

БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 575:635.92

Л.И. Тихомирова

L.I. Tikhomirova

ОСОБЕННОСТИ ИНДУКЦИИ МОРФОГЕНЕЗА ИЗ РАЗЛИЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ ЦВЕТКА ИРИСА В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

PECULIARITIES OF MORPHOGENESIS INDUCTION FROM DIFFERENT FLOWER FRAGMENTS OF IRIS CULTURE IN VITRO

Аннотация. Способность к индуцированному морфогенезу тканей органов цветка зависит от типа первичного экспланта, от количества экзогенных фитогормонов и их соотношения. Выявлены следующие пути морфогенеза: ризогенез, гемморизогенез, геммогенез. Наибольшим морфогенным потенциалом характеризуются фрагменты трубки околоцветника.

Ключевые слова: морфогенез, культура in vitro, микроклональное размножение, гистогенез, ризогенез, гемморизогенез, флоральный гомогенез, эксплант, трубка околоцветника, ось соцветия, тычиночная нить, столбик, рыльце пестика, тычинка.

Summary. Ability to induced morphogenesis of flower organ tissues depends on the type of primary explants, the number of exogenous phytohormones and their ratio. The following ways of morphogenesis are found out: rhizogenesis, gemmorhizogenesis, gemmogenesis. Perianth fragments are characterized by the greatest morphogenic potential.

Key words: morphogenesis, culture in vitro, microclonal propagation, hystogenesis, rhizogenesis, gemmorizogenesis, floral gemmogenesis, explants, perianth tube, rachis, filament, style, pistil stigma, stamen.

Введение.

Морфогенетический потенциал растительной клетки проявляется в системах in vitro в более широком диапазоне, чем в природных условиях, благодаря эволюционно обусловленной у сосудистых растений способности к регенерации. К главным условиям, необходимым для индукции программ регенерации, относятся нарушение целостности и создание асимметрии. В опытах in vitro эти условия достигаются повреждением, экстрадацией экспланта, разнообразными физическими, прежде всего, субоптимальными температурными воздействиями, изменением освещённости и добавлением в питательную среду физиологически активных соединений (гормональных добавок и антитубулиновых агентов). В зависимости от сочетания внутренних и внешних факторов, определяющих начальные условия, возможны разные морфогенетические сце-

нарии, что порождает трудности регуляции морфогенеза в системах in vitro (Журавлёв, Омелько, 2008).

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 определённых условиях вторично дифференцироваться и под влиянием внешних условий выбрать тот или иной путь морфоенеза (Батыгина и др., 1978; Бутенко, 1984). Морфогенез является сложным процессом, регуляция которого осуществляется на клеточном, тканевом и организменном уровнях. В этом процессе участвуют взаимозависимые факторы, определяющие процессы деления, растяжения, дифференциации, старения и гибели

НИИСС им М.А. Лисавенко, лаборатория биотехнологии, Змеиногорский тракт, 49; 656045, Барнаул, Россия; e-mail: L-tikhomirova@yandex.ru
Lisavenko RIHS, laboratory of biotechnology, Zmeinogorskiy trakt, 49; 656045, Barnaul, Russia

Поступило в редакцию 15.09.2010 г.

Submitted 15.09.2010

ли клеток. В ходе морфогенеза возникают сформированные заново ткани и органы, и соответствующие этому процессы носят названия, отражающие существо морфогенеза – гистогенез, ризогенез, гемморизогенез, флоральный геммогенез (образование цветков и (или) отдельных элементов цветка) (Бибикова и др., 2007). Несмотря на многолетнюю историю существования культуры клеток и тканей, многочисленные разработки методик по реализации различных морфогенетических путей не всегда приемлемы к конкретным объектам.

Цель исследований – выявление особенностей морфогенеза в культуре ткани органов цветка при микроклональном размножении трёх видов ириса (*Iris hybrid* Retz., *I. ensata* Thunb., *I. sibirica* L.).

Объекты, методы и условия исследований.

Объекты исследований – перспективные сорта отечественной и зарубежной селекции и элитные гибриды трех видов ириса: *I. hybrida*, *I. ensata*, *I. sibirica* из коллекции НИИСС им. М.А. Лисавенко.

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

В качестве первичных эксплантов брали органы цветка: ось соцветия, завязь (верхнюю и нижнюю части), трубку околоцветника, столбик и рыльце пестика, тычиночную нить и пыльники. Для успешной регенерации важным моментом явилась стадия развития цветков на момент введения в культуру ткани. Цветки брали в фазе бутонизации (VII этап органогенеза), когда они плотно закрыты листочками обёртки. Стерилизацию материала проводили в условиях ламинар-бокса в два этапа. На первом этапе бутоны, смоченные в 96% этиловом спирте, обжигали в пламени спиртовки. Следующий этап обеззараживания проводили в 0,1% растворе сульфохлорантина в течение 20 минут. Подобный способ обеспечивал на 100% стерильность материала. Части цветка делили на фрагменты размером не более 3×3 мм и помещали на питательные среды.

Питательные среды готовили по прописи Мурасиге и Скуга (MS) (Калинин и др., 1980), содержащие 30 г/л сахарозы. В них вводили фитогормоны в разных концентрациях: 1 – нафтилуксусную кислоту (НУК) 3–5 мкМ, индоллил-3-масляную кислоту (ИМК) 1 мкМ в сочетании

с 6-бензиламинопурином (БАП) 1–20 мкМ; pH среды доводили до 5,8–5,9 и добавляли 0,6% агара. Среда разливали в пластиковые контейнеры (по 30 мл в каждый) или в культуральные флаконы (по 10 мл в каждый). Автоклавировали приготовленные питательные среды в течение 20 мин. при 120° С. Всего было испытано 11 вариантов питательных сред, в варианте по 10 фрагментов каждой части цветка. Экспланты культивировали в условиях фотопериода 16/8 часов свет/темнота при 24–26° С.

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), изучаемых видов на стадии введения в культуру *in vitro* в зависимости от состава питательной среды и от типа экспланта.

Результаты и их обсуждение.

В первые две недели культивирования *in vitro* все экспланты (кроме пыльников) увеличились в размерах и приобрели зелёную окраску. Далее тип морфогенетической реакции у трёх видов ириса зависел от количества и соотношения ауксинов и цитокининов, введённых в питательную среду, а также от типа первичного экспланта.

Морфогенез в культуре *in vitro* генеративных органов *I. sibirica*. Завязь *I. sibirica* на питательных средах с 4–8 мкМ БАП и 3–5 мкМ НУК способна регенерировать только корни. На средах с 1 или 20 мкМ БАП и 1 мкМ НУК регенерация отсутствовала.

В отношении органогенеза Скугом и Мурасиге была выдвинута концепция, согласно которой можно получить образование стеблей, корней или недифференцированный рост каллуса, изменяя относительное содержание ауксинов и цитокининов. Для таких эксплантов как тычиночная нить и основание оси соцветия в наших исследованиях тип морфогенетической реакции зависел от количества и соотношения экзогенных фитогормонов.

На питательных средах с 4 мкМ БАП, 4 мкМ НУК (1:1) и 4 мкМ БАП, 5 мкМ НУК (1:1,25) ответной реакцией было корнеобразование. На средах, где содержание цитокининов превышало содержание ауксинов в 1,2 раза и более, начиная с 6 мкМ БАП, фрагменты оси соцветия образовывали побеги. У тычиночной нити геммогенез наблюдался только на средах с 8 мкМ БАП 4 мкМ НУК (2:1) и 20 мкМ БАП 1 мкМ ИМК (20:1).

При использовании в качестве эксплантов рылец, столбиков и пыльников никаких морфогенетических изменений на вышеописанных средах не отмечено в течение всего периода культивирования (70 суток). Эти экспланты в первом пассаже увеличились в размерах, но в дальнейшем погибли в результате некроза тканей.

Особый тип морфогенетической реакции в культуре *in vitro* мы наблюдали, используя в качестве эксплантов фрагменты трубки околоцветника. Из ткани экспланта развивались структуры, похожие на доли околоцветника. Со временем эти структуры приобретали характерную для цветков данного сорта окраску (рис. 1, 2).

Способность тканей ириса к флоральному органогенезу описана ранее некоторыми авторами: Е.В. Болтенковым (2002) для *I. ensata*, Н.А. Вечерниной с соавт. (2004) для *I. sibirica*. У сортов Стерх, Вальс Катунь, Berlin Rufes процесс морфогенеза в культуре *in vitro* в наших опытах протекал подобно сорту Кэмбридж. У сорта Berlin Rufes процесс ризогенеза у эксплантов оси соцветия происходил на средах с 4–6 мкМ БАП и 3–5 мкМ НУК.

У сортов Стерх и Вальс Катунь на среде с 4 мкМ БАП и 4 мкМ НУК у фрагментов трубки околоцветника наряду с флоральными элементами наблюдалось образование корней (рис. 3).

У сорта Стерх процесс морфогенеза был выражен также у столбика на среде с 20 мкМ

БАП и 1 мкМ ИМК. Часть эксплантов регенерировала побеги.

Морфогенез в культуре *in vitro* генеративных органов *I. ensata*. Выявлены общие закономерности прохождения морфогенетических процессов в культуре *in vitro* для *I. sibirica* и *I. ensata* на стадии введения. Завязь *I. sibirica* и *I. ensata* на питательных средах с БАП 4–8 мкМ и НУК 3–5 мкМ способна регенерировать только корни, трубка околоцветника – флоральные элементы. Рыльце пестика и пыльники способностью к регенерации не обладали. Но, в отличие от *I. sibirica*, у *I. ensata* из ткани оси соцветия образуются побеги и корни одновременно.

Способность к регенерации эксплантов органов цветка у ириса *I. ensata* была изучена на сортах и формах: Усть-Катунь, 1-219А-97, дикая форма, и отмечена в основном на средах, с содержанием цитокинина 6, 8, 20 мкМ (табл. 1). Исключение составляют среды с 4 мкМ БАП и 4 мкМ НУК. Все экспланты регенерировали на средах с 4 мкМ БАП 4 мкМ НУК и 8 мкМ БАП 3 мкМ НУК. Отличием явилось время прохождения регенерационных процессов: на средах с 8 мкМ БАП 3 мкМ НУК – через 27 суток после введения в культуру *in vitro*, на средах с 4 мкМ БАП 4 мкМ НУК – через 37 суток. Удвоенное содержание БАП (8 мкМ) первого варианта среды по сравнению со вторым (4 мкМ), вероятно, явилось причиной сокращения времени прохож-



Рис. 1,2. Развитие флоральных элементов у эксплантов трубки околоцветника *I. sibirica* сорт Кэмбридж на питательной среде с 6мкМБАП и 3мкМ НУК.



Рис. 3. Ризогенез и образование флоральных элементов у фрагментов трубки околоцветника *I. sibirica* сорта Стерх на среде с 4 мкМ БАП и 4 мкМ НУК.

дения регенерационных процессов на 10 суток.

Морфогенез в культуре *in vitro* генеративных органов *I. hybrida*. Согласно классификации рода Ирис, предложенной Г.И. Родионенко, виды *I. ensata* и *I. sibirica* относятся к подроду Лимнирис, а *I. hybrida* – к подроду Ирис. Между ними нет близкого родства. Это подтверждается их нескрещиваемостью (Родионенко, 1961).

Отличительной особенностью морфогенеза у *I. hybrida* *in vitro* является его высокая регенерационная активность. Через 14 дней после введения в культуру из ткани фрагментов оси соцветия сформировались зачатки побегов. Геммогенез у эксплантов тычиночной нити наблюдали через 20 дней.

Фрагменты завязи, столбика и рыльца пестика, пыльников на питательной среде увеличивались в размере, завязь и столбик приобретали зелёную окраску, а через 30–35 дней наступала гибель эксплантов. У фрагментов трубки околоцветника развивались флоральные элементы.

В отличие от *I. ensata* и *I. sibirica*, у регенерантов *I. hybrida* отмечено явление витрификации, возможно, связанное с высоким для данного вида ириса содержанием БАП в питательных средах.

Заключение.

Клетки специализированных тканей органов цветка (основание оси соцветия, завязь, трубка околоцветника, столбик и тычиночная нить) трёх видов ириса (*I. hybrida*, *I. ensata*, *I. sibirica*) в условиях *in vitro* могут проявлять тотипотентность. Способность к индуцированному морфогенезу тканей органов цветка зависит от типа первичного экспланта, от количества экзогенных фитогормонов и их соотношения. Выявлены следующие пути морфогенеза: ризогенез, гемморизогенез, геммогенез. Наибольшим морфогенным потенциалом характеризуются фрагменты трубки околоцветника. Независимо от состава питательных сред, во всех вариантах опыта у фрагментов трубки околоцветника развивались флоральные элементы – специфический тип морфогенеза. При подобранных условиях рыльце пестика и пыльники способностью к регенерации не обладали.

Таблица
Зависимость регенерационной способности эксплантов (оси соцветия, трубки околоцветника) *I. ensata* от гормонального состава питательных сред

БАПмкМ/ НУКмкМ	20/1	1/1	4/3	4/4	4/5	6/3	6/4	6/5	8/3	8/4	8/5
Соотношение цитокинина к ауксину	20:1	1:1	1,3:1	1:1	1:1,3	2:1	1,5:1	1,2:1	2,6:1	2:1	1,6:1
Дикая форма				+			+		+	+	
Усть-Катунь				+		+			+		+
1-219А-97	+			+		+		+	+		+

Примечание: пустая клетка – отсутствие регенерации; + – регенерировали побеги или флоральные элементы.

ЛИТЕРАТУРА

- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е.** Размножение растений. – СПб., 2002. – 232 с.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б.** Проблемы морфогенеза in vitro и in vivo. Эмбриогенез у покрытосеменных растений // Бот. журн., 1978. – Т. 63, № 1. – С. 87–110.
- Бибикова А.В., Горпенченко Т.Ю., Журавлёв Ю.Н.** Растения как объект биотехнологии // Комаровские чтения, 2007. – Вып. 55. – С. 184–211.
- Болтенков Е.В.** Изучение особенностей культивирования in vitro тканей дальневосточных видов рода *Iris* L. (Iridaceae) для использования в биотехнологии: Автореф. дисс. ... канд. с.-х. наук. – Владивосток, 2002. – 24 с.
- Бутенко Р.Г.** Индукция морфогенеза в культуре тканей растений. / Гормональная регуляция онтогенеза растений. – М.: Наука, 1984. – С. 42–54.
- Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Клементьева Л.А., Долганова З.В.** Особенности регенерации и размножения растений рода *Iris* (Iridaceae) in vitro // Раст. ресурсы, 2004. – Т. 40, вып. 4. – С. 56–60.
- Журавлёв Н.Ю., Омелько М.А.** Морфогенез у растений in vitro // Физиология растений, 2008. – Т. 55, № 5. – С. 643–664.
- Калинин Ф.А., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е.** Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев, 1980. – 488 с.
- Родионенко Г.И.** Ирис. – М.: Изд-во Минкомхоз РСФСР, 1961. – 60 с.