

УДК 591.169.1

Д.В. Балабова, Л.И. Тихомирова, Л.Л. Седельникова

Получение вегетативных побегов *Scilla pratensis* Waldst. et Kit. методом прямой регенерации у луковичных чешуй в культуре *in vitro*

D.V. Balabova, L.I. Tikhomirova, L.L. Sedelnikova

Cultivating Vegetative Shoots *Scilla pratensis* Waldst. et Kit. by Direct Regeneration in Bulb Scales in Culture *in vitro*

На этапе инициации в качестве первичных эксплантов использованы луковичные чешуи *S. pratensis*. В результате прямой регенерации получены вегетативные побеги. Определено оптимальное содержание фитогормонов в питательной среде. На гистологических срезах растений-регенерантов *S. pratensis* выявлено образование трахеальных элементов в базальной части луковички.

Ключевые слова: культура *in vitro*, луковичные чешуи, прямая регенерация, эксплант, *Scilla pratensis*.

At the stage of initiation as the primary explants the bulb scales *S. pratensis* are used. As a result of direct regeneration we produced vegetative shoots. The optimal content of plant hormones was determined in the culture medium. On histological sections of regenerated plants *S. pratensis* the formation of tracheal elements in the basal part of the bulbs was revealed.

Key words: culture *in vitro*, bulb scales, direct regeneration, explant, *Scilla pratensis*.

Род пролеска, или *Scilla L.* из семейства *Hyacinthaceae Batsch*, насчитывает около 80 видов, распространенных в умеренных и субтропических районах Европы, Азии и Южной Африки. На территории России и сопредельных государств встречаются 13 видов, относящихся к подроду *Scilla*. Представители подрода *Scilla* — многолетние луковичные растения. Пролеска луговая (*S. pratensis* Waldst. et Kit.) произрастает в Югославии, на лугах. В культуре — с первой половины XIX в. Соцветие — кисть, состоит из 40–50 мелких светло-синих цветков. Вегетация начинается в середине мая, цветение — в первых числах июня. Семян почти не завязывает, вегетативное размножение невысокое, за вегетационный период взрослая луковица образует 2–4 деток [1, с. 1247; 2, с. 37; 3, с. 7, 15]. Микроразмножение в культуре *in vitro* является альтернативным и эффективным способом воспроизводства растений, позволяет получить большое количество растений в короткие сроки.

В известных нам публикациях, касающихся культуры тканей пролески, уделено внимание гормональной регуляции морфогенеза, подбору разных составов питательных сред, биохимическому анализу растений-регенерантов [4, с. 123; 5, с. 177; 6, с. 51; 7, с. 318].

Цель данной работы — получение вегетативных побегов *S. pratensis* методом прямой регенерации, используя луковичные чешуи в качестве первичных эксплантов.

Материалы и методы

Объектом исследования служила пролеска луговая *S. pratensis*. Исходным материалом явились лу-

ковицы, которые были получены с опытных участков Центрального сибирского ботанического сада (Новосибирск) и Южно-Сибирского ботанического сада (Барнаул) в июне 2012 г. Для введения в культуру *in vitro* использовали сегменты чешуй луковиц. У луковиц удаляли покровную чешую и срезали наружный участок донца. С внешних запасающих чешуй удаляли поврежденные или пораженные участки, затем луковички промывали проточной водой. Далее растительный материал в асептических условиях стерилизовали в 70%-ном растворе этанола 1 мин, а затем в течение 20 мин в различных антисептиках: в 5%-ном растворе лизоформа или в 20%-ном растворе Domestos, содержащем 5% гипохлорита натрия, с последующим трехкратным промыванием стерильной дистиллированной водой.

Основной питательной средой служила среда по прописи Мурасиге и Скуга [8, с. 485]. В качестве экзогенных регуляторов роста использовали 6-бензиламинопурин (БАП) 10,0 и 20,0 мкМ; кинетин (Кн) 20,0 мкМ и α -нафтилуксусную кислоту (НУК) 5,0 мкМ. Содержание сахарозы в питательных средах составляло 30 г/л, агара — 6 г/л.

Сегменты чешуй помещали на питательную среду внешней поверхностью вниз и вверх. Культивировали в условиях фотопериода 16/8 ч свет/темнота при температуре 25 ± 1 °C и освещенности 2–3 тыс. лк. Первое субкультивирование эксплантов на свежую среду того же состава проводили через 2 недели после введения в культуру *in vitro*, последующие — каждые 3–4 недели.

Результаты и их обсуждение

Высокая степень инфицированности подземных органов часто затрудняет введение в стерильную культуру растительных объектов, поэтому особое внима-

ние уделяется их стерилизации. В нашей работе были использованы две комбинации стерилизующих веществ, которые позволили получить высокий процент жизнеспособных эксплантов (табл. 1).

Таблица 1

Влияние способа стерилизации на показатели инфицированности и жизнеспособности луковичных чешуй *S. pratensis* в культуре *in vitro*

Стерилизующий раствор	Доля эксплантов, %	
	Инфицированных	Жизнеспособных
70% этанол 1 мин 10% Domestos 20 мин	5	95
70% этанол 1 мин 5% лизоформин 20 мин	0	100

Результаты опытов показали, что наиболее эффективным оказался способ стерилизации с использованием 70%-ного раствора этанола в течение 1 мин и 5%-ного раствора лизоформина в течение 20 мин, выход стерильных жизнеспособных эксплантов составил 100%.

В своей работе S. A. McCartan и J. van Staden [5, с. 177, 178] в качестве первичных эксплантов лекарственного растения *Scilla natalensis* использовали луковички, у которых инициировали геммогенез. При этом авторы отмечают низкий процент стерильности эксплантов (20–30%).

В культуре *in vitro* *Scilla sibirica* тип морфогенетической реакции зависел от источника экспланта и от регуляторов роста. Луковичные чешуи формировали каллус на среде МС с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и кинетина. Регенерацию побегов не наблюдали. Листовые экспланты образовывали побеги путем прямой регенерации на среде с БАП [6, с. 51].

В нашей работе экспланты луковичных чешуй *S. pratensis* проявили высокую способность к побегообразованию. Индукцию морфогенеза осуществляли с использованием различных концентраций и комбинаций регуляторов роста (табл. 2). Через 5 недель культивирования на эксплантах отмечали

образование адвентивных побегов, а также корней. Инициация побегов происходила с внутренней стороны тканей чешуй вблизи от места среза. Как показали наши исследования, из регуляторов роста наиболее эффективным оказалось использование БАП и НУК (10,0 и 5,0 мкМ соответственно), которое позволило инициировать побегообразование у 42% эксплантов (рис. 1а). Кроме того, на данной среде происходило формирование наибольшего количества адвентивных побегов — 5,2 шт./эксплант. Следует отметить, что при культивировании эксплантов имел место их частичный некроз, но именно на этой среде наблюдали самую низкую долю некрозов — 27%. При повышении концентрации БАП в среде до 20,0 мкМ (НУК 5,0 мкМ) количество луковичек снижалось в среднем до 3,7 шт./эксплант, а доля регенерирующих эксплантов была 37%. Процент эксплантов с некрозом был самым высоким — 57. Добавление в питательную среду 20,0 мкМ Кн и 5,0 мкМ НУК инициировало образование не только побегов, но и корней (рис. 1б). Доля эксплантов с меристематической тканью была самой низкой — 27%, также отмечено снижение количества побегов до 2,4 шт./эксплант. Некроз составил 43% от числа эксплантов.

Таблица 2

Влияние регуляторов роста на морфогенетическую активность при введении в культуру *in vitro* луковичных чешуй *S. pratensis*

Регуляторы роста, мкМ	Эксплантов, шт.	Тип морфогенетической реакции	Морфогенез, %	Количество побегов, шт./эксплант
БАП 10,0 + НУК 5,0	26	геммогенез	42	5,2±2,3
БАП 20,0 + НУК 5,0	30	геммогенез	37	3,7±1,5
Кн 20,0 + НУК 5,0	30	гемморизогенез	27	2,4±1,04

Р. П. Барыкина и О. А. Чурикова изучали морфогенетические процессы у эксплантов вегетативных органов одной морфологической природы (луковичная чешуя и лист) у трех видов пролесок: *Scilla sibirica*

Andr., S. italica L. и *S. rosenii C. Koch.* Авторы установили, что в эксплантах чешуй регенерационные процессы протекают активнее по сравнению с листьями. Это связано с более интенсивным развитием гидро-

цитной системы, узлы которой представляют собой своеобразные очаги инициации морфогенетических процессов [9, с. 21].

При гистологическом исследовании растений-регенерантов *S. pratensis* нами выявлено образование подобных трахеальных элементов в базальной части луковички (рис. 2а, б). Отмечено, что трахеальные клетки первично формируются в области зачаточного корня и затем к апексу побега. Установлено, что первичными трахеальными элементами у *S. pratensis* являются в основном кольчатые и реже переходные к спиральным сосуды (рис. 2б). Известно, что они возникли в процессе онтогенетического развития из продольного ряда меристематических клеток, формируя первичную ксилему в побеговых органах у однодольных растений, но первоначально в корне, а позднее в стебле, что подтверждают наши гистологические

данные. Вероятно, онтогенетический ряд первичных трахеальных элементов способствует клеточной специализации на ранних этапах морфогенеза и усилению роста и побегообразования у растений-регенерантов *S. pratensis*.

Заключение

Высокий процент стерильных жизнеспособных эксплантов (100%) получен при использовании следующей комбинации стерилизующих средств: 70%-ный раствор этанола в течение 1 мин и 5%-ный раствор лизоформина в течение 20 мин. Показана возможность прямой регенерации вегетативных побегов у луковичных чешуй *S. pratensis*. Определено оптимальное содержание фитогормонов в питательной среде: БАП 10,0 мкМ и НУК 5,0 мкМ. Использование данной среды позволило за 5 недель культивирования получить в среднем 5,2 микропобега от одного экспланта.



Рис. 1. Морфогенез у луковичных чешуй *S. pratensis*: а) геммогенез на среде MS с 10,0 мкМ БАП и 5,0 мкМ НУК; б) гемморизогенез на среде MS с 20,0 мкМ Кн и 5,0 мкМ НУК

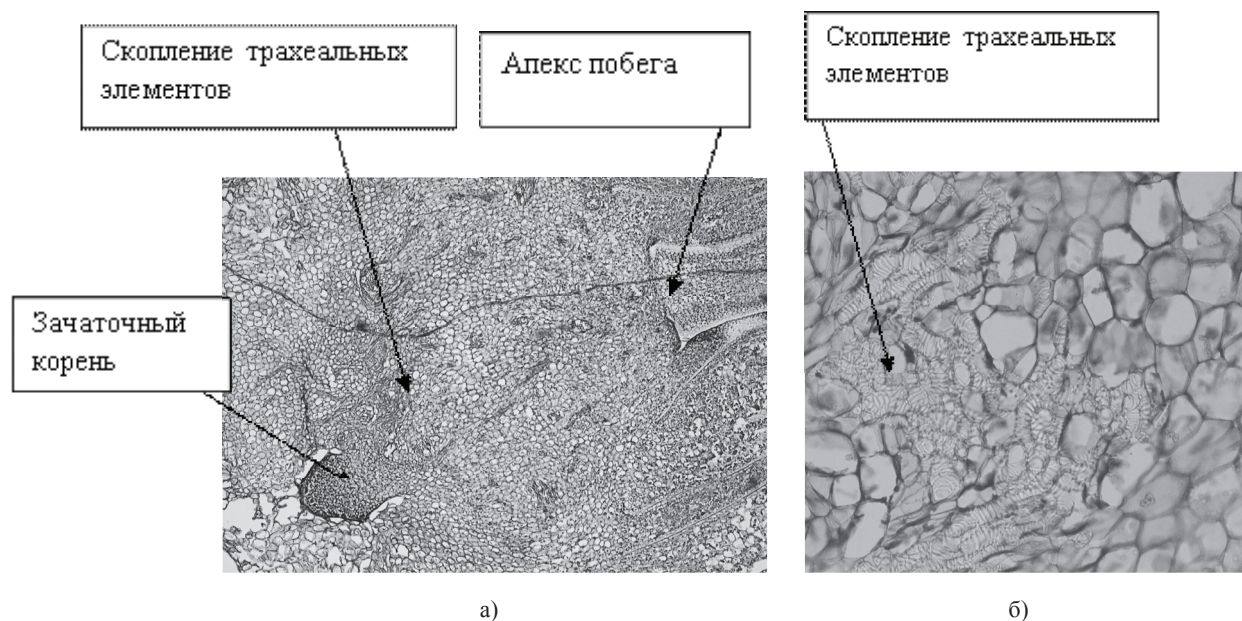


Рис. 2. Продольный срез луковички растения-регенеранта *S. Pratensis*: а) Ув. $\times 50$; б) скопление трахеальных элементов, Ув. $\times 400$

Библиографический список

1. Мордак Е. В. Пролески Советского Союза. I. Морфолого-анатомические признаки и их таксономическое значение // Бот. журнал. — 1970. — Т. 55, № 9.
2. Климов Е. А. Нежные, трогательные пролески // Цветоводство. — 1991. — № 2.
3. Седельникова Л. Л. Биоморфология геофитов в Западной Сибири. — Новосибирск, 2002.
4. Nair A. Micropropagation of *Scilla hyacinthiana* (Roth) Macbride // Proc. Indian natl. Sci. Acad. — 1989. — B. 55, № 2.
5. McCartan S. A., Staden J. van. Micropropagation of the Medicinal Plant *Scilla natalensis* Planch. // Plant Growth Regulation. — 1998. — Vol. 25, № 3.
6. Chaudhuri D., Sen S. *In Vitro* Response of *Scilla sibirica* // Scientia Horticulturae. — 2002. — Vol. 95, № 1–2.
7. Banciu C., Mitoi M., Helepciuc F., Aldea F. *In Vitro* Propagation of Critically Endangered Species *Scilla autumnalis* L. — Biochemical Analyses of the Regenerants // Analele Universitatii din Oradea — Fascicula Biologie. — 2010. — Vol. XVII, № 2.
8. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures // Physiol. Plant. — 1962. — Vol. 15, № 13.
9. Барыкина Р. П., Чурикова О. А. Особенности морфогенеза *in vitro* некоторых видов *Scilla* L. // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. — 2001. — № 1.