

*Л. И. Тихомирова*

### **Изучение влияния БАП в средах размножения на показатели этапа укоренения у *Iris ensata* Thunb.**

*L. I. Tikhomirova*

### **Studying the BAP Influence in Propagation Media on Index of *Iris ensata* Thunb. Rooting Stage**

С увеличением концентрации цитокинина снижались высота растений, число корней и одновременно уменьшалась их длина. В культуре *in vitro* у *Iris ensata* заложение и развитие корней проходит аналогично интактным растениям. Особенностью их развития является массовое скопление гидроцитов в зоне перидикла, в месте заложения корня, а также вдоль центрального цилиндра корня.

**Ключевые слова:** ризогенез, микроклональное размножение, высота растений, число корней, длина корней, культура ткани, придаточные корни, проводящие элементы, центральный цилиндр корня, сосудистая система.

DOI 10.14258/izvasu(2013)3.2-23

В Японии ирисы совершенно справедливо считаются одним из самых неприхотливых и выносливых растений, это цветок самурая, символизирующий стойкость мужчины и воина. Моду на ирисы и культуру их возделывания японцы переняли у Китая. В середине XVII в. ирисовый сад сегуна Токугавы занимал площадь около 25 га, именно ирис хана-себу был выбран символом будущей столицы Японии и непременным атрибутом одного из популярнейших праздников — Дня мальчиков. Пик увлечения ирисами в Японии пришелся на конец XIX в., к этому времени число сортов приближалось к первой тысяче, а любованию цветением стало национальной традицией, сформировавшей облик классического японского ирисового сада.

Этап укоренения на питательных средах микроклонально размноженных побегов ириса является, несомненно, важным этапом в получении хорошо адаптированного растительного материала. Предварительно укорененные побеги лучше переносят процесс начальной адаптации.

По данным И. Н. Прониной [1], на эффективность процесса ризогенеза у подвоев и сортов яблони и груши, размноженных микроклонально, оказывают влияние концентрации цитокининов, присутствующие на этапе, предшествующем укоренению. Такую зависимость мы наблюдали и у побегов *I. ensata*.

Increasing cytokinin concentration led to decreasing the height of plants, the number of roots and simultaneously decreased their length. Inception and development of roots of *Iris ensata in vitro* is carried out like intact plants. The peculiarity of its development is mass accumulation of hydrocytos in pericycle zone, in the place of root inception and along central root cylinder as well.

**Key words:** rizogenesis, microclonal propagation, height of plants, number of roots, length of roots, tissue culture, additional roots, leading elements, central root cylinder, vascular system.

**Цель работы** — установить зависимость между концентрацией БАП в питательных средах этапа собственно микроразмножения и показателями этапа укоренения (высота растений после укоренения, число корней, длина корней) у *Iris ensata* Thunb., провести гистологический анализ формирующейся корневой системы.

#### **Объекты, методы и условия исследований.**

Объекты исследований — элитные гибриды *I. ensata* Thunb. из коллекции НИИСС им. М. А. Лисавенко.

На этапе собственно микроразмножения использовали среды, содержащие 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0, 17.5, 20.0 мкМ БАП (6-бензиламинопурина). Во всех вариантах опыта на этапе укоренения использовали питательную среду одного гормонального состава на основе ½ MS, дополненную 3 мкМ НУК (α-нафтилуксусной кислоты). Работу в асептических условиях, приготовление и стерилизацию питательных сред проводили по общепринятым методикам [2].

Статистический анализ проводили в MS Excel 2007 с использованием стандартных показателей. Постоянные анатомические препараты были изготовлены по общепринятой методике в нашей модификации [3].

#### **Результаты и их обсуждение**

По данным ряда авторов, для укоренения побегов некоторых представителей рода *Iris*, размножен-

ных в культуре *in vitro*, требовалась их пересадка на безгормональную среду MS. При этом у основания розеточных побегов развивались 2–3 придаточных корня [4; 5].

В наших опытах по укоренению побегов у гибридов *I. ensata* были использованы питательные среды на основе 1/2 MS, не содержащие фитогормоны и дополненные 3 мкМ НУК. Отмечено увеличение числа корней в два и более раз на среде с ауксином. Также нужно отметить наличие боковых корней на среде с НУК и 100-процентную укореняемость побегов. На среде без гормонов укореняемость составила 70–100%. Формирующаяся на безгормональной среде корневая система регенерантов часто характеризовалась слабым развитием и отсутствием корней второго порядка. По этой причине регенеранты имели небольшую площадь питания и слабую поглощательную способность, что, в свою очередь, отрицательно сказалось на этапе их адаптации к нестерильным условиям.

Суммарная длина корней в большей степени зависела от концентрации БАП на этапе собственно микро размножения. По этой причине основные исследования были направлены на изучение влияния среды предшественника на процессы ризогенеза у побегов *I. ensata*.

Введение цитокининов в среды для ризогенеза не требуется. Обычно достаточно их накопленного остаточного количества в побегах после предыдущего этапа собственно микро размножения. Тем не менее на этапе укоренения физиологическое действие цитокининов также обязательно. Апекс корня для своего роста нуждается в питательных веществах. Минеральных солей и воды у корня в достатке, поэтому необходимо притягивать органические вещества. Этот эффект проявляется в зоне деления корня. В зоне дифференцировки корня цитокинины отвечают за образование проводящей системы. Так как ко-

рень нуждается в продуктах фотосинтеза, транспортируемых флоэмой, цитокинины стимулируют закладку элементов флоэмы. Также цитокинины стимулируют переход клеток корня от деления к растяжению с выходом из основной меристемы [6; 7].

Для изучения влияния сред размножения на ризогенез у *I. ensata* во всех вариантах опыта на этапе укоренения определяли высоту растений после укоренения, число корней, длину корней.

На основании полученных данных было установлено, что между содержанием БАП в средах размножения и показателями этапа укоренения (высота растений после укоренения, число корней, длина корней) для *I. ensata* имеет место обратная зависимость. При увеличении содержания БАП в средах размножения высота растений после укоренения, число и длина корней уменьшаются (рис. 1, 2).

На этапе собственно микро размножения нами была использована схема культивирования с чередованием сред с высокой и низкой (1 мкМ) концентрацией БАП. Чередование высоких и низких концентраций БАП увеличивало коэффициент размножения и высоту растений, при этом побеги были хорошо развиты и поэтому могли быть сразу же использованы на этапе укоренения, в отличие от побегов, полученных на питательных средах, содержащих неизменное количество БАП. Данная тенденция сохранялась и на этапе укоренения. При сравнении растений-регенерантов *I. ensata*, полученных при такой схеме культивирования и без чередования сред на этапе собственно микро размножения, было отмечено, что высота у этих растений при укоренении увеличилась в среднем на 30%, число корней — на 50%, длина корней — на 45%.

Образование корней ириса в условиях культуры *in vitro* в нашем опыте является направленным, т. е. происходит из растительной ткани, минуя каллусную культуру.

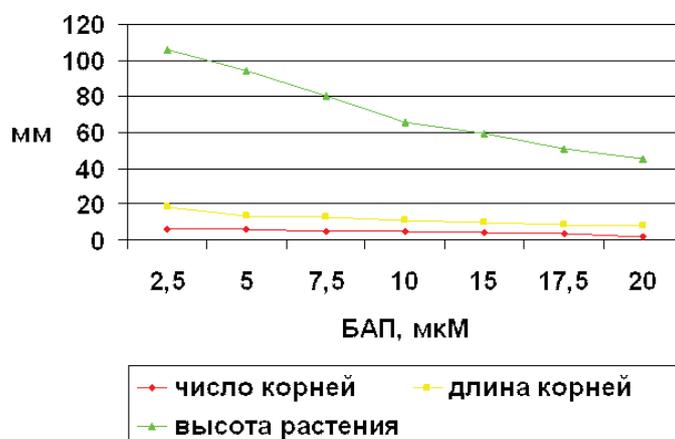


Рис. 1. Зависимость числа и длины корней, высоты растения при укоренении у *I. ensata* от концентрации БАП в средах размножения



Рис. 2. Показатели этапа укоренения (высота растений после укоренения, число корней, длина корней) у *I. ensata* гибрид 59–66–00 в зависимости от концентрации БАП в средах размножения: А) 2,5 мкМ БА; Б) 5,0 мкМ БАП; В) 10,0 мкМ БАП; Г) 20,0 мкМ БАП

Как считает К. Эсау [8], если рассматривать происхождение придаточных корней с гистологической точки зрения, то можно утверждать, что такие корни обычно закладываются в непосредственной близости проводящей ткани того органа, из которого они возникают. Придаточные корни, образующиеся на стеблях однодольных растений, возникают в паренхиме, окружающей проводящие пучки. В ходе дифференциации элементов проводящей ткани в придаточном корне паренхимные клетки, локализованные на проксимальном конце зачатка, дифференцируются в элементы проводящей системы, и таким образом обеспечивается связь с породившим зачаток органом.

У некоторых видов растений на затвердевшем агаре образуются корни с гипертрофированными клетками коры и недоразвитой сосудистой системой [9; 10]. М.А. L. Smith [11] с соавторами указывает, что связь

между новыми корнями *in vitro* и побегами у растений часто прерывалась. Некоторые корни чернели вскоре после появления и прекращали рост. Исследование срезов этих корней показало, что почернение ограничено кутикулярным покрытием клеток эпидермиса.

У *Brassica oleracea* L. связь побега и корня была чрезвычайно слаборазвитой и узкой [12]. Ауксин увеличивал активность камбия и образование адвентивных корней у березы повислой. В основании корней трахеидоподобные клетки обеспечивали связь с побегом [13].

Заложение и развитие придаточных корней проходило аналогично интактным растениям (рис. 3А, Б). Особенностью их развития является массовое скопление трахеидоподобных клеток в зоне перицикла, в месте заложения корня, а также вдоль центрального цилиндра корня. Так как гидроциты являются прово-

дьящими элементами, можно предположить, что таким образом осуществляется связь материнского побега и корня. Хорошо видно на срезах, как гидроциты из зоны центрального цилиндра материнского побега продолжают сопровождать корень через ткани первич-

ной коры и далее. Эти клетки окутывают снаружи проводящий пучок корня. Вероятно, проводящая система развившегося корня недостаточно сформирована, и при помощи трахеидоподобных клеток побег снабжает корни питанием и водой (рис. 3В, Г).

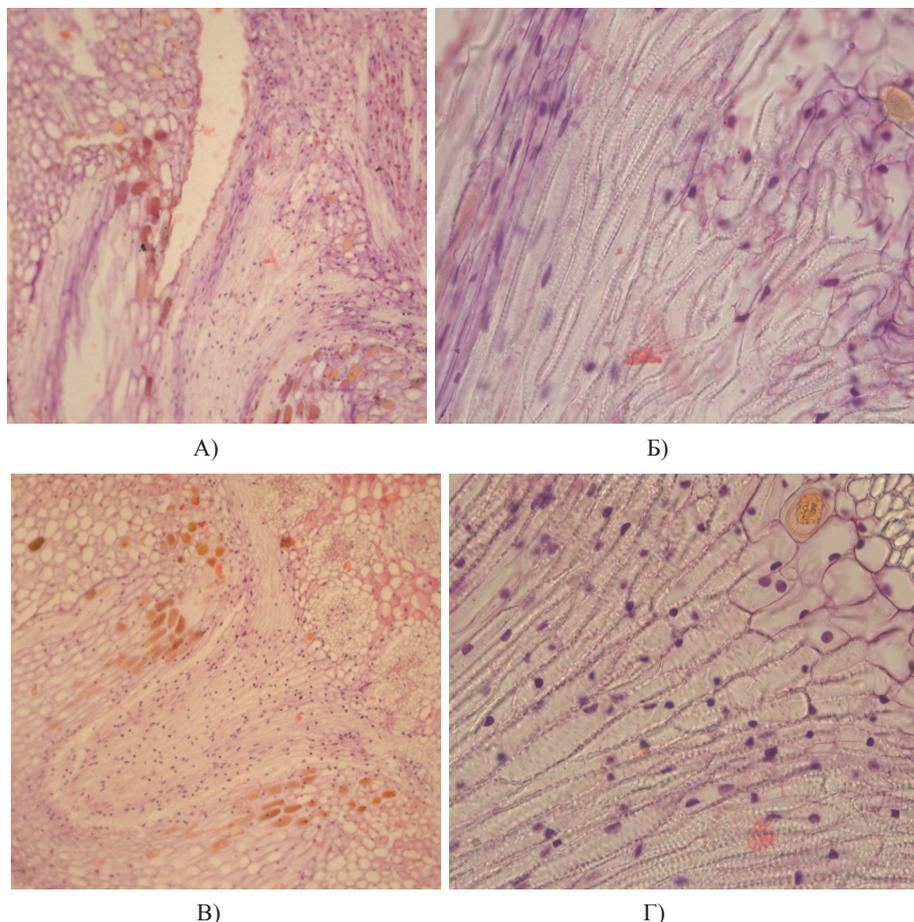


Рис. 3. Гидроцитные клетки и тяжи у побега в области соединения стебля и корня *I. ensata*: А) интактное растение, увел.  $\times 100$ ; Б) интактное растение, увел.  $\times 400$ ; В) растение-регенерант, увел.  $\times 100$ ; Г) растение-регенерант, увел.  $\times 400$

В паренхиме, окружающей проводящие пучки побега, обнаруживали меристематиды в виде групп из 25–75 клеток с темноокрашенной цитоплазмой и ядром. После появления меристематиды превращались в маленькие куполообразные примордии и образовывали типичный корневой апекс с корневым чехликом. Эти примордии конической формы давали начало правильно организованной системе тканей корня. На продольном срезе хорошо различима первичная организация корня *I. ensata*, представленная центральным цилиндром, корой и корневым чехликом. В корне это разграничение выражено четко, и его можно наблюдать в области, расположенной ближе к апексу. Боковые корни *in vitro* закладывались эндогенно в перикцикле и пробивались через первичную кору к поверхности корня. Дифференцирующиеся

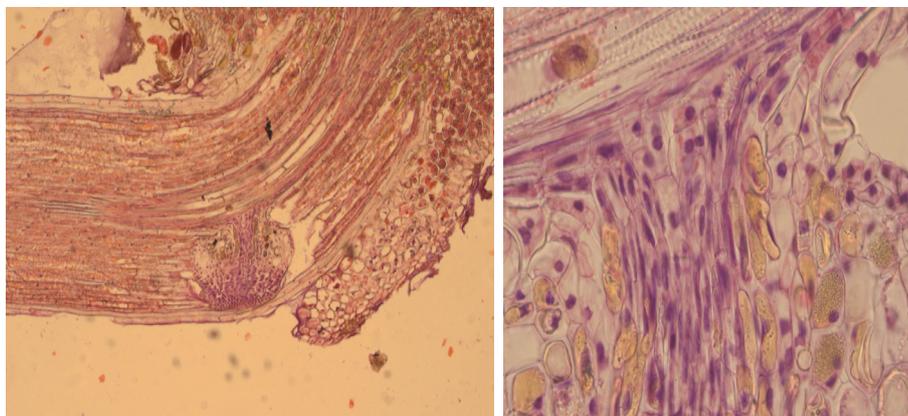
ткани бокового корня вступали в контакт с соответствующими тканями материнского корня. Это обеспечивало взаимодействие материнского корня с его боковыми ответвлениями. В итоге создавалась физиологически взаимодействующая и морфологически целостная корневая система (рис. 4).

#### Заключение

При микроклональном размножении на основании полученных данных было установлено, что между содержанием БАП в средах размножения и показателями этапа укоренения (высота растений после укоренения, число корней, длина корней) для *I. ensata* имеет место обратная зависимость. Анатомические исследования показали, что заложение и развитие придаточных корней проходило аналогично интактным растениям. Особенностью их развития является массовое

скопление трахеидоподобных клеток в зоне перикарпа, в месте заложения корня, а также вдоль центрального цилиндра корня. Так как гидроциты являют-

ся проводящими элементами, можно предположить, что таким образом осуществляется связь материнского побега и корня.



А

Б

Рис. 4. А. Формирование бокового корня (увел.  $\times 100$ ); Б. Развитие проводящей системы бокового корня (увел.  $\times 400$ )

### Библиографический список

1. Пронина И.Н. Оптимизация процесса ризогенеза подвоев и сортов яблони и груши *in vitro* : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. — М., 2008.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры в физиологии и биохимии растений. — Киев, 1980.
3. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. — М., 2004.
4. Болтенков Е.В. Изучение особенностей культивирования *in vitro* тканей дальневосточных видов рода *Iris* L. (*Iridaceae*) для использования в биотехнологии : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. — Владивосток, 2002.
5. Ветчинкина Е.М., Мамаева Н.А. Некоторые аспекты использования культуры семян и зародышей *in vitro* для изучения и сохранения биоразнообразия рода *Iris* L. // Биоразнообразие природных и антропогенных экосистем : сборник статей III молодежного научного семинара. — Екатеринбург, 2005.
6. Чуб В.А. Рост и развитие растений. — URL : <http://herba.msu.ru/russian>.
7. Романов Г.А., Медведев С.С. Ауксины и цитокинины в развитии растений. Последние достижения в исследованиях фитогормонов // Физиология растений. — 2006. — Т. 53.
8. Эсау К. Анатомия растений. — М., 1969.
9. McClelland M.T., Smith A.L., Carothers Z.B. The effects of *in vitro* and *ex vitro* root initiation on subsequent microcutting root quality in three woody plants // Plant Cell Tissue Organ Cult. — 1990. — Vol. 23.
10. Rogers R.B., Smith M.A. Consequences of *in vitro* and *ex vitro* root initiation for miniature rose production // J. Hort. Sci. — 1992. — Vol. 67.
11. Smith M.A. L., McClelland M.T., Timmermann R. Anomalous root structure on woody plants *in vitro* // J. Environ. Hortic. — 1991. — Vol. 9.
12. Grout W.W., Aston H. Transplanting of cauliflower plants regenerated from meristem culture. I. Water loss and water transfer related to changes in leaf wax and to xylem regeneration // Hortic. Res. — 1977. — № 17.
13. Iliiev I., Kitin P., Funada R. Morphological and anatomical study on *in vitro* root formation of silver birch (*Betula pendula* Roth.) // Prop. Orn. Plants. — 2001. — Vol. 1.