ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА ЛУКА НЕРЕИДОЦВЕТНОГО В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Ахметова А.Ш., Зарипова А.А.

Южно-Уральский Ботанический сад-институт Уфимского федерального исследовательского центра РАН, Уфа
E-mail: al_sham75@mail.ru

Изучена возможность применения культуры тканей для проявления способности лука нереидоцветного к индуцированному морфогенезу, который зависел от типа экспланта, количества экзогенных фитогормонов. Эффективный метод сохранения лука как ценного растения через культуру тканей базируется на отработанной технологии микроразмножения *in vitro*, учитывающей генетические особенности клонируемого организма. Для культивирования определенного генотипа, как правило, подходят несколько питательных сред с разным набором регуляторов роста. Лук нереидоцветный можно отнести к культуре, требующий строго определенного сочетания экзогенных гормонов и минерального состава питательной среды. Выявлены следующие типы морфогенеза: геммогенез и ризогенез. Наибольшим морфогенным потенциалом характеризуется донце стерильной луковицы. Проведена оптимизация основных этапов клонального микроразмножения. Получены адаптированные растения, успешно вегетирующие в открытом грунте.

Ключевые слова: лук нереидоцветный, морфогенез, питательная среда, культура *in vitro*, геммогенез, ризогенез

INDUCTION OF MORPHOGENESIS *ALLIUM NERINIFLORUM IN VITRO* CULTURE

Akhmetova A.Sh., Zaripova A.A.

South-Ural Botanical Garden-Institute, Ufa Federal Research Centre RAS, Ufa
E-mail: al_sham75@mail.ru

Studied the possibility of using tissue culture for the manifestation of the ability of *Allium neriniflorum* to induced morphogenesis, which depended on the type of explant, the number of exogenous phytohormones. An effective method of preserving onions as a valuable plant through tissue culture is based on the proven technology of micro propagation *in vitro*, taking into account the genetic characteristics of the cloned organism. For cultivation of a certain genotype, as a rule, several nutrient media with a different set of growth regulators are suitable. *Allium neriniflorum* can be attributed to culture, requiring strictly a certain a combination of exogenous hormones and mineral the composition nutrient environment. The following types of morphogenesis were revealed: hemogenesis and rhizogenesis. The greatest morphogenic potential is characterized by the bottom of a sterile bulb. Optimization of the main stages of clonal micropropagation is carried out. Adapted plants successfully vegetating in the open ground were obtained.

Keywords: Allium neriniflorum, morphogenesis, nutrient medium, *in vitro* culture, hemogenesis, rhizogenesis

Поступила в редакцию: 17.09.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-540-544

ВВЕДЕНИЕ

Растительная клетка *in vitro* проявляет морфогенетический потенциал в более широком диапозоне, чем в природных условиях, благодаря эволюционно обусловленной у сосудистых растений способности к регенерации. К главным условиям, необходимым для индукции регенерации, относятся нарушение целостности и создание ассиметрии. В опытах *in vitro* эти условия достигаются повреждением экспланта, разнообразными физическими, прежде всего, субоптимальными температурными воздействиями, изменением освещенности и добавлением в питательную среду гормональных добавок.

Под морфогенезом обычно понимают образование и дифференциацию тканей и органов многоклеточного организма. В основе большинства морфогенетических моделей

растений *in vitro* лежит свойство тотипотентности растительных клеток. Под ним подразумевается способность растительной клетки при определенных условиях дифференцироваться и под влиянием внешних условий выбрать тот или иной путь морфогенеза [Батыгина и др., 1978: Бутенко, 1984].

Морфогенез является сложным процессом, регуляция осуществляется на клеточном, тканевом и организменном уровнях В этом процессе участвуют взаимозависимые факторы, определяющие процессы деления, растяжения, дифференциации, старения и гибели. В ходе морфогенеза возникают сформированные заново ткани и органы, и соответствующие этому процессы носят названия, отражающие существо морфогенеза – геммогенез, ризогенез [Бибикова и др., 2007].

Методы культуры клеток и тканей широко используется для размножения декоративных растений. Одним из ценных декоративных многолетников является культура лука. Род *Allium* L. относится к семейству луковые *Alliaceae* и насчитывает около 900 видов, распространенных в основном в северном полушарии. Среди ресурсных дикорастущих растений большой интерес представляют виды, обладающие целым комплексом полезных свойств – это лекарственные, пищевые, декоративные и медоносные растения. Хорошие вкусовые качества, высокое содержание каротина, аскорбиновой кислоты и питательных веществ, устойчивость к заморозкам, вредителям и другие ценные особенности присущи многим видам лука. Среди луков довольно много редких, среди них и лук нереидоцветный. Поэтому этот вид внесен в Красную книгу Российской Федерации с 3 статусом редкости [2008].

Целью исследования являлось выявление индукции морфогенеза лука нереидоцветного в условиях *in vitro*. Для достижения этой цели поставлены следующие задачи: выявить морфогенетический потенциал различных типов эксплантов (луковичных чешуй, донца) исследуемого вида в культуре *in vitro*; определить влияние гормональных, трофических и физических факторов на микроразмножение лука.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследований – редкий вид лук нереидоцветный из коллекции луков Южно-Уральского Ботанического сада-института.

Метод клонального микроразмножения, использованный в работе, – образование адвентивных побегов непосредственно в тканях экспланта, согласно классификации, предложенной Мурасиге в 1977 г.

В качестве первичных эксплантов использовали семена лука нереидоцветного. Стерилизацию материала проводили в условиях ламинар-бокса в 70% растворе этанола, затем в 0,1% ртутьсодержащем соединении (диацид). Экспозиция воздействия стерилизующего раствора составляла от 5 до 9 мин. Подобный способ обеспечивал на 100% стерильность материала.

Питательные среды готовили по прописи Мурасиге и Скуга (MS) [Murashige T., Skoog F., 1962], дополненной цитокининами. Для индукции морфогенеза использовали среды Кворина-Липуавра (QL) [Quoirin M., Lepoivre P., 1977] и Данстена и Шорта (BDS) [Dunstan D.J., Short K.C., 1977], различающихся по типу и концентрации цитокининов: 2-iP (N6-(2-изопентиаденин), БАП (6-бензиламинопурин), кинетин (Кин) и ауксинов: НУК (α-нафтилуксусная кислота).

Экспериментальные работы с использованием метода культуры тканей проведены по общепринятым методикам [Бутенко, 1964; Калинин и др., 1980; Катаева и др., 1983].

Основными показателями, определяющими эффективность размножения, служили число побегов, образовавшихся *de novo* в течение одного пассажа.

Экспланты культивировали в условиях фотопериода 16/8 часов свет/темнота при 24Cº и влажности воздуха 70 %.

Через две недели от начала введения эксплантов в культуру *in vitro* проводили наблюдения. Выявляли пути морфогенеза, согласно существующей в настоящее время классификации путей морфогенеза [Батыгина, Васильева, 2002], изучаемого вида на стадии введения в культуру *in vitro* в зависимости от состава питательной среды и от типа экспланта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Семена лука нереидоцветного вводили на питательную среду MS. Испытывали следующие регуляторы роста: БАП в концентрации 0,5; 1,0 мг/л и 2-iP – 1,0 мг/л. Использование БАП в питательной среде было неэффективным, так как прорастания семян не происходило. На среде, содержащей 2-iP в концентрации 1,0 мг/л, наблюдали процесс прорастания с длительностью пассажа 60 дней, что подтверждает данные исследований авторов [Ветчинкина Е.М. и др., 2012]. Далее тип морфогенетической реакции у лука нереидоцветного зависел от количества ауксинов и цитокининов, введенных в питательную среду, а также от типа экспланта.

Как известно из литературы, для выявления особенностей морфогенеза весьма существенным является правильный выбор цитокинина. Успешные результаты были получены при использовании для размножения *in vitro* различных таксономических групп растений цитокинина БАП [Бутенко, 1999; Высоцкий, 1998]. Одним из путей повышения коэффициента размножения растений может быть использование, наряду с традиционным цитокинином БАП более эффективных препаратов с цитокининовой активностью. Перспективным в этом отношении является 2-iP.

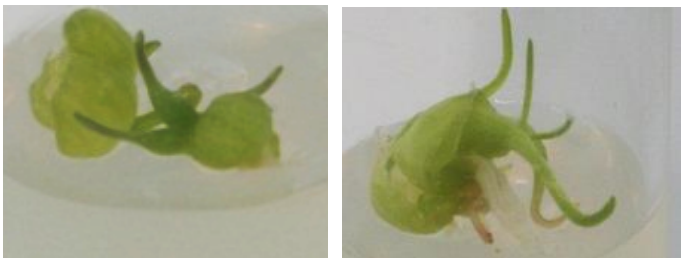
Для исследования регенерационной способности стерильные луковицы диаметром 6-8 мм, полученные *in vitro*, фрагментировали на два сегмента чешуй и донце. Инициацию морфогенетических процессов проводили на питательной среде MS, содержащей два варианта комбинации регуляторов роста 1) 2-iP 1,0 мг/л; 2) БАП 0,2 мг/л + НУК 0,01 мг/л.

Проведенные исследования показали, что через две недели культивирования с адаксиальной (внутренней) стороны сегментов чешуй наблюдалось образование меристематических зон, а через месяц начали формироваться адвентивные почки и побеги. При этом на питательной среде MS, дополненной 2-iP 1,0 мг/л получены 2-3 дополнительных побега, на БАП 0,2 мг/л + НУК 0,01 мг/л – 1-2.

Использование фрагментов донца луковицы лука нереидоцветного для регенерации не дало положительных результатов при выбранных условиях эксперимента. В процессе продолжительного культивирования экспланты сохраняли жизнеспособность без возникновения и развития структурных элементов. Поэтому донца, субкультивировали на питательную среду QL, содержащую НУК в концентрации 0,1 мг/л и среду BDS, дополненную кинетином в концентрации 2,0 мг/л. Процент регенерации донца с частью чешуек лука нереидоцветного был достаточно высоким на всех питательных средах и

колебался от 49 до 93%. Наименьшая регенерационная способность отмечалась на среде BDS (49%), на QL – максимальная (93%).

По литературным данным, существенное влияние на увеличение количества образующихся луковичек Трубчатых лилий оказывало присутствие в питательных средах регулятора роста – НУК в концентрации 0,1 мг/л [Соколова, 2012]. В наших исследованиях применение 0,1 мг/л НУК способствовало наибольшей регенерации почек на донце лука нереидоцветного – 93%. В ходе исследований выявили, что через 1,5 месяца культивирования отмечалось появление почек, которые через 2-3 месяца формировали луковицы (рис. 1).



А **Б**

Рис. 1 Формирование луковиц из фрагментов донца:
А – на питательной среде BDS; Б – на питательной среде QL

Коэффициент размножения образовавшихся луковиц зависел от состава питательной среды. Максимальное число луковиц образовывалось на среде QL – 9 шт./на эксплант (рис. 2).

Рис. 2. Лук нереидоцветный через 6 мес культивирования
на питательной среде QL, содержащей НУК 0,1 мг/л

В то время как на среде BDS коэффициент мультипликации составил 2 шт./на эксплант. Наибольшего диаметра адвентивные луковицы достигли на питательной среде QL – 5,9 мм через 6 недель культивирования. Следовательно, оптимальной является питательная среда Кворина-Липойвра для культивирования донца с частью чешуек луковиц, позволившая получить луковицы с коэффициентом размножения 9 в течение 5-6 месяцев.

Укоренение лука нереидоцветного происходило на питательной среде мультипликации, поэтому не требовалось дополнительной гормональной стимуляции для образования корней.

Миниатюрные растеньица с хорошо развитой надземной частью и корневой системой пересадили из пробирок в почвенный субстрат. Этот этап технологии выполняют в специальном помещении для доращивания со стабильными условиями: температурой 20-22°С, относительной влажностью 70-80%, при фотопериоде 14-16 ч. Меристемные растения пикировали в продезинфицированные вазоны объемом 0,25 л со смесью дерновой земли и песка в соотношении 2:1. Смесь обеззараживали паром под давлением 4 атм., с экспозицией пропаривания 30-45 мин до момента достижения прогреваемой массы (слоем 30-40 см)

температуры 120°С. При соблюдении оптимальных условий пересадки и ухода за растениями приживаемость составила 90-100%. Полученные адаптированные растения успешно вегетируют в открытом грунте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клетки специализированных тканей чешуи и донца стерильной луковицы в условиях *in vitro* могут проявлять тотипотентность. Способность к индуцированному морфогенезу тканей луковицы зависит от типа экспланта, количества экзогенных фитогормонов. Выявлены следующие типы морфогенеза: геммогенез и ризогенез. Наибольшим морфогенным потенциалом характеризуется донце стерильной луковицы. Отличительной особенностью морфогенеза у лука нереидоцветного является его высокая регенерационная активность. Подобранные оптимальные питательные среды и условия культивирования эксплантов *in vitro*, позволяют получить до 6700 луковиц в год от одного донца, 250 – от двух чешуй.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vitro* и *vivo*. Эмбриогенез у покрытосеменных растений // Бот. журн., 1978. Т. 63. № 1.С. 87-110.
2. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб., 2002. 232 с.
3. Бибикова А.В., Горпенченко Т.Ю., Журавлев Ю.Н. Растения как объект биотехнологии // Комаровские чтения. 2007. Вып. 55. С. 184-211.
4. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. С. 64–102.
5. Бутенко Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений. / гормональная регуляция онтогенеза растений. М.: Наука, 1984. С. 42-54.
6. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. С. 72–74.
7. Ветчинкина Е.М. Ширнина И.В., Ширнин С.Ю., Молканова О.И. Сохранение редких видов растений в генетических коллекциях *in vitro* // Вестник Балтийского федерального университета им. И. Канта. 2012. Вып. 7. С. 109–118.
8. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного материала плодовых и ягодных растений. Автореф. дис. … докт. с.-хоз. наук. М., 1998. С. 17–18 .
9. Калинин В.Ф., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. С. 53–95.
10. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
11. Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. С. 40–47.
12. Соколова М.А. Комплексная оценка генофонда лилий в ЦЧР и совершенствование способов вегетативного размножения. Автореф. дис. …канд. с.-хоз. наук. Мичуринск, 2012. С. 16–18.
13. Dunstan D.J., Short K.C. Improved growth of tissue cultures of the onion *Allium cepa* // Physiol. Plant. 1977. Vol. 41. № 1. P. 70–72.
14. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. V. 15. № 13. P. 473–497.
15. Quoirin M., Lepoivre P. Improved medium for *in vitro* culture of Prunus sp. // Acta Hortic. 1977. V. 78. P. 437–442.