

Список литературы

Андрианова Ю. Е., Тарчевский И. А. Хлорофилл и продуктивность растений. М. : Наука, 2000. 134 с.

Голуб Н. А. Параметры первичной корневой системы озимой пшеницы и возможности их использования в оценке сортов // Физиология продуктивности и устойчивости зерновых культур : сб. науч. тр. Краснодар, 1988. С. 43–47.

Иванов В. Б. Клеточные механизмы роста растений. М. : Наука, 2011. 104 с.

Коробко В. В., Волков Д. П., Жук Е. А., Букарев Р. В. Определение устойчивости и особенностей развития проростков зернового сорго в условиях разнокачественного засоления // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2012. Т. 12, вып. 4. С. 67–71.

Мокроносов А. Т., Гавриленко В. Ф. Фотосинтез : физиолого-экологические и биохимические аспекты. М. : Изд-во МГУ, 1992. 320 с.

Кумаков В. А., Евдокимова О. А., Буянова М. А. Способы ранжирования генотипов яровой пшеницы по их потенциальной продуктивности и устойчивости к неблагоприятным факторам среды по накоплению и распределению сухой массы растений в период вегетации // Сельскохозяйственная биология. 2000. № 1. С. 108–112.

Шарипова Г. В., Веселов Д. С., Чернов В. Е., Пендинен Г. И., Кудоярова Г. Р. Ростовая реакция на засоление у растений разных сортов ячменя и ее связь с соотношением массы побег/корень и характером изменения транспирации // Современная физиология растений : от молекул до экосистем : тезисы докл. междунар. конф. Сыктывкар, 2007. С. 427–429.

УДК 581.143.6:582.5

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛОНАЛЬНОГО
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *ALLIUM REGELIANUM* А. ВЕСКЕР

Т. А. Крицкая, А. С. Кашин, А. О. Попова

*Саратовский государственный университет им. Н. Г. Чернышевского,
Учебно-научный центр «Ботанический сад»
410010, Саратов, ул. Академика Навашина
E-mail: kriczkaya.tatyana@mail.ru*

Оптимизирован протокол клонального микроразмножения *Allium regelianum*, включающий три последовательных этапа. На первом этапе получены луковички-доноры эксплантов из зрелых семян; на втором – пролиферация под действием экзогенных цитокининов; на третьем – окончательное формирование микролуко-

вичек на питательной среде без регуляторов роста. Показано, что второй и третий этапы могут повторяться неоднократно. Установлено, что необходимым условием индукции микроразмножения является механическое разрушение апикальной меристемы лукович посредством разреза.

Ключевые слова: *Allium regelianum*, *in vitro*, клональное микроразмножение.

IMPROVING THE EFFICIENCY OF *ALLIUM REGELIANUM* A. BECKER CLONAL MICROPROPAGATION

T. A. Kritckaia, A. S. Kashin, A. O. Popova

An effective protocol for clonal micropropagation of *Allium regelianum* was optimized, including three following steps. In the first step bulbs-donors of explants were obtained from ripe seeds; in the second step – propagation under effects of exogenous cytokinins; and in the third step – final bulblets formation on the hormone-free medium. The second and the third steps may be repeated more than once. The importance of apex destruction for micropropagation was demonstrated.

Key words: *Allium regelianum*, *in vitro*, clonal micropropagation.

Сохранение биоразнообразия – одна из важнейших задач, стоящих перед биологической наукой. Немаловажным подспорьем в этом являются современные методы биотехнологии. В частности, метод клонального микроразмножения растений позволяет не только массово получать посадочный материал экономически ценных многолетних культур, но и сохранять редкие и исчезающие виды растений, имеющие трудности с семенным размножением (Бутенко, 1999). Разработка эффективных методов клонального микроразмножения растений является основным и необходимым условием и в работах по созданию генетических банков *in vitro* (Митрофанова, 2011).

Объектом нашего исследования является лук регелевский (*A. regelianum* A. Becker) – эндемик юго-востока Русской равнины, имеющий тенденцию к сокращению численности (Красная ..., 2006; Красная ..., 2008).

Разработке эффективных протоколов микроразмножения представителей рода *Allium* посвящено немало работ отечественных и зарубежных авторов (Вечернина и др., 2000; Новикова и др., 2008; Hussey, Falavigna, 1980; Ziv, Lilien-Kipnis, 2000; Le Guen-Le Saos et al., 2002; Musial et al., 2005). Но, несмотря на разнообразие подходов к управлению процессами морфогенеза изучаемых объектов, их объединяет общее представление о

том, что выбор экспланта и условия культивирования подбираются индивидуально в зависимости от культивара и его генотипа.

Цель данной работы состояла в получении асептической культуры *A. regelianum* и разработке эффективного способа микроразмножения для последующего решения задач, связанных с сохранением вида в условиях замедленного роста и восстановлением численности природных популяций.

Материал и методы

Руководствуясь правилами сбора редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений для ботанических садов (Горбунов и др., 2008), в качестве исходных эксплантов брали семена. Зрелые семена, собранные из природной популяции, подвергали ступенчатой стерилизации, согласно общепринятым методикам (Бутенко, 1999), затем помещали на питательную среду MS (Murashige and Skoog, 1962) без регуляторов роста в условиях ламинарного бокса и культивировали 1.0–1.5 мес. при температуре $+25\pm 2^\circ\text{C}$ и 16/8-фотопериоде до полного формирования проростков. Полученные миниатюрные луковички пересаживали на питательную среду MS с различными регуляторами роста (6-бензиламинопурин (БАП), кинетин, зеатин, 2-изопентиладенин (2Ip)) с целью выявления оптимальных условий для активации пазушных меристем. При этом использовали три варианта эксплантации: одну часть луковички оставляли целой, у второй разрезали донце пополам, у третьей разрезали донце крест-накрест на 4 одинаковые доли.

На этапе адаптации к нестерильным условиям регенеранты извлекали из пробирок, промывали дистиллированной водой и высаживали в пластиковые контейнеры по 200–300 мл с субстратом, состоящим из смеси садовой земли и песка в соотношении 1 : 1, под полиэтиленовую плёнку. Постепенный доступ воздуха обеспечивали посредством перфорации полиэтиленовой плёнки.

Все эксперименты выполняли в трёх повторностях. На каждую повторность брали не менее 30 эксплантов. Результаты статистически обработаны с использованием стандартных методик (Зайцев, 1984; Гланц, 1999).

Результаты и их обсуждение

Показано, что наиболее эффективная схема стерилизации семян включала следующие ступени: раствор синтетического моющего средства – 30 мин, этиловый спирт 70% – 2 мин, раствор бытового отбели-

вателя «Белизна» 25% – 25 мин, трёхкратное ополаскивание стерильной дистиллированной водой. Доля освобождённых от инфекции семян после подобной обработки составила 95.0%, количество проросших семян – 53.3%.

Массовое прорастание семян наблюдали на 4–9-й день культивирования. Через 1–1,5 мес. экспонирования проростки формировали луковицы с диаметром 4–6 мм.

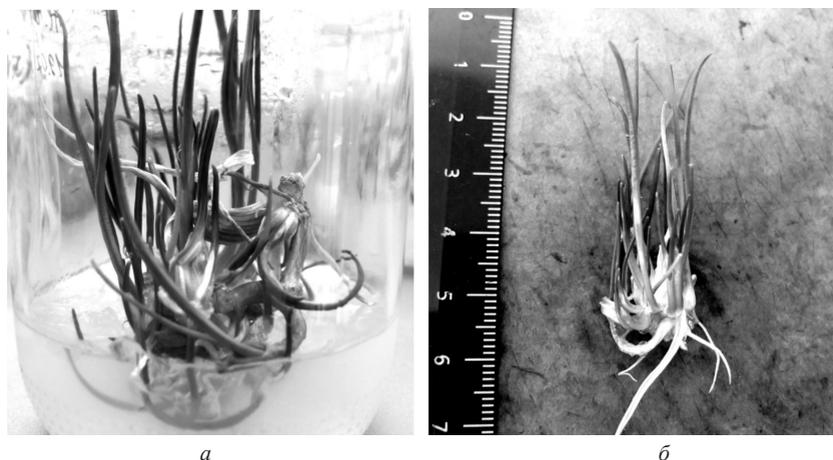
Было установлено, что луковицы, разрезанные на 2 равные части, обладали наибольшим морфогенетическим потенциалом по сравнению с остальными вариантами эксплантации. Коэффициент размножения при добавлении в питательную среду БАП, кинетина, зеатина и 2Iр (по 0,5 мг/л) через 6 недель культивирования составил 1 : 4–1 : 9 в каждом из вариантов. Луковицы, помещенные на питательную среду целыми, не пролиферировали ни в одном из перечисленных вариантов; разрезанные на 4 доли формировали такое же количество микролуковичек, что и разрезанные пополам, однако лишь 1/3 подобных эксплантов оставалась жизнеспособной, 2/3 – некротизировали.

Необходимо подчеркнуть, что из всех перечисленных цитокининов менее предпочтительным был БАП, поскольку при длительном воздействии на культуру (более трёх пассажей) он вызывал оводнение эксплантов и регенерировавших микролуковичек. Наиболее стабильные результаты отмечены при культивировании лука на среде MS, дополненной БАП (0,2–0,3 мг/л) в сочетании с зеатином (0,5 мг/л). Коэффициент размножения в данном варианте составил $8,3 \pm 0,8$ микролуковичек на эксплант на протяжении десяти циклов клонального микроразмножения (рисунки). Повышение концентрации БАП и зеатина (до 0,5 мг/л и 1,0 мг/л соответственно) оказывало ингибирующий эффект и снижало эффективность микроразмножения до $5,7 \pm 0,6$.

Полученные микролуковички окончательно формировались и образовывали корни на питательной среде MS без регуляторов роста со стандартным содержанием сахарозы (30 г/л) через 4–5 недель культивирования при +25°C и 16/8-фотопериоде (см. рисунок).

На этапе адаптации к нестерильным условиям доля жизнеспособных регенерантов составила $77,9 \pm 6,5\%$.

В настоящее время работы по созданию генетических банков *in vitro* ведутся во многих ботанических садах России, в том числе и с использованием в качестве объектов представителей рода *Allium*. Например, в ра-



Пролиферация эксплантов на питательной среде MS с БАП 0,25 мг/л и зеатином 0,50 мг/л (а) и последующее формирование микролуковичек после культивирования на среде MS без регуляторов роста (б)

боте Т. В. Полубояровой и др. (2011) разработана методика культивирования ряда дикорастущих видов луков на этапе ввода и пролиферации. При этом в качестве первичных эксплантов использовали цветоложе цветков. В первом пассаже отмечен высокий коэффициент размножения (28) и доказана генетическая стабильность материала. Однако авторами не отслежены последующие биотехнологические этапы, основное внимание которым уделено в нашем исследовании.

Использование нами ступенчатой стерилизации, в которой дезинфицирующим агентом являлся гипохлорит натрия, оказалось достаточно эффективным (95% семян без инфекции). Результаты не уступают данным (93% чистых семян) Т. В. Полубояровой и Т. И. Новиковой (2009), которые использовали схему стерилизации, включающую обработку 70% этанолом в течение 30 секунд и 0,2% раствором сулемы – 10–15 минут, для проращивания дикорастущих луков подрода *Melanocrommyum*. Процент проросших семян в нашем эксперименте (53,3%) оказался в 4 раза выше по сравнению с результатами (13,0%), полученными С. Е. Агеевой с соавт. (2012) после обработки семян *A. regelianum* 5% раствором лизофармина в течение 7 минут. Авторы отмечали прорастание семян на 9-й день культивирования, что подтверждает наши данные.

Приёмы с вырезанием или надрезанием донца широко применяются в цветоводстве для получения микролуковичек гиацинта, нарцисса, пролески и других растений с плёнчатыми луковичками (Мак-Миллан Броуз, 1992).

Подход, послуживший основой для нашего эксперимента с разрезанием донца, был использован в 1980 г. G. Hussey и A. Falavigna для микроразмножения элитных сортов культурного вида *A. cera in vitro*. В качестве первичных эксплантов авторы использовали чешуи лукович с фрагментом донца, а в последующих субкультивированиях – регенеранты, разрезанные вдоль на две равные части до базальной пластинки. Авторами были доказаны происхождение микролуковичек из пазушных меристем, их генетическая стабильность, а также возможность использования их в качестве эксплантов для следующего цикла микроразмножения. Показано, что при выполнении продольного разреза очень важно разрушить апикальную меристему побега. Если этого не сделать, то только одна половина (без вершины) будет регенерировать множественные побеги, тогда как половина с неповрежденной верхушкой восстановит один-единственный побег. Это объясняет, почему в нашем эксперименте целая луковичка *in vitro* не образовывала регенеранты.

Авторы сходятся в том, что для эффективной пролиферативной активности у различных видов *Allium* необходимо присутствие в среде цитокининов (Агеева и др., 2012; Ziv, Lilien-Kipnis, 2000; Kim et al., 2003), в то время как экзогенные гиббереллины, например, напротив, оказывали ингибирующее действие на рост листьев и корней и формирование луковичек. Добавление в питательную среду ингибиторов гиббереллинового синтеза (таких как ациномидол) способствовало пролиферации микролуковичек (Le Guen-Le Saos et al., 2002). По этой причине мы в своей работе сосредоточили внимание на подборе сочетания цитокининов для достижения максимального положительного эффекта пролиферации.

При этом было известно, что при попытке оптимизации клонального микроразмножения *A. regelianum* использование целых луковичек и БАП в качестве единственного регулятора роста не дало положительных результатов (Агеева и др., 2012). Аналогичная картина наблюдалась в нашем эксперименте с использованием БАП в качестве единственного цитокинина и без разрезания луковичек. Как и у вышеупомянутых авторов, коэффициент размножения не превысил 3 микролуковичек на эксплант при довольно длительном культивировании.

Использование нами среды MS, дополненной БАП (0,2–0,3 мг/л) в сочетании с зеатином (0,5 мг/л), с использованием приёма разрезания микролуковичек привело к существенному увеличению коэффициента размножения до $8,3 \pm 0,8$ микролуковичек на эксплант на протяжении, по крайней мере, десяти циклов клонального микроразмножения. Аналогичный позитивный эффект совместного использования БАП и зеатина отмечался нами ранее в работе с культурой *Potentilla vulgarica* Juz. (Крицкая, Кашин, 2013).

Для *A. sativum* L. (Kim et al., 2003) на этапе ввода в культуру использовали жидкую питательную среду MS с 2% сахарозы и 0,5 мг/л 2-изопентиладенамина. При этом микроразмножение происходило на среде MS, содержащей 11% сахарозы, 0,1 мг/л α -нафтилуксусной кислоты и 10 мМ жасмоновой кислоты. Авторами было показано, что коэффициент размножения достигает 135 микролуковичек на эксплант. Однако сформировавшимся луковичкам требовался период покоя в темноте при +4°C в течение 8 недель. Подобранное нами сочетание цитокининов при меньшем, чем у указанных авторов, коэффициенте размножения, позволяет исключить для дальнейшего использования микролуковичек в клональном микроразмножении стадию довольно длительного и специфичного по условиям преодоления покоя. К тому же высокий коэффициент размножения, отмеченный авторами у эксплантов *A. sativum*, может быть обусловлен видоспецифичностью объекта.

Преимуществом использования приёма с разрезанием донца является отсутствие стадии каллусогенеза, нежелательной в работе с редкими и исчезающими видами растений (Бутенко, 1999), и возможность непрерывного культивирования эксплантов в стандартных условиях без периода глубокого покоя, необходимого при получении микролуковичек из каллуса (Dunstan, Short, 1978).

Результаты по адаптации регенерантов *A. regelianum* к нестерильным условиям ($77,9 \pm 6,5\%$) полностью согласуются с данными С. Е. Агеевой и др. (2012). При использовании аналогичного субстрата и полиэтиленовой плёнки доля жизнеспособных растений составила 70–90%. Однако указанные авторы отмечали несколько пониженный процент укоренения эксплантов (80%) по сравнению с нашими результатами (100%) на питательной среде без регуляторов роста.

Эффективный подход к сохранению культуры *A. sepa* в условиях замедленного роста был разработан U. Kästner et al. (2001). Авторы изучали

влияние условий освещения, концентрации сахарозы и этилена на жизнеспособность микролуковичек в течение года без пересадки и установили, что ключевым фактором в данном случае является сахароза. Её оптимальная концентрация составила 100 г/л. Рекомендации авторов послужили нам основой для дальнейшей работы по сохранению *A. regelianum* в условиях замедленного роста при низких положительных температурах ($+5\pm 1^\circ\text{C}$).

Заключение

Таким образом, нами было показано, что для *A. regelianum* возможен путь индукции морфогенеза *in vitro* посредством механического разрушения апикальной меристемы и активации пазушных почек. Установлено, что наилучшими эксплантами для стадии микроразмножения *A. regelianum* являются луковички, разрезанные вдоль на 2 равные части. Полное формирование луковичек происходит на питательной среде без регуляторов роста в стандартных условиях. Полученные луковички могут быть использованы для следующего цикла клонального микроразмножения либо адаптированы к нестерильным условиям с целью последующего использования в качестве посадочного материала.

Список литературы

Агеева С. Е., Коротков О. И., Гребенников К. А., Круглова Л. Н., Сафронова Г. Н., Жолобова О. О. Опыт изучения и сохранения вида *Allium regelianum* A. Becker Волгоградским региональным ботаническим садом на территории Волгоградской области // Вестн. Удмурт. ун-та. Биология. Науки о Земле. 2012. Вып. 3. С. 34–40.

Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе : учеб. пособие. М. : ФГК-ПРЕСС, 1999. 160 с.

Вечернина Н. А., Таварткиладзе О. К., Жаркова С. В. Каллусогенез и регенерационная способность тканей и органов *Allium cepa* L. *in vitro* // Изв. АГУ. 2000. № 3. С. 69–71.

Гланц С. Медико-биологическая статистика. М. : Практика, 1999. 459 с.

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.

Зайцев Г. Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М. : Наука, 1984. 424 с.

Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М. : Т-во науч. изд. КМК, 2008. 855 с.

Красная книга Саратовской области : Грибы. Лишайники. Растения. Животные. Саратов : Изд-во Торг.-пром. палаты Сарат. обл., 2006. 528 с.

Крицкая Т. А., Каушин А. С. Использование метода культуры *in vitro* для сохранения некоторых редких и исчезающих кальцефильных видов растений Саратовской области // Изв. Сарат. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2013. Т. 13, вып. 4. С. 65–73.

Мак-Миллан Броуз Ф. Размножение растений : пер. с англ. М. : Мир, 1992. 192 с.

Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. Киев : Аграрна наука, 2011. 344 с.

Новикова Т. И., Набиева А. Ю., Полубоярова Т. В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского ботанического сада // Вестн. ВОГиС. 2008. Т. 12, № 4. С. 564–572.

Полубоярова Т. В., Новикова Т. И. Прорастивание семян дикорастущих видов луков рода *Allium* L. подрода *Melanocrommyum* Webb et Berth. в условиях *in vitro* // Вестн. Алтай. гос. аграр. ун-та. Агрэкология. 2009. № 1 (51). С. 22–26.

Полубоярова Т. В., Андропова Е. В., Новикова Т. И., Виноградова Т. Ю. Регенерация побегов из тканей цветка *Allium altissimum* (*Alliaceae*) в культуре *in vitro* // Растительные ресурсы. 2011. Т. 47, № 3. С. 33–42.

Dunstan D. I., Short K. C. Shoot production from onion callus tissue culture // Sci. Hortic. 1978. Vol. 9. P. 99–110.

Hussey G., Falavigna A. Origin and production of *in vitro* adventitious shoots in the onion, *Allium cepa* L. // J. of Experimental Botany. 1980. Vol. 31, № 125. P. 1675–1686.

Kästner U., Klahr A., Keller E. R. J., Kahane R. Formation of onion bulblets *in vitro* and viability during medium-term storage // Plant Cell Reports. 2001. Vol. 20. P. 137–142.

Kim E. K., Hahn E. J., Murthy H. N., Paek K. Y. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid culture // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. Vol. 73. P. 231–236.

Le Guen-Le Saos F., Hourmant A., Esnault F., Chauvin J. E. *In vitro* bulb development in Shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum Group) : effects of anti-gibberellins, sucrose and light // Annals of Botany. 2002. Vol. 89. P. 419–425.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. № 13. P. 473–497.

Musial K., Bohanec B., Jakse M., Przywara L. The development of onion (*Allium cepa* L.) embryo sacs *in vitro* and gynogenesis induction in relation to flower size // *In vitro* cellular & developmental biology – Plant. 2005. Vol. 41. P. 446–452.

Ziv M., Lilien-Kipnis H. Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro* // Plant Cell Reports. 2000. Vol. 19. P. 845–850.