



46. Бухарин О. В., Гинцбург А. Л., Романова Ю. М., Эль-Регистан Г. И. Механизм выживания бактерий. М.: Медицина, 2005. 367 с.
47. Акиев А. К. О микроочаговости чумы диких грызунов // Природная очаговость, микробиология и профилактика зоонозов : сб. ст. Саратов : Изд-во Коммунист, 1989. С. 53–60.
48. Удовиков А. И. Динамика эпизоотической активности природных очагов европейского юго-востока

России : прогноз на начало XXI столетия : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Саратов, 2010. 46 с.

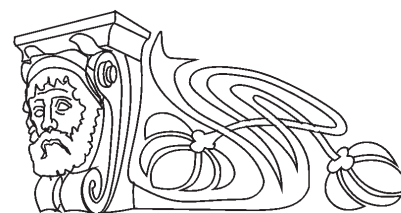
49. Попов Н. В., Аникин В. В., Удовиков А. Н. Оценка численности блох (Insecta, Siphonaptera) в период развития эпизоотий чумы в степных природных очагах сусликового типа Северного и Северо-Западного Прикаспия и Предкавказья // Тр. Рус. энтомол. о-ва. СПб., 2014. Т. 85 (2). С. 47–52.

УДК 582.675:581.143.6

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ПИОНА ТОНКОЛИСТНОГО (*PAEONIA TENUIFOLIA* L.)

Т. А. Крицкая, А. С. Кашин

Учебно-научный центр «Ботанический сад»
Саратовского государственного университета
E-mail: kriczkaya.tatyana@mail.ru, kashinas2@yandex.ru



В работе представлены литературные данные и результаты оригинальных исследований по проблеме клонального микроразмножения пиона тонколистного (*Paeonia tenuifolia* L.) – одного из наиболее декоративных и нуждающихся в охране видов региона. Рассмотрены основные этапы клонального микроразмножения пиона. В результате анализа обширного материала, касающегося рода *Paeonia* в целом, составлена эффективная схема клонального микроразмножения *P. tenuifolia*, включающая: эмбриокультуру на начальном этапе; микроразмножение на питательной среде WPM с удвоенной концентрацией CaCl_2 , БАП (1.0 мг/л) и кинетин (0.5 мг/л); укоренение, достигаемое за счёт последовательной смены питательной среды с ИМК (1.0 мг/л) на среду без регуляторов роста при пониженной температуре; адаптацию к нестерильным условиям на субстрате, состоящем из вермикулита. Метод может быть использован для массового получения посадочного материала в целях восстановления численности популяций данного вида и зелёного строительства.

Ключевые слова: *Paeonia tenuifolia*, Paeoniaceae, клональное микроразмножение.

Clonal Micropropagation of *Paeonia tenuifolia* L.

Т. А. Kriticakia, А. S. Kashin

Paeonia tenuifolia is one of the most attractive and needy of protection species among endangered plants of Saratov region. Modern methods of biotechnology, in some case plant clonal micropropagation, are increase efficiency of secured plant species propagation ex situ. There is a review the progress made in peony micropropagation and it is present short applicatory observations. Comprehensive references about *Paeonia* species in the whole were analyzed. An effective record of *P. tenuifolia* clonal micropropagation was composed. It is including follow steps: embryoculture on the first step; propagation on WPM media with double quantity of CaCl_2 and supplemented BAP

(1.0 мг/л) and kinetin (0.5 мг/л); rooting by consecutive replacement of plantlets from media with IBA (1.0 мг/л) to hormone-free media at reduced temperature; acclimatization to non-sterile conditions on substrate, composed of vermiculite. A method may be used for mass obtaining of planting stock and laying out of parks.

Key words: *Paeonia tenuifolia*, Paeoniaceae, clonal micropropagation.

Введение

Пион тонколистный (*Paeonia tenuifolia* L.) – травянистый многолетник до 50 см высотой с клубневидными утолщениями на корневищах. Листья дважды-триждытройчатые или тройчато-перистые, первичные сегменты их рассечены на многочисленные линейные доли (более 40 шт.) до 5 мм шириной. Венчик тёмно-красный или тёмно-пурпуровый, до 8 см диаметром. Плод – многолистовка из 1–5, чаще 3 листовок. Цветёт в апреле – начале мая. Размножение семенное и вегетативное [1].

P. tenuifolia указан со статусом и категорией «2б» – вид, сокращающийся в численности – в Красной книге Российской Федерации [2], и со статусом «2(V)» – уязвимый вид – в Красной книге Саратовской области [3]. Он также входит в список особо охраняемых растений Европы [4]. Редкость вида определяется разрушением степей в результате рекреационной нагрузки, массовым сбором населением на букеты и выкапыванием корневищ [2, 3].

Согласно литературным данным и гербарным образцам фондов SARAT и SARBG в Саратовской области *P. tenuifolia* отмечался в Ат-



карском, Балашовском, Вольском, Калининском, Красноармейском, Хвалынском, Саратовском, Татищевском и др. районах [3, 5]. Обитает на остепнённых лугах, ковыльно-разнотравных степях, опушках светлых дубовых лесов, в зарослях кустарников, на склонах балок. Светолюбив. Не выносит переувлажнённых почв и застоя воды. Является факультативным кальцефилом [1, 3].

Особенностью *P. tenuifolia* является длительное прорастание семян (более двух лет) и медленное развитие проростков [1, 6, 7]. Поэтому растения, культивируемые в ботанических садах, размножают преимущественно частями корневища. Наиболее быстрым и современным методом массового получения посадочного материала декоративных культур является клональное микроразмножение растительного материала [8]. За последние годы эффективные биотехнологии были разработаны для целого ряда видов и сортов травянистых [9–19] и древовидных пионов [20–28]. Однако сведения по особенностям культивирования *P. tenuifolia in vitro* фрагментарны и не охватывают рассматриваемую проблему в полной мере.

Цель данной работы – обобщить имеющиеся литературные данные, касающиеся клонального микроразмножения *P. tenuifolia*, подтвердить и уточнить их экспериментальными данными.

Выбор экспланта

В качестве первичных эксплантов для введения в культуру *in vitro* могут быть использованы любые части растения: корневые почки, пазушные почки в основании побегов, основания черешков, междоузлия, фрагменты листьев с главной жилкой, цветочные почки, цветоложе, основания лепестков и чашелистиков, плодolistики, пестики и тычинки, зрелые и незрелые зародыши. Выбор экспланта определяется, главным образом, целями и задачами исследования.

J. A. T. Buchheim и J. M. M. Meyer [29] использовали в качестве первичных эксплантов *P. lactiflora* цветочные почки, цветоложе, черешки и сегменты стебля. Из формировавшегося каллуса в последующем регенерировали почки и эмбриониды. В работе Q. R. Zhang et al. [16] был индуцирован каллус из листьев, побегов и черешков травянистых пионов, но адвентивных побегов из субкультивированного каллуса получено не было. В исследованиях Y. Li et al. [22] побеги регенерировали из каллуса, образованного пазушными почками и черешками *P. suffruticosa*. H. Wangl и J. van Staden [27] использовали листья, почки, корни и семена *P. suffruticosa* сортов ‘Cai Lan’, ‘Xue Li Zi Yu’, ‘Zi Xia

Lin’ и ‘Fengdanbai’ с целью выбора наилучшего экспланта и эффективной схемы стерилизации. Введение в культуру *in vitro* сегментов побегов с почками *P. suffruticosa* сортов ‘Владимир Новиков’, ‘Коралл’, ‘Куинджи’ и ‘Николай Вавилов’ было осуществлено А. А. Криницыной с соавт. [20]. В работе T. Orlikowska et al. [15] была достигнута прямая регенерация *P. mlokosewitschii* и *P. tenuifolia* из вегетативных почек, жилок листа, оснований черешков и лепестков. Однако количество жизнеспособных эксплантов при этом не превысило 10%, а длительность культивирования от введения в культуру до получения полноценных растений-регенерантов составила 1.5 года. X. N. Yu et al. [30, 31] была получена прямая регенерация микропобегов *P. lactiflora* из подземных почек. В работе А. А. Зариповой [9] в качестве эксплантов использовали боковые почки, изолированные с побега *P. anomala* в период его внутрипочечного роста. Автором была показана зависимость морфофизиологической активности боковых почек *P. anomala* в культуре *in vitro* от места их расположения на побеге и срока изоляции экспланта.

Согласно правилам сбора редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений для ботанических садов, предпочтительным материалом для изъятия из природных популяций, с целью сохранения вида *ex situ*, являются семена [32]. Они обеспечивают максимальный охват существующей генотипической изменчивости в популяциях.

Семена рода *Paeonia* имеют простой глубокий морфофизиологический покой, и для его снятия используется двухэтапная стратификация – теплая (для доразвития зародыша) и холодная (для снятия физиологического механизма торможения прорастания) [33, 34]. Культура *in vitro* семян и зародышей представителей рода *Paeonia* была объектом исследования ряда отечественных исследователей [6, 7, 35]. В частности, для *P. tenuifolia* было установлено, что необходимым условием нарушения физиологического покоя является холодная стратификация [35]. Недостаточный период холодной стратификации приводил к появлению физиологической карликовости проростков всех рассмотренных объектов *Paeonia*. Для тёплой стратификации (5 недель) автор рекомендует использовать безгормональную питательную среду, в течение холодной стратификации (не менее 8 недель) – питательную среду с добавлением гибберелловой кислоты (ГК) в концентрации 0.1–1.0 мг/л.

Учитывая вышеизложенное, для введения в культуру *in vitro* *P. tenuifolia*, произрастающего



на территории Саратовской области, мы использовали зрелые семена. Сбор производили из двух природных популяций на территории Национального парка «Хвалынский» с 30 произвольно выбранных растений. До начала экспериментов семена хранили в бумажных конвертах при комнатной температуре. Перед посадкой на питательную среду семена подвергали ступенчатой стерилизации согласно общепринятым методикам [8]. После этого семена помещали на безгормональную среду по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [36] в условиях ламинарного бокса и оставляли на время тёплой стратификации. Затем из семян вычленили сформированные зародыши и переносили на питательную среду МС с добавлением 0.5 мг/л ГК.

Зародыши экспонировали в холодильной камере при температуре $+5\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 8 недель.

После холодной стратификации пробирки переносили в ростовую комнату с 16-часовым световым периодом и температурой $+25^\circ\text{C}$.

В результате вычлененные зародыши развивались в полноценные проростки без каких-либо аномалий, а после перенесения в стандартные условия приобретали зелёный цвет и продолжали своё развитие (рис. 1).



Рис. 1. Проростки *P. tenuifolia* после 8 недель холодной стратификации

Минеральный состав питательной среды

В работах как отечественных, так и зарубежных авторов [9, 20, 24, 25, 27, 28, 37, 38 и др.] указываются два минеральных состава, рекомендованных для культивирования *in vitro* представителей рода *Paeonia* в целом, – МС и WPM [39]. В частности, для *P. tenuifolia* и *P. mlokosewitschii* рекомендовано использовать

МС с удвоенной концентрацией CaCl_2 и MgSO_4 [15]. Однако большинством авторов была показана необходимость увеличения концентрации только CaCl_2 . Так, Н. Wangl и J. van Staden [27] наглядно продемонстрировали влияние ионов кальция на жизнеспособность эксплантов сортовых карликовых древовидных пионов. Показано, что листья, почки и зародыши, введённые в культуру *in vitro*, гибли на питательной среде МС и $\frac{1}{2}$ МС. Они выживали на среде WPM, но позднее у объектов при культивировании на этой среде развивались характерные признаки дефицита кальция. Эти признаки устранялись при удвоении концентрации CaCl_2 в питательной среде. Через 15 суток после пересадки на модифицированную таким образом среду хлороз исчезал и появлялись почки.

Исключение составили работы по эмбриокультуре различных видов пионов. Например, для культивирования зародышей *P. tenuifolia* рекомендована питательная среда с минеральным составом МС со стандартным набором солей [35]. Сходные результаты получены и для *P. anomala* [7]. В последней из упомянутых работ лучшие результаты получены на среде МС с половинной концентрацией всех компонентов.

Полученные нами результаты по культуре *P. tenuifolia* согласуются с данными других исследователей. Было отмечено, что для культивирования зародышей достаточно стандартной среды МС. Однако для дальнейшего развития и формирования микропобегов необходима удвоенная концентрация CaCl_2 в среде того же основного состава. В частности, при субкультивировании эксплантов *P. tenuifolia* на стандартной среде МС или WPM растения прекращали свой рост и развитие, морфогенез полностью останавливался, а все побеги постепенно становились коричневыми. После пересадки на питательную среду с двойной концентрацией CaCl_2 растения снова приобретали зелёную окраску и формировали почки.

Микроразмножение

Все работы, касающиеся массового получения микропобегов у представителей рода *Paeonia*, можно разделить условно на две большие группы: с использованием непрямого и прямого органогенеза. В первом случае морфогенезу предшествуют дедифференциация и каллусогенез, во втором происходит активация пазушных меристем. Известно, что меристематические ткани растений являются наиболее предпочтительными объектами для клонального микроразмножения, так как они устойчивы к генетическим изменениям и остаются стабильными в течение множественных субкультивирований [8].



Большое внимание исследователей было уделено работам по непрямому органогенезу у представителей рода *Paeonia*, но результаты были неудовлетворительными [10, 16, 40]. Согласно полученным в последнее время результатам, только произведенный гипокотилем каллус может успешно давать адвентивные побеги, но при низком темпе регенерации (7.95%) [28].

У травянистых пионов *P. albiflora* [13], *P. anomala* [12], *P. mlokosewitschii* и *P. tenuifolia* [15] был индуцирован соматический эмбриогенез.

Прямой органогенез в культуре *in vitro* как травянистых [11, 14, 31], так и древовидных пионов [20, 24, 26] использовался чаще. Было опубликовано много работ, сообщающих об активации пазушных побегов на средах, содержащих различные фитогормоны и их сочетания. Т. Hosoki et al. [11] использовали 6-бензиламинопурин (БАП) (0.5 мг/л) и ГК (1.0 мг/л) для размножения травянистых пионов сорта 'Takinoyosooi' и 'Sarah Bernhardt'. Их сочетание способствовало формированию и росту пазушных почек. Х. N. Yu et al. [30] отобрали оптимальную инициальную среду для введения эксплантов травянистых пионов 'Zhong Sheng Fen', в качестве которой была использована половинная среда МС с удвоенной концентрацией CaCl_2 , дополненная 1.0 мг/л БАП и 0.3 мг/л ГК. Н. J. Wu et al. [19] показали, что сочетание 1 мг/л БАП + 0.5 мг/л ГК + 0.1 мг/л 3-индолил уксусной кислоты (ИУК) оказывает позитивный эффект на инициальную культуру. В работе Е. Gabryszewska [14] было установлено, что комбинация БАП (2.0 мг/л) и тидиазурона (ТДЗ) (0.2 мг/л) не увеличивают темп микроразмножения травянистого пиона сорта 'Jadwiga', хотя комбинация различных цитокининов стимулирует развитие пазушных почек. L. Bouza et al. [24, 25] изучали эффект различных цитокининов (БАП, зеатин, 2-изопентиладенин) и других регуляторов роста на микроразмножение *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry'. Из всех апробированных цитокининов только БАП в концентрации 1.1 мг/л способствовал развитию пазушных почек. Х. S. Kong и М. X. Zhang [26] выявили, что добавление ауксина (0.1 мг/л α -нафтил уксусной кислоты (НУК) или ИУК) в среду, содержащую 1.0 мг/л БАП, увеличивало количество микропобегов, но стимулировало образование каллуса, который не способствовал росту побегов *P. suffruticosa* сорта 'Luo Yang Hong' и 'Yao Huang'. В исследовании Х. N. Yu et al. [31] пазушные побеги *P. lactiflora* сорта 'Da Fu Gui' успешно регенерировали на половинной среде МС с 1.0 мг/л БАП и 0.5 мг/л кинетина. Добавление 0.1 мг/л 3-индолил масля-

ной кислоты (ИМК) или ИУК в среду уменьшало число пазушных побегов. Для дальнейшего поддержания культуры авторы рекомендуют снижать концентрации БАП и кинетина до 0.5 мг/л и 0.3 мг/л соответственно, а в жаркие летние месяцы – не добавлять регуляторы роста совсем во избежание оводнения культуры.

Для активации пазушных меристем в культуре *in vitro* *P. tenuifolia* нами были апробированы различные сочетания фитогормонов, рекомендованные вышеперечисленными исследователями. Все питательные среды доводили до pH = 5.8–6.1 и автоклавировали при 121°C в течение 20 минут. Наиболее воспроизводимым и достаточным оказалось сочетание 1.0 мг/л БАП и 0.5 мг/л кинетина, использованное Х. N. Yu et al. [31] для получения микропобегов *P. lactiflora*. Коэффициент размножения составил 10.5 ± 1.0 микропобегов на эксплант в первом и втором пассаже и 5.2 ± 1.2 – в последующих субкультивированиях. Однако, как было указано ранее, морфогенетический потенциал эксплантов *P. tenuifolia* реализовывался только при наличии двойной концентрации CaCl_2 в питательной среде (рис. 2). Длительность одного пассажа составила от 21 до 35 суток.



Рис. 2. Микропобеги *P. tenuifolia* на питательной среде WPM с БАП 1.0 мг/л + кинетин 0.5 мг/л (2-й пассаж, 30-е сутки культивирования)

Укоренение и адаптация *ex vitro*

Как следует из литературы, укоренение как травянистых, так и древовидных видов пионов осуществляли по общей схеме. Сначала полученные на этапе микроразмножения побеги помещали на питательную среду с уменьшенной в два раза концентрацией минеральных солей и с



добавлением ауксинов (чаще всего ИМК), чтобы индуцировать корнеобразование. Затем материал переносили на безгормональную среду, содержащую 0.2–0.3% активированного угля, для роста и развития корней [20, 23, 31].

В работе X. N. Yu et al. [31] было показано, что ИМК 1.0 мг/л в сочетании с путресцином 2.0 мг/л успешно индуцировали ризогенез. При этом побеги *P. lactiflora* выдерживали 20 суток на среде с ауксинами, после чего переносили на среду без регуляторов роста. Для укоренения *P. suffruticosa* было рекомендовано помещать черенки в темноту на 14 суток на этапе индукции корнеобразования и снижать температуру культивирования до 18°C в течение всего этапа ризогенеза [20]. При этом развитие корней начиналось через 5–12 недель.

Полученные нами результаты относительно *P. tenuifolia* полностью согласовываются с литературными данными. Культивирование эксплантов на среде, дополненной ИМК 1.0 мг/л, в течение 14–20 суток с последующей пересадкой на безгормональную питательную среду способствовало укоренению побегов (рис. 3, а). У части эксплантов (10–20%) ризогенез отмечался уже на первом этапе экспонирования. Нами также было подтверждено, что на этапе укоренения важную роль играет температурный режим. Так, регенеранты, образовавшие корни при пониженной температуре, характеризовались лучшей приживаемостью (до 80%) на последующем этапе адаптации *ex vitro* по сравнению с растениями, культивируемыми в стандартных условиях (менее 20%).

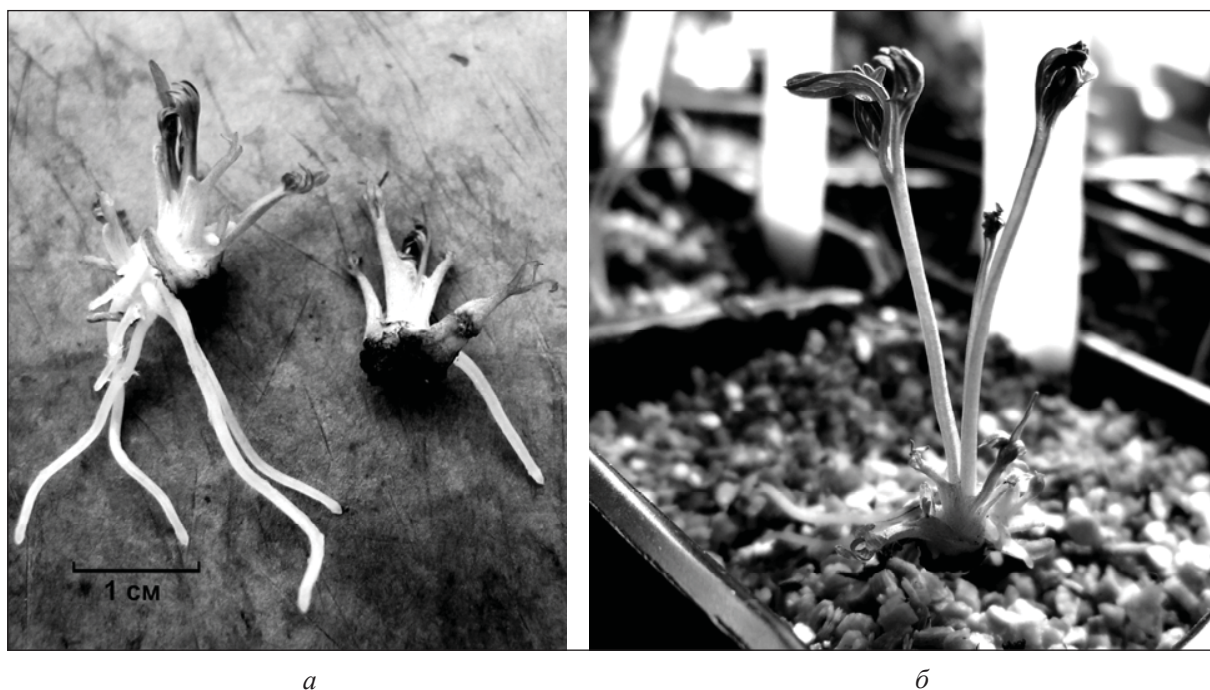


Рис. 3. Укоренённые микропобеги *P. tenuifolia ex vitro* (а) и адаптированные к нестерильным условиям регенеранты (б) (через месяц после высадки)

Как следует из литературы, адаптацию укорененных побегов представителей рода *Raemonia* также осуществляют по общепринятым методикам [8]. Растения извлекают из питательной среды, промывают дистиллированной водой и высаживают в почвенный субстрат под полиэтиленовую плёнку либо помещают в климатическую камеру с регулируемым уровнем влажности воздуха. В качестве субстрата используют смесь торфа с кварцевым песком и керамзитом, в качестве комплексного удобрения – раствор макро- и микросолей для среды WPM

[20]. Показано, что очень важно не допускать чрезмерного переувлажнения субстрата и застоя воды в поддоне.

Результаты, касающиеся адаптации *P. tenuifolia*, лишь частично не совпадают с литературными данными по *P. suffruticosa*. При использовании торфяного субстрата наблюдали массовую гибель регенерантов. Высокая приживаемость растений (до 80%) была отмечена на субстрате из чистого вермикулита, пропитанного раствором макро- и микросолей для среды WPM (рис. 3, б).



Заключение

В настоящее время *P. tenuifolia* успешно культивируется на участке открытого грунта в коллекции двудольных растений и в коллекции *in vitro* редких и исчезающих видов растений Саратовской области в учебно-научном центре «Ботанический сад» Саратовского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского. Активно разрабатываются методики длительного депонирования и сохранения вида в генетическом банке *in vitro*. Применение методов клонального микроразмножения растений позволяет значительно сократить трудовые и временные затраты на получение регенерантов *P. tenuifolia*, что может быть использовано для массового получения посадочного материала в целях восстановления численности популяций данного вида и зелёного строительства.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания в сфере научной деятельности (задание № 2014/203, код проекта 1287).

Список литературы

1. Крупкина Л. И. Род Пион – *Paeonia* L. // Флора Восточной Европы. Т. 9 / отв. ред. Н. Н. Цвелев. СПб. : Мир и семья-95, 1996. С. 171–173.
2. Попов К. П., Успенская М. С., Тихомиров В. Н. *Paeonia tenuifolia* L. // Красная книга Российской Федерации (растения и грибы) / гл. редкол. Ю. П. Трутнев и др. М. : Т-во науч. изд. КМК, 2008. С. 427–428.
3. Буланая М. В. *Paeonia tenuifolia* L. // Красная книга Саратовской области : Грибы. Лишайники. Растения. Животные / Комитет охраны окружающей среды и природных ресурсов Саратов. обл. Саратов : Изд-во Торг.-пром. палаты Саратов. обл., 2006. С. 131.
4. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. Bern, 1979. App. 1.
5. Серова Л. А., Березуцкий М. А. Растения национального парка «Хвалынский» (Конспект флоры). Саратов : Науч. кн., 2008. 194 с.
6. Брюхин В. Б. Развитие зародыша пиона *in vivo* и *in vitro* : автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб., 1993. 21 с.
7. Зарипова А. А., Шаяхметов И. Ф., Байбурина Р. К. Культура зародышей *Paeonia anomala* L. (Paeoniaceae) // Вестн. Башкир. ун-та. 2007. Т. 12, № 4. С. 36–37.
8. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе : учеб. пособие. М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
9. Зарипова А. А. Начальные этапы клонального микроразмножения пиона уклоняющегося боковыми почками // Вестн. Оренбург. гос. ун-та, 2009. № 6. С. 140–142.
10. Radtke G. W. Tissue culture of herbaceous peonies // Amer. Peony Society Bul. 1983. Vol. 246. P. 19–23.
11. Hosoki T., Ando M., Kubara T., Hamada M., Itami M. *In vitro* propagation of herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) by a longitudinal shoot-split method // Plant Cell Reports. Springer, 1989. Vol. 8. P. 243–246.
12. Brukhin V. B., Batygina T. B. Embryo culture and somatic embryogenesis in culture of *Paeonia anomala* // Phytomorphology. 1994. Vol. 44. P. 151–157.
13. Kim Y. S., Lee B. K. Effects of plant growth regulators and culture temperature on embryo culture of *Paeonia albiflora* // J. of the Korean Society for Horticultural Science. 1995. Vol. 36. P. 255–262.
14. Gabryszewska E. The influence of cytokinins, thidiazuron, paclobutrazol and red light on shoot proliferation of herbaceous peony cv. 'Jadwiga' *in vitro* // J. of Fruit and Ornamental Plant Research. Poland : Institute of Pomology and Floriculture. 1998. Vol. 6. P. 157–169.
15. Orilikowska T., Marasek A., Kucharska D. Regeneration of *Paeonia mlokosewitschii* Lom. and *P. tenuifolia* L. *in vitro* from different explants // Acta Societatis Botanicorum Poloniae. 1998. Vol. 67. P. 223–227.
16. Zhang Q. R., Sun J. Z., Ren N. H., Dong X. Y., Liu Z. M., Zhai M. Tissue culture of *Paeonia lactiflora* Pall. // J. of Henan Agricultural Sciences. 2006. Vol. 24. P. 88–90.
17. Zhang Q. R., Yang Q. S., Li Y. H. Effect of different plant growth regulators on the tissue culture of *Paeonia lactiflora* Pall. // J. of Henan Agricultural University. 2007. Vol. 41. P. 25–28.
18. Tian D., Tilt K. M., Dane F., Woods F. M., Sibley J. L. Comparison of shoot induction ability of different explants in herbaceous peony (*Paeonia lactiflora* Pall.) // Scientia Horticulturae. Elsevier, 2010. Vol. 23. P. 385–389.
19. Wu H. J., Yu X. N., Teixeira da Silva J. A., Lu G. P. Direct shoot induction of *Paeonia lactiflora* 'Zhong Sheng Fen' and rejuvenation of hyperhydric shoots // New Zealand J. of Crop and Horticultural Science. 2011. Vol. 1. P. 1–8.
20. Криницына А. А., Мурашев В. В., Успенская М. С. Микрклональное размножение *Paeonia suffruticosa* Andr. с целью интродукции в урбанитофитозенозы // Вестн. ИРГСАХА. 2011. Т. 44, № 2. С. 82–89.
21. Gildow F. E., Mitchell J. P. Initiation, growth and nuclear characteristics of tissue cultures of *Paeonia suffruticosa* // Physiol. Plant. 1977. Vol. 58. P. 790–795.
22. Li Y., Wu D., Pan S., Xu S., Wei Z., Xu Z., Li X. *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* // Kexue Tongbao. Chinese Science Bulletin. 1984. Vol. 29. P. 1675–1678.
23. Harris R. A., Mantell S. H. Effects of stage II subculture durations on the multiplication rate and rooting capacity of micro-propagated shoots of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) // J. of Horticultural Science & Biotechnology. Scotland : the James Hutton Institute, 1991. Vol. 66. P. 95–102.
24. Bouza L., Jacques M., Miginiac E. *In vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vatry': developmental effects of exogenous hormones during the multiplication phase // Scientia Horticulturae. Elsevier, 1994. Vol. 57. P. 241–251.



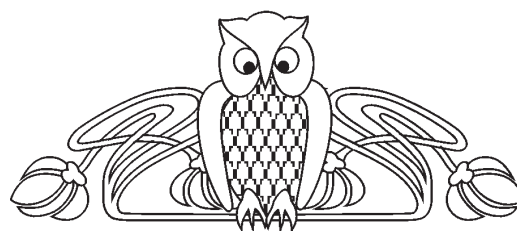
25. Bouza L, Jacques M., Miginiac E. Requirements for *in vitro* rooting of *Paeonia suffruticosa* Andr. cv. 'Mme de Vetry' // *Scientia Horticulturae*. Elsevier. 1994. Vol. 58. P. 223–233.
26. Kong X. S., Zhang M. X. Fast propagation of tree peony // *Northwest Hort*. 1998. Vol. 3(4). P. 87–89.
27. Wangl H., Staden van J. Establishment of *in vitro* cultures of tree peonies // *South African J. of Botany*. 2001. Vol. 67. P. 358–361.
28. Wang H. Y., He S. L., Tanaka M., Pham T. V., Teixeira da Silva J. A. Effects of 2,4-D on callus formation in tree peony (*Paeonia suffruticosa*) under different light conditions and light quality // *Floriculture Ornamental Biotech*. 2010. Vol. 4 (Special Iss. 1). P. 99–102.
29. Buchheim J. A. T., Meyer Jr. M. M. Micropropagation of peony (*Paeonia* spp.) // *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Springer, 1992. Vol. 20, № 4. P. 269–285.
30. Yu X. N., Wu H. J., Cheng F. Y., Teixeira da Silva J. A., Shen M. M. Studies on multiple shoot induction and proliferation of *Paeonia lactiflora* Pall. 'Zhong Sheng Fen' // *Propagation of Ornamental Plants*. 2011. Vol. 11(3). P. 144–148.
31. Yu X. N., Wu H. J., Teixeira da Silva J. A., Shen M. M. Multiple shoot induction and rooting of *Paeonia lactiflora* 'Da Fu Gui' // *African J. of Biotechnology*. 2012. Vol. 11(41). P. 9776–9781.
32. Горбунов Ю. Н., Дзыбов Д. С., Кузьмин З. Е., Смирнов И. А. Методические рекомендации по реинтродукции редких и исчезающих видов растений (для ботанических садов). Тула : Гриф и К, 2008. 56 с.
33. Николаева М. Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян. Л. : Наука, 1985. 347 с.
34. Николаева М. Г., Лянгузова И. В., Поздова Л. М. Биология семян. СПб. : Бот. ин-т им. В. Л. Комарова РАН, 1999. 232 с.
35. Ветчинкина Е. М. Биологические особенности культивирования *in vitro* семян и зародышей редких видов растений : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010. 22 с.
36. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15, № 13. P. 473–497.
37. Ikuta A., Kamiya K., Satake T., Saiki Y. Triterpenoids from callus tissue cultures of *Paeonia* species // *Phytochemistry*. Elsevier, 1995. Vol. 38. P. 1203–1207.
38. Wang J. F., Li Q., Meng H. Induction and regeneration of callus tissues in five peony cultivars // *J. of Beijing Forestry University*. 2010. Vol. 32. P. 213–216.
39. Lloud G., Mc Cown B. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // *Proc. Intern. Plant Propagators' Society*. 1980. Vol. 30. P. 420–427.
40. Meyer M. M. Culture of *Paeonia* callus by tissue culture techniques. // *Amer. Peony Society Bul.* 1976. Vol. 218. P. 27–29.

УДК 579.835: 577.114.083: 577.114.4: 577.114.7: 577.118

БИОСОРБЦИЯ Cu(II) ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОМ ENTEROBACTER CLOACAE K7

А. А. Нешко, В. С. Гринёв, Е. В. Крючкова,
Ю. П. Федоненко, Е. В. Любунь, О. В. Турковская

Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН, Саратов
E-mail: aansanura@rambler.ru



Выделен и охарактеризован экстраклеточный полисахарид (ЭПС), продуцируемый грамотрицательными непатогенными ризосферными бактериями *Enterobacter cloacae* K7. Исследован процесс биосорбции катионов Cu(II) из водного раствора полученным экзополисахаридом. Максимальная сорбционная способность биосорбента составила 0.17 мМ мг⁻¹ ЭПС или 12 г меди на 1 г ЭПС при pH 5, T = 25 °C и времени инкубации 30 мин. Экспериментальные значения адсорбции катионов Cu(II) (Q_{эксп}) биосорбентом были сопоставимы с максимально возможным значением адсорбции (Q_{макс} = 0.18 мМ), рассчитанным с использованием уравнения Лэнгмюра. Степень аффинности между исследуемым полисахаридом и катионами Cu(II) была высокой и составила 2.04 мМ л⁻¹. Полученные данные имеют практическую ценность при создании технологии ремедиации водных объектов от тяжёлых металлов.

Ключевые слова: экзополисахариды, медь, биосорбция, *Enterobacter cloacae*, биоремедиация.

Biosorption of Cu (II) by an Exopolysaccharide Isolated from *Enterobacter Cloacae* K7

А. А. Neshko, V. S. Grinev, Ye. V. Kryuchkova,
Yu. P. Fedonenko, Ye. V. Lyubun, O. V. Turkovskaya

An extracellular polysaccharide (EPS) produced by the gram-negative nonpathogenic rhizosphere bacteria *Enterobacter cloacae* K7 was isolated and characterized. The process of biosorption of Cu(II) cations from aqueous solution by the isolated exopolysaccharides was investigated. The maximum sorption capacity was 0.17 mM/mg of EPS or 12 g of Cu(II) per g of EPS at pH 5, T = 25 °C, and incubation for 30 min. The experimental values of the