

УДК 582.683

Л.И. Тихомирова

**Реализация морфогенетического потенциала трубки околоцветника *Iris sibirica* L. через прямой органогенез**

L.I. Tikhomirova

**Realization of Morphogenetic Potential of Perianth Pipe *Iris sibirica* L. by Direct Organogenesis**

Приведены результаты изучения морфогенетического потенциала трубки околоцветника у некоторых культиваров *I. sibirica* L. через прямой органогенез. Выявлены особенности прохождения морфогенеза и регенерационная активность у данного типа эксплантов. Отмечено, что морфогенез происходит по типу геммогенеза и гемморизогенеза, минуя стадию каллусообразования у побегов, сформированных *de novo*, флоральные элементы образовались на месте примордиев первых листьев, побеги имели типичное для однодольных растений строение и были исключительно эндогенного происхождения.

**Ключевые слова:** морфогенез, трубка околоцветника, флоральные элементы, прямой органогенез, *I. sibirica*, геммогенез, гемморизогенез, регенерация.

Представителей рода *Iris* относят в группу основных многолетников, используемых в озеленении, наряду с пионом, лилейником, флоксом, астильбой, тюльпаном и нарциссом. Ирисы ценят за раннелетний срок цветения, декоративность листвы в течение сезона. Сорта ириса используют как в чистых посадках, так и в сочетании с луковичными и корневищными многолетниками. Благодаря высокой зимостойкости сорта ириса сибирского не требуют дополнительных затрат на снегозадержание и укрытие лапником и хвоей, они конкурентоспособны с сорняками, поэтому их применение в декоративном садоводстве и зеленом строительстве всегда экономически эффективно.

Разработка технологий *in vitro* позволяет ускорить в 2 раза (на 4–5 лет) создание новых сортов и совместить процессы изучения кандидатов в сорта и закладки производственных маточников, что обеспечивает быстрое удовлетворение потребностей озеленителей и ландшафтных архитекторов в здоровом и качественном посадочном материале. При разработке биотехнологических методов размножения предпочтение отдают тому типу эксплантов, который для данного вида растений характеризуется большей регенерационной способностью.

Известен способ получения растений-регенерантов *I. sibirica* на основе индукции развития почек в каллусной культуре у изолированных фрагментов

Investigation results of morphogenetic potential of perianth pipe of some cultivars *I. sibirica* by direct organogenesis are presented there. Morphogenesis peculiarities and regenerative activity of the given type of explants are found out. It's noted, that morphogenesis is carried out similar to gemmagenesis and gemmarizogenesis passing by callus formation. Shoots developed *de novo* formed floral elements at the place of primordium of the first leaves, had typical structure, if it concerns monocotyledonous plants and were of endogenous origin.

**Key words:** morphogenesis, perianth pipe, floral elements, direct organogenesis, *I. sibirica*, gemmagenesis, gemmarizogenesis, regeneration.

трубки околоцветника [1]. Получение каллусной ткани с последующей индукцией органогенеза или соматического эмбриогенеза малопригодно для использования при микроразмножении сортов растений, так как при дедифференциации клеток могут происходить полиплоидизация и анеуплоидизация числа хромосом, что приводит к получению неоднородного потомства.

Целью настоящего исследования было изучение возможных путей реализации морфогенетического потенциала трубки околоцветника *I. sibirica* L. через прямой органогенез.

**Материалы и методы**

Цветки *Iris sibirica* брали в фазе бутонизации (VI–VII этапы органогенеза), когда они плотно закрыты листочками обертки. Трубку околоцветника делили на фрагменты размером не более 3 × 3 мм и помещали на питательные среды.

Питательные среды, содержащие 30 г/л сахаразы, готовили по прописи Мурасиге и Скуга (MS) [2]. В них вводили фитогормоны в разных концентрациях: 1-нафтилуксусную кислоту (НУК) 3–5 мкМ в сочетании с 6-бензиламинопурином (БАП) 4–8 мкМ. pH среды доводили до 5,8–5,9 и добавляли 0,6%-ный агар.

Каждые 3–5 дней проводили наблюдения и делали гистологические срезы эксплантов. Выявляли регенерационную способность и пути морфогенеза согласно существующей в настоящее время классификации

путей морфогенеза [3]. Анатомическое строение эксплантов изучали на постоянных препаратах, изготовленных по общепринятой методике [4].

#### Результаты и их обсуждение

У многих геофитов цветки возвышаются над почвой благодаря длинной (от 10 до 20 см) трубке околоцветника. Возникнув в результате срастания долей околоцветника, трубка околоцветника стала играть существенную роль в жизнедеятельности цветка ириса [5].



Рис. 1. Формирование флоральных элементов из эксплантов трубки околоцветника *I. sibirica*, гибрид 25

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 [6].

Влияние содержания цитокинина в питательной среде 0-го пассажа отразилось на интенсивности регенерации у трубки околоцветника *I. sibirica*. Повышая содержание БАП от 4 до 8 мкМ, можно было наблюдать образование большого количества побегов и возрастание скорости регенерации. При этом количество НУК 3, 4, 5 мкМ повторялось в каждой серии опытов. В качестве контроля использовали питательную среду, содержащую БАП 1 мкМ и НУК 1 мкМ. На данной среде все экспланты в 0-м пассаже увеличились в размерах, но в дальнейшем погибли в результате некроза тканей.

На регенерационную способность эксплантов трубки околоцветника оказывало большее влияние не количественное содержание гормонов, а соотношение цитокининов и ауксинов. Если соотношение цитокинина и ауксина составляло 1:1 и 1:1,25, т. е. в равном количестве, или содержание НУК было больше, то одновременно с образованием побегов можно было наблюдать и возникновение корней. В данных вариантах опыта морфогенез проходил по типу гемморизогенеза. Если соотношение цитокинина и ауксина было 1,2–1,5:1, то побеги формировались более медленно,

Экспланты располагали на питательной среде адаксиальной стороной. При помещении экспланта на поверхность среды абаксиальной стороной признаков регенерации не наблюдали за все время культивирования.

Из ткани трубки на адаксиальной стороне развивались структуры, похожие на доли околоцветника. Со временем эти структуры приобретали характерную для цветков данного сорта окраску (рис. 1).

и во всех случаях вместо листьев в 0-м пассаже образовывались венчикообразные выросты.

Превышение цитокининов над ауксинами в 1,6 и более раз приводило к образованию большого числа побегов на экспланте, и процессы органогенеза шли быстрее. При содержании в питательной среде 8 мкМ БАП и 3 мкМ НУК за 30 суток формировались побеги с листьями.

Наиболее оптимальными были варианты опытов, где содержание стимуляторов роста составляло БАП 6 мкМ, НУК 5 мкМ и БАП 8 мкМ, НУК 3 мкМ. В этих вариантах экспланты трубки околоцветника быстро увеличивались в размерах за счет разрастающейся ткани на адаксиальной стороне. Через 14 дней отмечали появление нитевидных выростов, которые в дальнейшем образовывали венчикообразные структуры. Число флоральных элементов на один эксплант было больше по сравнению с другими вариантами опыта. Через 30–60 дней можно было получить побеги с вегетативными листьями, не изменяя количество гормонов в питательной среде в последующих пассажах.

На всех испытанных питательных средах при культивировании эксплантов трубки околоцветника отмечали 100%-ное побегообразование.

Анатомо-морфологическое изучение процессов в тканях эксплантов трубки околоцветника показало следующее. На четвертый день культивирования был отмечен рост растяжением, клетки всех тканей

значительно увеличились в размере. С адаксиальной стороны край становился неровным за счет делений клеток в субэпидермальной зоне. С абаксиальной стороны край был ровным, клетки паренхимы крупные. Проводящие пучки были хорошо сформированными, просматривалось их дихотомическое ветвление. В этот период образуется раневая пробка.

На 7-е сутки развития эксплантов с адаксиальной стороны трубки околоцветника отмечено образование полиад (рис. 2). Волна клеточных делений от поверх-

ности постепенно распространялась вглубь экспланта. Абаксиальная сторона экспланта была без признаков регенерации, в ней хорошо различалась проводящая система трубки околоцветника.

При анатомическом изучении развития эксплантов *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles на 10–14-е сутки было отмечено, что волна клеточных делений продолжала распространяться вглубь экспланта, в результате чего возникала обширная меристематическая зона (рис. 3).

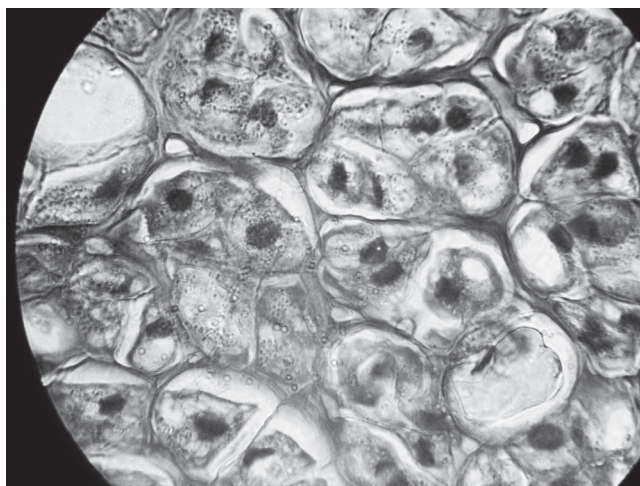


Рис. 2. Анатомическое строение экспланта трубки околоцветника *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles на 7-е сутки культивирования; полиады. Увел. 10×40

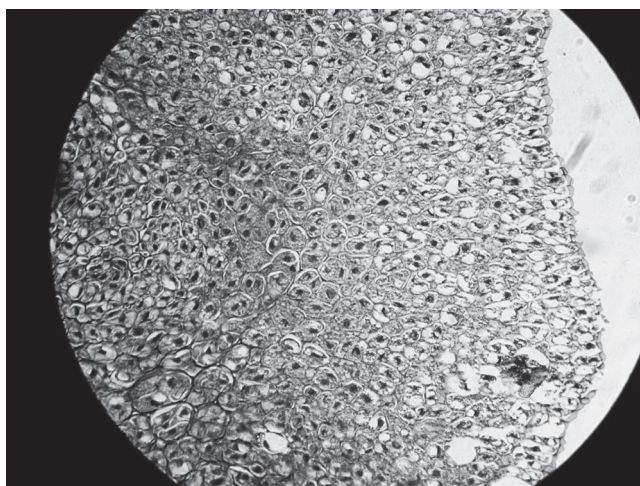


Рис. 3. Анатомическое строение экспланта трубки околоцветника *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles на 10-е сутки культивирования. Увел. 10×10

Первые визуальные признаки регенерации отмечали на 15–17-е сутки культивирования эксплантов. На адаксиальной поверхности экспланта возникали выросты. На анатомических срезах наблюдали мощный слой делящихся клеток с адаксиальной стороны трубки околоцветника. Практически все живые ткани экспланта (паренхима, клетки обкладки проводя-

щих пучков) проявляли регенерационную активность. Одновременно можно было наблюдать меристематические очаги разного возраста: от очень мелких, состоящих из одной полиады, до настоящих зачатков побегов. На поперечных срезах побегов, образовавшихся *de novo*, фиксировали дифференциацию тканей, начало формирования проводящей системы.



Этапы морфогенеза в эксплантах трубки околоцветника и оси соцветия *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles на питательной среде с 8 мкМ БАП и 3 мкМ НУК

Время фиксации материала от момента введения в культуру <i>in vitro</i>	Изменения, произошедшие в тканях экспланта
4 суток	Рост клеток паренхимы растяжением. С адаксиальной стороны край становится неровным за счет делений клеток в субэпидермальной зоне
7 суток	С адаксиальной стороны формируются очаги деления (образование полиад).
10–14 суток	Волна клеточных делений продолжает распространяться вглубь экспланта, в результате чего возникает обширная меристематическая зона.
15–17 суток	Одновременно можно наблюдать меристематические очаги разного возраста. На поперечных срезах побегов, образовавшихся <i>de novo</i> , отмечаются дифференциация тканей, начало формирования проводящей системы
20 суток	Активный геммогенез. Задействованы практически все слои тканей экспланта.

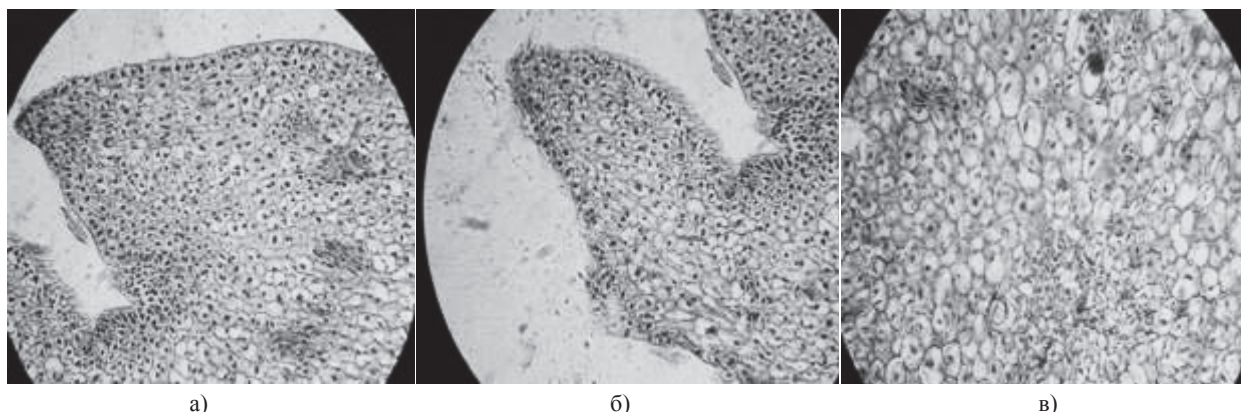


Рис. 4. Анатомическое строение экспланта трубки околоцветника *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles на 20-е сутки культивирования: а, б) побег, сформированный *de novo*, продольный срез; в) масса делящихся клеток в ткани экспланта, поперечный срез. Увел. 10×10

На 20-е сутки развития эксплантов констатировали активный геммогенез. Были задействованы практически все слои тканей экспланта. У побегов, развившихся *de novo*, была образована покровная и основная ткань, формировалась проводящая система. Вблизи основного проводящего пучка экспланта наблюдали массу делящихся клеток и меристематических центров (рис. 4, таблица).

#### Заключение

В эксплантах трубки околоцветника *I. sibirica* на питательных средах с содержанием 4–8 мкМ БАП,

3–5 мкМ НУК морфогенез проходил по типу геммогенеза, гемморизогенеза, минуя стадию каллусообразования. Меристематическая активность (возникновение полиад) в эксплантах трубки околоцветника *I. sibirica* отмечалась начиная с 7-го дня культивирования и была выявлена только с адаксиальной стороны. У побегов, развившихся *de novo*, было типичное для однодольных растений строение, они имели исключительно эндогенное происхождение. Отличием явилось формирование флоральных элементов вместо примордиев первых листьев.

### Библиографический список

1. 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.
2. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue cultures // *Physiol. Plant.* — 1962. — V. 15, № 4.
3. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений : учебник. — СПб., 2002.
4. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. — М., 2004.
5. Родионенко Г.И. Ирис. — М., 1961.
6. Бутенко Р.Г. Дифференциация и морфогенез в культуре тканей, клеток и протопластов // Биология развития растений. — М., 1975.