

УДК 582.929.4

UDC 582.929.4

03.00.00 Биологические науки

Biological sciences

**СПОСОБЫ РАЗМНОЖЕНИЯ ЛАВАНДЫ
(*LAVANDULA ANGUSTIFOLIA* MILL.)****THE METHODS OF REPRODUCTION OF
LAVANDULA ANGUSTIFOLIA MILL.**

Бугаенко Людмила Александровна
д.б.н., профессор
Государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования Республики
Крым «Крымский инженерно-педагогический
университет», г. Симферополь, Республика Крым,
Россия

Bygayenko Lyudmila Aleksandrovna
Doctor of biological sciences, professor
State Budget Educational Institution of Higher
Education of the Republic of Crimea Crimean
Engineering and Pedagogical University, Simferopol,
the Republic of Crimea, Russia

Манушкина Татьяна Николаевна
к. с.-х. н, доцент
e-mail: evelina_biol@mail.ru
Николаевский государственный аграрный
университет, г. Николаев, Украина

Manyshkina Tatiana Nykolaevna
Candidate of agricultural sciences, associate professor
e-mail: evelina_biol@mail.ru
Mykolayiv State Agrarian University, Nikolaev,
Ukraine

Представлены результаты изучения размножения лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) методами генеративного размножения (семенами), вегетативного размножения (черенками, отводками, делением куста), клонального микроразмножения с использованием культуры *in vitro*. Наиболее эффективным для решения поставленных задач семеноводства лаванды может быть метод клонального микроразмножения на основе культуры изолированных меристем, который обеспечивает генетическую идентичность растений-регенерантов исходным формам и высокие коэффициенты размножения, оздоровление посадочного материала от грибной и бактериальной инфекции, а также освобождение от вирусов при сочетании с методами термотерапии и хемотерапии. Материалом для проведения исследований служили растения лаванды *Lavandula angustifolia* Mill, сортов Синева, Степная и перспективных селекционных образцов 337-9 и 310-17. В качестве эксплантов использовали апикальные меристемы высотой 0,2-1,0 мм, которые вычленили из верхушечных и пазушных почек стебля однолетних растений. Для культивирования изолированных меристем в качестве базовой питательной среды использовали среду Мурасиге и Скуга (МС). Экспланты культивировали в культуральной комнате при температуре 25-26°C, освещении – 2-3 лк, относительной влажности воздуха – 60-70%. Установлено, что наилучшими сроками изолирования меристем являются месяцы апрель и октябрь, которые календарно отвечают фазам весеннего и осеннего отрастания у донорных растений лаванды, оптимальной является агаризованная питательная среда МС, дополненная кинетином (1,0 мг/л) и ГК (1,0 мг/л), на которой у всех изученных генотипов частота регенерации составляла 90,0-100,0 %. Особенностью

The article presents results of the study of lavender reproduction (*Lavandula angustifolia* Mill) with methods of generative reproduction (seeds), vegetative reproduction (cutting, layening, divide of buch), clonal microreproduction using the culture *in vitro*. The method of cloned microreproduction based on the culture of the isolated meristems which provides genetic identity of regenerated plants to initial forms and high coefficients of reproduction, improvement of landing material from fungal and bacterial infection, and also release from viruses at a combination with methods of thermotherapy and a chemotherapy is the most effective for the solution of objectives of seed farming of a lavender. As a material for carrying out researches we had plants of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill), Sineva sorts, Stepnaya and perspective selection samples 337-9 and 310-17. Apical meristems 0,2-1,0 mm high isolated from top and axillary buds of a stalk of annual plants have been used as explant. Murasige and Skuga (MS) used as a basic nutrient medium for cultivation of the isolated meristems. Explants have been cultivated in the cultural room with 25-26 °C - temperature, lighting – 2-3 lx, relative humidity – 60-70%. It has been established that both April and October are the best month for isolation of meristems correspond calendar to phases of spring and autumn growth at the lavender donor plants and that optimum is an agar nutrient medium of MS, added with kinetin (1,0 mg/l) and GC (1,0 mg/l); frequency of regeneration of all studied genotypes was 90,0-100,0 %. Feature of morphogenesis of lavender meristems *in vitro* culture was already at the first stage of clonal microreproduction as there was a multiple shoot formation. Studying of features of development of lavender microplants during ten passages also was carried out, as the level of stability of regeneration processes throughout several cycles of a micrograftage is one of important factors on which efficiency of

морфогенеза меристем лаванды в культуре *in vitro* было то, что уже на первом этапе клонального микроразмножения происходило множественное побегообразование. Проводилось также изучение особенностей развития микрорастений лаванды в течение десяти пассажей, поскольку уровень стабильности регенерационных процессов на протяжении нескольких циклов микрочеренкования является одним из важных факторов, от которых зависит эффективность клонального микроразмножения. Было показано, что эффективность размножения сохраняется на стабильном уровне у сорта Синева и образца 337-9 до 8-го пассажа (1:7,77-12,45 и 1:7,60-11,85 соответственно), у сорта Степная - до 7-го пассажа (1:6,10-11,81), у образца 310-17 - до 6-го пассажа (1:6,17-8,37)

microreproduction depends. We have also shown, that the efficiency of reproduction remains at the stable level of the sort named Sineva and sample #337-9 to the 8th passage (1:7,77-12,45 and 1:7,60-11,85 respectively), at the variety called Stepnaya - to the 7th passage (1:6,10-11,81), at the sample #310-17 - to the 6th passage (1:6,17-8,37)

Ключевые слова: РАЗМНОЖЕНИЕ, IN VITRO, КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ

Keywords: PROPAGATION, IN VITRO, CLONAL MICROPROPAGATION

Лаванда узколистная – *Lavandula angustifolia* Mill.(=лаванда настоящая - *L.vera* D.C.) является одной из приоритетных эфиромасличных культур, эфирное масло которой широко используется в парфюмерно – косметической, фармацевтической и пищевой промышленности. Это многолетний, вечнозеленый сильно ветвистый полукустарник, высотой 60-70см. и диаметром 60-80см., относится к семейству Яснотковых (*Lamiaceae*). Листья темно-зеленой или серо-зеленой окраски, ланцетовидной формы, На одном месте лаванда может расти 15 и более лет. Корень мощный, ветвистый и мочковатый. Проводящие корни проникают в почву на глубину более 2 м. и сосредотачиваются, главным образом, в верхних наиболее плодородных слоях почвы. Куст состоит из большого количества (1000 и более) побегов. В нижней части растения ветви деревянистые, голые, плотно сомкнуты, в связи с этим куст имеет шаровидную форму. Смена ветвей у лаванды в зависимости от условий произрастания наблюдается через 7-10 лет, а также в случае их вымерзания, что свидетельствует о способности растения быстро восстанавливаться. Указанное свойство лаванды используют при проведении омоложения старых плантаций. Ежегодно весной от верхушек

старых побегов вырастают цветоносные побеги, которые заканчиваются колосовидными соцветиями с многоцветковыми мутовками, имеющими обоеполые цветки. На одном растении в зависимости от сорта, приемов возделывания, метеорологических условий и других факторов образуется до 2000 цветоносных побегов. Массовая доля эфирного масла в свежих соцветиях, из которых получают эфирное масло, составляет от 1 до 4,0%, в зависимости от сорта. В последние годы созданы сорта лаванды: Рекорд, Степная, Ранняя, Синева и Изида.

Выращивание лаванды и получение эфирного масла в основном сосредоточено в Крыму [1,2]. Чтобы сделать эту культуру высокопродуктивной необходимо ежегодно выращивать до 20 млн.шт. саженцев для закладки плантаций. Реконструкция старовозрастных насаждений и расширение площадей лаванды сдерживается отсутствием посадочного материала.

Целью наших исследований являлось сравнение существующих способов размножения лаванды и определение эффективности клонального микроразмножения лаванды в культуре *in vitro*.

Постановка и решение задачи.

Существуют различные способы размножения лаванды:

1. Генеративное размножение (семенами).
2. Вегетативное размножение (черенками, отводками, делением куста).
3. Клональное микроразмножение с использованием культуры *in vitro*.

Семенной способ размножения лаванды в семеноводстве и производстве практически не используется в связи с тем, что в семенном потомстве наблюдается расщепление. Константность хозяйственно ценных признаков не сохраняется, а в потомстве наблюдается большое разнообразие форм, как по масличности, так и по составу эфирного масла.

При этом изменчивость в большей степени направлена в сторону ухудшения качества и массовой доли эфирного масла [2, 3, 4],

Вегетативное размножение лаванды. Сохранить хозяйственные признаки сортов-клонов возможно только при вегетативном размножении, которое осуществляется путем черенкования, отводками и делением куста.

Размножение однолетними одревесневшими черенками проводят преимущественно в парниках. Лучшим сроком заготовки черенков и их посадки является вторая половина октября и ноября, в случае необходимости и в более поздние сроки. Черенки заготавливают в специализированном питомнике-маточнике, который является главным звеном при производстве чистосортного посадочного материала. При этом, кусты на маточнике должны быть хорошо развиты, чтобы из них можно было подучить максимальное количество черенков. Для этого на маточниках растения должны иметь максимальную площадь питания (1,0 x 0,5-1,0 м), а размещать их на лучших участках с почвой богатой питательными веществами. Черенки (длина - 9-12 см), толщина – 2 и более мм.) высаживают в заранее подготовленные гряды или парники. Осенью (октябрь) саженцы выкапывают и сортируют. Стандартные саженцы первого класса должны иметь не менее трех побегов, толщину корневой шейки- не менее 8 мм., длину корней – не менее 15 см., а второго, соответственно, 2 шт., 4 мм. и 12 см.

Размножение лаванды отводками. Осенью кусты лаванды на маточных плантациях окучивают землей так, чтобы каждый побег стоял отдельно. Летом осуществляют полив, рыхление почвы, прополку. За лето окученные ветви развивают хорошую корневую систему, а в октябре их можно отделять от маточного растения и высаживать на плантации или в перешколку. В качестве маточников лучше использовать 3-5 летние растения. При этом, кусты после отделения вертикальных отводков

сохраняются и свободно отрастают. Недостаток этого способа заключается в небольшом коэффициенте размножения и большой трудоёмкости.

Размножение лаванды делением куста. Для размножения этим способом необходимо иметь хорошо разросшиеся кусты лаванды трёх-четырёх-летнего возраста, которые после срезки надземной части могут образовывать большое количество отводков. Полученные саженцы лаванды высаживают с площадью питания 1,2-1,4 x 0,5 м., что составляет 14,3-16,6 тыс. растений на гектар. Посадка производится в третьей декаде октября с предварительным поливом. Каждое растение в первый же год образует много основных ветвей и мощную корневую систему.

Клональное микроразмножение лаванды *in vitro*. В настоящее время одним из направлений биотехнологии является культура *in vitro* клеток, тканей и органов растений, которая широко используется в науке для создания экспериментальных биологических систем, а также в селекционной и семеноводческой практике [5].

Наиболее эффективным для решения поставленных задач семеноводства лаванды может быть метод клонального микроразмножения на основе культуры изолированных меристем, который обеспечивает генетическую идентичность растений - регенерантов исходным формам и высокие коэффициенты размножения, оздоровление посадочного материала от грибной и бактериальной инфекции, а также освобождение от вирусов при сочетании с методами термотерапии и хемотерапии.

Материалом для проведения исследований служили растения лаванды *Lavandula angustifolia* Mill, сортов Синева, Степная и перспективных селекционных образцов 337-9 и 310-17. В работе использовали общепринятые методы исследований по культуре тканей растений [5, 6]. В качестве эксплантов использовали апикальные меристемы высотой 0,2-1,0 мм, которые вычленили из верхушечных и пазушных почек стебля однолетних растений. Для культивирования

изолированных меристем в качестве базовой питательной среды использовали среду Мурасиге и Скуга (МС) [7].

Экспланты культивировали в культуральной комнате при температуре 25-26°C, освещении – 2-3 клк, относительной влажности воздуха – 60-70%. Для введения в культуру *in vitro* в качестве экспланта использовали апикальные меристемы размером 0,2-1,0 мм с одной-двумя парами листовых примордиев. В наших экспериментах стерилизацию растительного материала проводили путем последовательной обработки фрагментов побегов в 70 %-ном этаноле (40сек.) и 50%-ном растворе препарата «Брадофен» (12 мин.), а затем трижды промывали в стерильной дистиллированной воде. Указанный способ стерилизации обеспечивал выход 92,5-100,0% стерильных меристем.

Установлено, что наилучшими сроками изолирования меристем являются месяцы апрель и октябрь, которые календарно отвечают фазам весеннего и осеннего отрастания у донорных растений лаванды, оптимальной является агаризованная питательная среда МС [7], дополненная кинетином (1,0 мг/л) и ГК (1,0 мг/л), на которой у всех изученных генотипов частота регенерации составляла 90,0-100,0 %. Особенностью морфогенеза меристем лаванды в культуре *in vitro* было то, что уже на первом этапе клонального микроразмножения происходило множественное побегообразование, в основном, за счет образования адвентивных побегов. Отмечены различия между исследуемыми генотипами по высоте основного побега и количеству дополнительных побегов на один эксплант, которые обуславливали разные коэффициенты размножения: у сорта Синева - 1:12,45, у сорта - Степная 1:10,06, у образца 337-9-1:8,55, у образца 310-17-1:7,18.

На этапе собственно микроразмножения в качестве экспланта использовали микрочеренки, которые получали при разделении основного побега меристемных растений на фрагменты длиной 4-8 мм с одной парой

листьев или при отделении дополнительных побегов. Наиболее оптимальное развитие микропобегов лаванды было отмечено также на среде МС, дополненной кинетином (1,0 мг/л) и ГК (1,0 мг/л) - частота регенерации составила 85,7-100,0 %. На указанном этапе клонального микроразмножения происходил интенсивный рост основных побегов из латеральных почек микрочеренка, частота образования дополнительных побегов составляла 68,4%, в среднем образовывалось 2-4 боковых побега, а количество адвентивных побегов не превышало 4,1-7,9 % от их общего количества. Поэтому микроразмножение осуществлялось, в основном, за счет микрочеренкования основных побегов. Установлено, что генотипические особенности сортов и образцов обуславливали различную интенсивность ростовых процессов и, как следствие, разные коэффициенты размножения: у сорта Синева - 1:11,12, у сорта Степная - 1:10,42, у образца 337-9 - 1:11,83, у образца 310-17-1:6,72.

Проводилось также изучение особенностей развития микрорастений лаванды в течение десяти пассажей, поскольку уровень стабильности регенерационных процессов на протяжении нескольких циклов микрочеренкования является одним из важных факторов, от которых зависит эффективность клонального микроразмножения. Было показано, что эффективность размножения сохраняется на стабильном уровне у сорта Синева и образца 337-9 до 8-го пассажа (1:7,77-12,45 и 1:7,60-11,85 соответственно), у сорта Степная - до 7-го пассажа (1:6,10-11,81), у образца 310-17 - до 6-го пассажа (1:6,17-8,37) –табл. 1

Таблица 1

**КОЭФФИЦИЕНТЫ РАЗМНОЖЕНИЯ МЕРИСТЕМНЫХ
РАСТЕНИЙ ЛАВАНДЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ КОЛИЧЕСТВА
ПАССАЖЕЙ**

Пассаж	Сорт, образец							
	Синева		Степная		337-9		310-17	
	за пассаж	всего	за пассаж	всего	за пассаж	всего	за пассаж	всего
0 (введение)	12,45	12	10,06	10	8,55	9	7,18	7
1	11,12	138	10,42	105	11,83	101	6,72	48
2	11,97	1657	11,81	1238	11,85	1199	7,62	368
3	10,87	18013	9,69	11996	11,71	14035	7,57	2783
4	11,59	208776	9,95	119361	10,62	149056	8,37	23295
5	11,61	2423893	8,13	970405	8,21	1223753	7,44	173318
6	9,52	23075463	6,19	6006807	7,60	9300522	6,14	1064171
7	10,36	239061804	8,11	48715202	10,92	101561711	3,78	4022566
8	7,77	1857510218	5,34	260139176	9,24	938430210	3,24	13033112
9	5,99	11126486206	4,41	1147213768	5,93	5564891150	-	-
10	5,89	65535003754	4,45	5105101267	6,87	38230802198	-	-

В среднем за год можно провести шесть пассажей, за которые суммарный выход мериклонов из одного экспланта составляет у сорта Синева около 23 млн. шт., у сорта Степная - 6 млн. шт., у образца 337-9 - 9 млн. шт., у образца 310-17-1 млн. шт.

На этапе укоренения *in vitro* в качестве экспланта использовали верхушки микропобегов или микрочеренки длиной 4-8 мм с одной парой листьев. Оптимальной для укоренения определена питательная среда $\frac{1}{2}$ МС, дополненная ИМК (0,5 мг/л) и ИУК (0,5 мг/л), на которой частота укоренения составила 85,0-100,0 % и формировалось 3-5 корней длиной 32-60 см.

Для адаптации к условиям *in vivo* отбирали микрорастения с хорошо развитой корневой системой и высаживали в горшочки объемом 200 мл со стерильным субстратом. Горшочки помещали под пленочное укрытие и культивировали при температуре 18-20 °С. Подкормку минеральными удобрениями (раствором Кнопа) проводили сразу после посадки растений в субстрат и через 14 дней. Наивысшая приживаемость микрорастений всех генотипов - 95,0-100,0 % обеспечивалась на субстрате, состоящем из торфа, перлита, почвы, песка в соотношении 2:1:1:1. Определено, что для адаптации достаточно периода 14 дней, за которые формируется 2-3 пары листьев. После периода адаптации пленочное укрытие снимали и растения культивировали в обычных условиях еще 46 дней, а затем высадили в качестве маточных растений в условия закрытого грунта.

Выводы:

1. Показано, что в качестве эксплантов использовали апикальные меристемы высотой 0,2-1,0 мм, которые вычленили из верхушечных и пазушных почек стебля однолетних растений лаванды.

2. Установлено, что наилучшими сроками изолирования меристем являются месяцы апрель и октябрь, которые календарно отвечают фазам весеннего и осеннего отрастания у донорных растений лаванды.

3. Особенностью морфогенеза меристем лаванды в культуре *in vitro* являлось то, что уже на первом этапе клонального микроразмножения

происходило множественное побегообразование за счет образования адвентивных побегов.

4. Наиболее оптимальное развитие микропобегов лаванды было отмечено на среде Мурасиге и Скуга (МС), дополненной кинетином (1,0 мг/л) и ГК (1,0 мг/л). При этом частота регенерации составила 85,7-100,0 %.

5. Установлено, что генотипические особенности сортов и образцов обуславливали различную интенсивность ростовых процессов и, как следствие, разные коэффициенты размножения: у сорта Синева - 1:11,12, у сорта Степная - 1:10,42, у образца 337-9 - 1:11,83, у образца 310-17-1:6,72.

6. Показано, что в течение года можно провести шесть пассажей, за которые суммарный выход мериклонов из одного экспланта составляет у сорта Синева около 23 млн. шт., у сорта Степная - 6 млн. шт., у образца 337-9 - 9 млн. шт., у образца 310-17-1 млн. шт.

7. Для адаптации к условиям *in vivo* наивысшая приживаемость микрорастений всех генотипов - 95,0-100,0 % обеспечивалась на субстрате, состоящем из торфа, перлита, почвы, песка в соотношении 2:1:1:1. При этом выявлено, что для адаптации достаточно периода 14 дней, за которые формируется 2-3 пары листьев.

8. Использование клонального микроразмножения даст возможность селекционерам в короткие сроки размножить новые уникальные генотипы для включения их в селекционный процесс.

9. Включение в систему семеноводства лаванды технологии клонального микроразмножения *in vitro* позволит ускоренно размножить посадочный материал и внедрять новые сорта в производство.

Список литературы

1. Эфиромасличное производство / Бугаенко Л.А., Назаренко Л.Г., и др.// Научное обоснование основных направлений развития агропромышленного комплекса Крыма в условиях рыночного производства.- Симферополь : Таврия, 2004.- С.64-79.

2. Назаренко Л.Г. Эфиромасличные, пряно-ароматические и лекарственные растения. /Л.Г. Назаренко, Л.А. Бугаенко //Симферополь. – Таврия. – 2003. – 202 с.

3. Машанов В.И. Биологические основы возделывания лаванды / В.И. Машанов, А.К. Кальченко, Т.Я. Лешук // Симферополь: Таврия. – 1972. – 126 с.
4. Митрофанов В.И. Лаванда: Элитное питомниководство / В.И. Митрофанов, Ю.К. Самойлов, Э.Ф. Азарова, Ю.В. Аксенов // Ялта. – НБС – ННЦ. – 2005. – 60 с.
5. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений In Vitro и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко // М.: ФБК-ПРЕСС. – 1999. – 160 с.
6. Калинин Ф.Л., Методы культуры тканей в физиологии и биохимии культурных растений / Ф.Л. Калинин, В.В., Сарнацкая, В.Е. Полищук // К.: Наук. думка. – 1980. – 488 с.
7. Murachige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murachige., F. Skoog // *Physiol. plant.* – 1962. – 15, N13. – P. 473-497.

References

1. Jеfiromaslichnoe proizvodstvo / Bugaenko L.A., Nazarenko L.G., i dr. // Nauchnoe obosnovanie osnovnyh napravlenij razvitija agropromyshlennogo kompleksa Kryma v uslovijah rynochnogo proizvodstva.- Simferopol' : Tavrija, 2004.- S.64-79.
2. Nazarenko L.G. Jеfiromaslichnye, prjano-aromaticheskie i lekarstvennyе rastenija. /L.G. Nazarenko, L.A. Bugaenko // Simferopol'. – Tavrija. – 2003. – 202 s.
3. Mashanov V.I. Biologicheskie osnovy vozdeľyvanija lavandy / V.I. Mashanov, A.K. Kal'chenko, T.Ja. Leshuk // Simferopol'. – Tavrija. – 1972. – 126 s.
4. Mitrofanov V.I. Lavanda: Jelitnoe pitomnikovodstvo / V.I. Mitrofanov, Ju.K. Samojlov, Je.F. Azarova, Ju.V. Aksenov // Jalta. – NBS – NNC. – 2005. – 60 s.
5. Butenko R.G. Biologija kletok vysshih rastenij In Vitro i biotehnologii na ih osnove / R.G. Butenko // M.: FBK-PRESS. – 1999. – 160s.
6. Kalinin F.L., Metody kul'tury tkanej v fiziologii i biohimii kul'turnyh rastenij / F.L. Kalinin, V.V., Sarnackaja, V.E. Polishuk // K.: Nauk. dumka. – 1980. – 488 s.
7. Murachige T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murachige., F. Skoog // *Physiol. plant.* – 1962. – 15, N13. – P. 473-497.