *Planta (Berl.)* 90(3): 267–271. DOI: 10.1007/BF00387178
- Gardiner J.** 2000. *Magnolias: A Gardener's Guide*. Portland, Oregon, 265–280 pp.
- Kamenicka A.** 1996. Rooting of *Magnolia x soulangeana* microcuttings. *Biologia* 51: 435–439.
- Kamenicka A.** 1998. Influence of selected carbohydrates on rhizogenesis of shoots saucer magnolia *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum* 20(4): 425–429. DOI: 10.1007/s11738-998-0030-4.
- Kamenicka A., Lanakova M.** 2000. Effect of medium composition and type of vessel closure on axillary shoot production of magnolia *in vitro*. *Acta Physiologiae Plantarum* 22(2): 129–134. DOI: 10.1007/s11738-000-0067-5.
- Kamenicka A., Valova M.** 1994. The effects of culture media on formation of axillary shoots of *Magnolia x soulangeana* Soul.-Bod. *in vitro*. *Annali di Botanica* 52: 37–43.
- Kim Y. W., Park S. Y., Park I. S., Moon H. K.** 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature seeds of *Magnolia obovate* Thunberg. *Plant Biotechnology Reports* 1(4): 237–242. DOI: 10.1007/s11816-007-0037-0.
- Merkle S. A.** 1999. Somatic embryogenesis in *Magnolia* spp. *Forestry Sciences* 55: 387–401. DOI: 10.1007/978-94-017-3032-7\_15.
- Merkle S. A., Watson-Pauley B. A.** 1993. Regeneration of big-leaf magnolia by somatic embryogenesis. *Hortic. Sci.* 28: 672–673.
- Murashige T., Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum* 15(3): 473–497.
- Park I., Koiso M., Morimoto S., Kubo T., Jin H., Funada R.** 2012. Plant regeneration by somatic embryogenesis from mature seeds of *Magnolia obovate*. *Journal of Wood Science* 58(1): 64–68. DOI: 10.1007/s10086-011-1212-z.
- Quoirin M., Lepoivre P.** 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* species. *Acta Horticulturae* 78: 437–442.
- Radomir A. M.** 2012. Comparative study on the *in vitro* multiplication potential of *Magnolia stellata* and *Magnolia × soulangeana* species. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology* 16(2): 39–44.
- Smith M. A., McCown B. H.** 1983. A Comparison of Source Tissue for Protoplast Isolation from Three Woody Plant Species. *Plant Science Letters* 28(2): 149–156.
- Sokolov R., Atanassova B., Iakimova E.** 2014. Physiological response of *in vitro* cultured *Magnolia* sp. to nutrient medium composition. *Journal of Horticultural Research* 22(1): 49–61. DOI: 10.2478/johr-2014-0006.
- Syu W. J., Shen C. C., Lu J. J., Lee G. H., Sun C. M.** 2004. Antimicrobial and cytotoxic activities of neolignans from *Magnolia officinalis*. *Chem. Biodivers.* 1(3): 530–537. DOI: 10.1002/cbdv.200490046.
- Yu S. X., Yan R. Y., Liang R. X.** 2012. Bioactive polar compounds from stem bark of *Magnolia officinalis*. *Fitoterapia* 83(2): 356–361. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.11.020.
- Ziaev R., Stonda H., Sturua M., Abdusamatov A., Tsakadze D.** 1999. Alkaloids of *Magnolia*. *Chem. Nat. Comp.* 3: 407–408.