

ЭКОЛОГИЯ

УДК 575: 631.527

Л.И. Тихомирова

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПРОЦЕССА КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ СОРТОВ *IRIS HYBRIDA* HORT. ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Ключевые слова: культура *in vitro*, ирис, микроклональное размножение, питательные среды, растения – регенеранты, регуляторы роста, анатомические срезы.

Одной из основных проблем при микроклональном размножении является поддержание длительно пассируемой культуры. При длительном культивировании растительных тканей на питательных средах с повышенным содержанием цитокининов (5-10 мг/л) происходит постепенное накопление их в тканях выше необходимого физиологического уровня, что приводит к появлению токсического действия и формированию растений с измененной морфологией. Для ряда культур на этапе собственно микроразмножения снижают содержание гормонов цитокининового типа действия, что приводит к уменьшению коэффициента размножения.

При длительном пассировании *Gerbera jamesonii* Bolus на средах с одной и той же концентрацией БАП новообразующиеся побеги имели морфологические изменения, плохо укоренялись, погибали. Отмеченное явление позволило сделать вывод о необходимости чередования циклов культивирования с различной концентрацией цитокинина в питательной среде при одновременном обеспечении достаточной скорости размножения. Циклы микроразмножения: активация новообразования почек при 5 мг/л цитокинина и элонгация развивающихся побегов при 1 мг/л повторяли 12-15 раз в течение 2 лет [1].

Цель работы – разработать элементы технологии микроклонального размножения для длительно пассируемой культуры *Iris hybrida hort.* на основе анатомических исследований корневища.

Объекты, методы и условия исследований

Объекты исследований – перспективные сорта отечественной и зарубежной селекции *I. Hybrid* из коллекции НИИ садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко, г. Барнаул.

Питательные среды готовили по прописи Мурасиге и Скуга, с добавлением 30 г/л сахарозы. Из регуляторов роста на этапе введения ирисов в культуру изучено действие нафтилуксусной кислоты (НУК), 3-индоллилмасляной кислота (ИМК), 6-бензиламинопурина (БАП) в концентрациях 0,1-5,0 мкМ. Из негормональных стимуляторов роста использовали L-глутамин и аденин сульфат в количестве 100 мг/л.

Экспериментальные работы с использованием метода культуры тканей проведены по общепринятым методикам [2]. Основными показателями, определяющими эффективность размножения, служили число микропобегов (пазушных и адвентивных), образовавшихся *de novo* в течение одного пассажа, и их длина. При умножении этих показателей получали общую высоту растений.

Анатомическое строение корневища в культуре *in vitro* изучали на постоянных препаратах, изготовленных по общепринятой методике [3].

Растения выращивали в лабораторных условиях при искусственном освещении (2000-4000 лк) в условиях фотопериода: 16/8 ч свет/темнота, температура 24-26°C.

Результаты и их обсуждение

Размножение *I. hybrida* осуществлялось многократным пассированием побегов, полученных в результате прямого органогенеза. На этапе собственно микроразмножения *I. hybrida* использовали питательные среды, содержащие 1.0, 2.5 и 5.0 мкМ 6-БАП, а также среды, содержащие такое же количество цитокинина, дополненные ауксинами

НУК и ИМК в количестве 0,1 мкМ. В качестве контроля была использована питательная среда, содержащая 0,5 мкМ 6-БАП. Среднее значение числа побегов во всех вариантах опыта составило 1,49 в течение 8 пассажей, при этом среднее значение высоты растения было равно 48,4 мм. У *I. hybrida* была отмечена высокая склонность к витрификации. Выше среднего значения число побегов и высоту растений наблюдали на средах с 1,0 мкМ 6-БАП. Было отмечено, что морфогенный эффект цитокинина более активно реализуется при взаимодействии с регуляторами роста ауксиновой природы. На средах, содержащих 5,0 мкМ 6-БАП, через 3-5 пассажей наблюдали витрификацию побегов (табл.).

У *I. hybrida* сорт Chardette на питательных средах, содержащих 1,0 мкМ 6-БАП, коэффициент размножения составил 2,2, а среднее значение высоты растений равно 48,44 мм. На продольном анатомическом срезе корневища хорошо просматривается основная паренхима, наружный слой пер-

вичной коры состоит из опробковевших клеток. В пазухе листа развивается адвентивный побег. Отмечена активизация клеточных делений в зоне центрального цилиндра.

На питательных средах, содержащих 2,5 мкМ 6-БАП, у *I. hybrida* при гистологическом исследовании было обнаружено слабое побегообразование, коэффициент размножения составлял 1,15. На базальной части побега при продольном срезе была обнаружена защитная пробка из некротизированных тканей. Пазушные почки и придаточные корни закладывались одновременно. В клетках паренхимы были видны крахмальные зёрна (рис. 1).

При добавлении ауксинов в питательные среды, содержащие 2,5 мкМ 6-БАП, побегообразовательная деятельность у *I. hybrida* сорт Chardette оставалась на прежнем уровне. Коэффициент размножения составлял 1,38. При анатомическом исследовании побегов отличий, связанных с введением ауксинов, обнаружено не было.

Таблица

Влияние концентрации БАП, НУК и ИМК на число и высоту побегов у *I. hybrida* сорт Chardette

БАП, мкМ	MS+БАП		MS + БАП + 0,1мкМ НУК + 0,1 мкМ ИМК	
	число побегов	высота растения, мм	число побегов	высота растения, мм
0,5 контр.	1,2±0,4	66,6±4,4		
1,0	2,0±0,5	48,44±6,1		
2,5	1,15±0,5	47,93±2,5	1,38±0,4	47,91±6,1
5,0	1,3±0,3	44,06±3,3 (витрификация)	1,45±0,2	55,76±2,4 (витрификация)

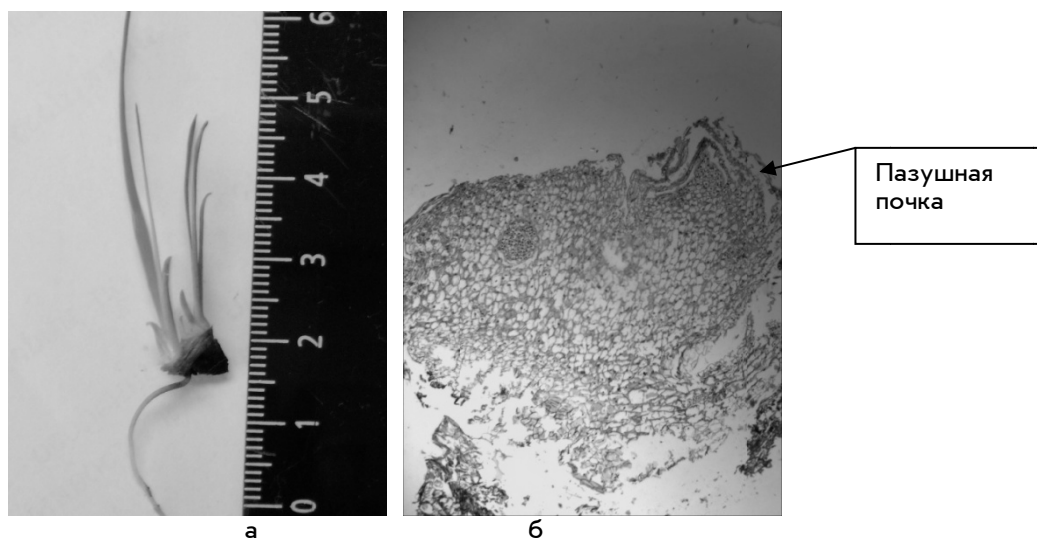


Рис. 1. Внешнее и внутреннее строение побега *I. hybrida* сорта Chardette на питательной среде, содержащей 2,5 мкМ 6-БАП:
а – побег; б – продольный срез (увел. 10×10)

С целью увеличения коэффициента размножения и высоты растений, для *Iris hybrida* мы разработали следующую схему культивирования: 1) чередование среды, содержащей 1,0; 2,5; и 5,0 мкМ 6-БАП (с ауксинами и без), и безгормональной среды, содержащей L-глутамин и аденин сульфат в количестве 100 мг/л; 2) без чередования сред. На протяжении всего времени этапа собственно микроразмножения было отмечено увеличение коэффициента размножения и высоты растений, а соответственно, и общей высоты растений. Максимального значения общей высоты растения достигали при 2,5 мкМ 6-БАП с чередованием сред по схеме. Если питательные среды содержали 1 мкМ 6-БАП, то общая высота растений с чередованием сред и без чередования была практически одинаковой. Это, вероятно, зависело от низкого содержания цитокинина, при чередовании его концентрация в тканях растений ещё более снижалась. Минимальные значения общей высоты растений мы отмечали при 5,0 мкМ 6-БАП в питательной среде. При чередовании сред такого явления как витрификация не наблюдали даже при высоких концентрациях цитокинина. Необходимо отметить, что при добавлении в среды ауксинов общая высота растений увеличивается (рис. 2).

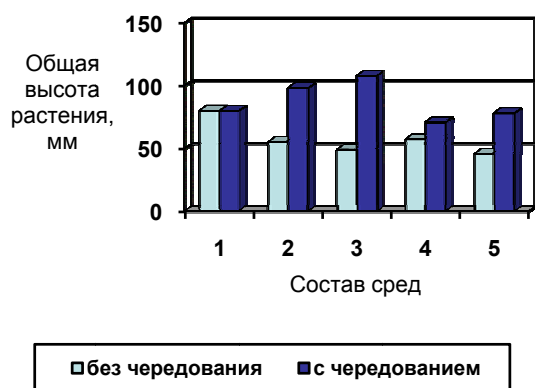


Рис. 2. Влияние схемы культивирования на общую высоту растений у *I. hybrida*.

- Состав сред: 1) 1,0 мкМ 6БАП;
 2) 2,5 мкМ 6БАП; 3) 2,5 мкМ 6БАП + 0,1 мкМ НУК + 0,1 мкМ ИМК; 4) 5,0 мкМ 6БАП;
 5) 5,0 мкМ 6БАП + 0,1 мкМ НУК + 0,1 мкМ ИМК

Общей особенностью для всех вариантов содержания 6-БАП было отрастание корней при чередовании сред. Безгормональные среды, содержащие L-глутамин и аденин сульфат, стимулировали образование длинных корней у *I. hybrida* на этапе собственно микроразмножения. В ряде случаев у регенерантов развивались корни второго порядка.

При анатомическом исследовании на поперечном срезе при чередовании питатель-

ных сред, содержащих 2,5 мкМ 6-БАП, и безгормональной среды на основе MS отчётливо видны основные ткани побега. В наружных слоях первичной коры некротизированные клетки образуют защитную ткань из эпидермы и паренхимы. Паренхимная ткань первичной коры более глубоких слоёв хорошо прокрашена, представлена клетками почти округлой формы. Ближе к центральному цилиндру несколько слоёв клеток образуют слабоокрашенную зону. В области центрального цилиндра отмечена активная побегообразовательная деятельность.

Использование схемы культивирования с чередованием сред позволило повысить коэффициент размножения в среднем до 2,28 при высоте растений 70,0 мм. На анатомических срезах отмечен геммогенез высокой степени. Зачаточные побеги формируются в области первичной коры и центрального цилиндра. Исключение гормональной нагрузки в последующем пассаже позволяет зачаткам развиваться в морфологически нормальные адвентивные побеги, способные к укоренению и адаптации.

Среды, содержащие 5,0 мкМ 6-БАП, оказывали токсическое действие на побеги *I. hybrida*. Растения на данных средах плохо размножались, имели угнетённый вид и со временем гибли. Введение ауксинов несколько сглаживало токсический эффект высоких доз цитокинина, но в последующих пассажах происходила витрификация. На поперечных срезах корневища при гистологическом анализе определялась хорошо окрашенная паренхима первичной коры и центрального цилиндра. Поверхностные слои первичной коры состоят из некротизированных тканей. В более глубоких слоях паренхимы первичной коры определяются зоны меристематической активности и зачаточные побеги. Более активно регенерационные процессы идут в области центрального цилиндра. Но рост адвентивных побегов отмечен в слабой степени, коэффициент размножения на данных питательных средах составил 1,4 при средней высоте побегов 63,2 мм. Вероятно, большая часть зачаточных побегов не имела возможности развиваться в нормальные побеги, ввиду высокой концентрации 6-БАП, и со временем гнила в результате некроза.

При изучении действий разных концентраций 6-БАП и схем культивирования на изменение анатомического строения побегов *I. hybrida* было отмечено, что наиболее близким к интактным растениям является строение побегов, выросших на средах, содержащих 1,0 мкМ 6-БАП. Использование более высоких концентраций цитокинина приводило к угнетению меристематической

активности. Чередование сред, содержащих гормоны, и безгормональных сред повысило регенерационную способность материнских побегов, зачатки развивались в нормальные адвентивные побеги, средняя высота растений при данной схеме культивирования была на 22 мм больше, чем у побегов на среде 1,0 мкМ 6-БАП.

Заклучение

Таким образом, изучая влияние гормональных и негормональных регуляторов роста на побегообразовательную деятельность у *I. Hybrid*, было отмечено, что на этапе собственно микроразмножения среды должны содержать 1,0-2,5 мкМ 6-БАП. При этом необходимо чередовать среды с фитогормонами и безгормональные среды через один пассаж. В безгормональные среды желательнее добавлять L-глутамин и аденин сульфат в количестве 100 мг/л. На анатомических срезах отмечен геммогенез

высокой степени. Зачаточные побеги формируются в области первичной коры и центрального цилиндра. Исключение гормональной нагрузки в последующем пассаже позволяет зачаткам развиваться в морфологически нормальные адвентивные побеги, способные к укоренению и адаптации.

Библиографический список

1. Патент РФ № 2152150 МПК⁷ А01Н 4/00. Способ получения оздоровленного *in vitro* посадочного материала *Gerbera jamesonii* bolus.
2. Калинин Ф.А., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев, 1980. – 488 с.
3. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.



УДК 582.4/.9-18:633.1

Г.К. Зверева

СТРУКТУРА ХЛОРЕНХИМЫ КОЛОСКОВЫХ ЧЕШУЙ ХЛЕБНЫХ ЗЛАКОВ

Ключевые слова: *Роасаеа*, хлебные злаки, колосковая чешуя, хлоренхима, ячеистые клетки, срединные клетки, пространственная организация хлоренхимы.

Введение

Формирование урожая хлебных злаков определяется фотосинтетической деятельностью всех зеленых органов растений, большую роль при этом, начиная с периода колошения, играют элементы колоса или метелки [1, 2 и др.].

Известно, что мезофилл листьев зерновых хлебов состоит из клеток сложных форм [3, 4 и др.], сильная разветвленность клеточных оболочек и большое разнообразие конфигураций клеток хлоренхимы отмечаются также и в их нелистовых фотосинтезирующих органах [5, 6 и др.]. Ассимиляционная ткань колосковых и цветковых чешуй пшеницы описывалась как складчатая [7] или как рыхлая губчатая [8], при этом отмечалось, что в листовидных органах колоса от верхних частей к базальным имеется ряд переходов от складчатых клеток к звездчатым.

Клеточная организация ассимиляционной ткани листовых пластинок и влагалищ у некоторых типичных хлебных злаков рассмот-

рена нами ранее [9], задачей данного исследования было выявить особенности пространственного распределения клеток хлоренхимы в их колосковых чешуях.

Объекты и методы

Формы проекций ассимиляционных клеток и структура хлоренхимы колосковых чешуй изучены у *Triticum aestivum* L., сорт Новосибирская 89, *Secale cereale* L., сорт Крупнозерная (триба *Triticeae* Dum.) и *Avena sativa* L., сорт СИР 4 (триба *Aveneae* Dum.), возделываемых в Приобской лесостепи Западной Сибири. Исследовалось анатомическое строение нижних колосковых чешуй злаков, находящихся в состоянии колошения – начала цветения с помощью методики, описанной ранее [9]. При характеристике клеточной организации ассимиляционной ткани будем опираться на предложенные нами классификацию клеток хлоренхимы и схему расположения хлорофиллоносных клеток в пространстве листа злаков [10].

Результаты исследований

Наружная эпидерма колосковых чешуй изученных хлебных злаков представлена удлиненными клетками с сильноизвилистыми антиклинальными стенками. Основные клет-