
УДК 58
ББК 28.5
Т 46

Тихомирова Л.И.

Кандидат биологических наук, Алтайский государственный университет, зав. отделом биотехнологии растений Южно-Сибирского ботанического сада, Барнаул, тел. (385-2) 66-75-72, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Морфогенез и регенерация в культуре оси соцветия *Iris sibirica* L. (Рецензирована)

Аннотация

Приведены результаты исследований морфогенеза и регенерационной активности в культуре *in vitro* оси соцветия некоторых культиваров *I. sibirica* L. Отмечено, что морфогенез происходит по типу геммогенеза и гемморизогенеза, минуя стадию каллусообразования. Побеги сформированные *de novo* имели исключительно эндогенное происхождение.

Ключевые слова: морфогенез, регенерация, эксплант, микроразмножение, геммогенез, гемморизогенез, *Iris sibirica*, ось соцветия.

Tikhomirova L.I.

Candidate of Biology, Altai State University, Head of Plant Biotechnology Department of the Southern Siberian Botanical Garden, Barnaul, ph. (385-2) 66-75-72, e-mail: L-tichomirova@yandex.ru

Morphogenesis and regeneration in inflorescence axis culture of *Iris sibirica* L.

Abstract

This paper provides results of researches on a morphogenesis and regeneration activity through *in vitro* culture of an inflorescence axis of some cultivars of *I. sibirica* L. It is noted that the morphogenesis occurs in accordance with the hemogenesis and hemo-rhizogenesis type, passing a callusformation stage. Sprouts created *de novo* had exclusively endogenous origin.

Keywords: morphogenesis, regeneration, explant, microreproduction, hemogenesis, hemo-rhizogenesis, *Iris sibirica*, inflorescence axis.

Ирисы – перспективные многолетние растения с высокими декоративными качествами и большим разнообразием форм и окраски цветков. Сорты ириса, как и сорта многих других многолетников, размножают только вегетативно. Для получения здорового посадочного материала в короткие сроки для многих многолетников в настоящее время применяют метод микроклонального размножения.

Основной метод регенерации побегов, использующийся при клональном микро-размножении растений – активация уже существующих меристем. При этом в качестве эксплантов используют верхушечные и боковые почки вегетативных побегов. *I. sibirica* является геофитом, поэтому получение стерильного и жизнеспособного материала при введении в культуру *in vitro* представляет большую трудность. Даже при условии успешной поверхностной стерилизации, внутренняя инфекция проявляет себя на протяжении всех этапов микроклонального размножения этой культуры. При данном способе повреждается или уничтожается растение-донор, поэтому не представляется возможным размножение лучшего и/или единственного экземпляра гибридного растения, отобранного по декоративности цветка [1, 2].

По данным М. Ziv и Н. Lilien-Kipnis [3] ось соцветия явилась хорошим альтернативным источником эксплантов для многих геофитов (*Dichelostemma*, *Eucrosia*, *Gladiolus*, *Haemanthus*, *Hyacinthus*, *Narcissus*, *Nerine* и *Ornithogalum*), так как упрощается стерилизация, и фрагменты оси соцветия проявляют в культуре *in vitro* более высокую регенерационную способность по сравнению с почками вегетативного побега.

Морфологически оси соцветий и ткани цветоложа являются органами осевой природы, еще не закончившими эмбриональное развитие и не утратившими морфогенетические способности [4].

Цель работы: выявить морфогенетические особенности развития и регенерационную способность оси соцветия в культуре *in vitro* для культиваров ириса *I. sibirica*.

В работе придерживались общепринятых в биотехнологии методов [5]. Асептическую работу проводили в ламинарном боксе.

Использовали цветки в фазе бутонизации при величине 20-30 мм (VI–VII этапы органогенеза). После стерилизации для культуры *in vitro* от генеративных побегов *I. sibirica* брали участки между кроющим листом и цветком. Стерильные сегменты цветоножки помещали на стандартную питательную среду MS [6], в которую вводили следующие фитогормоны: цитокининового типа действия – 6-бензиламинопурина (БАП) Sigma, США 4-8 мкМ; ауксинового типа действия – α -нафтилуксусную кислоту (НУК) Sigma, США 3-5 мкМ.

Экспланты выращивали в культуральной комнате, где поддерживалась температура 24-26°C, 16-часовой фотопериод, интенсивность освещения – 2000-4000 лк. Субкультивирование тканей и органов проводили через 15-30 суток.

Провели серии анатомических срезов в разные сроки культивирования эксплантов с частотой от 3 до 5 дней. Были приготовлены постоянные препараты по общепринятым методикам [7] в нашей модификации. Препараты просматривали на микроскопе МБ-30 do MPI-5 made in Poland при увеличении 10×10, 10×40. Фотографии были выполнены цифровым фотоаппаратом Sanyo VPC-S600.

Результаты и их обсуждение

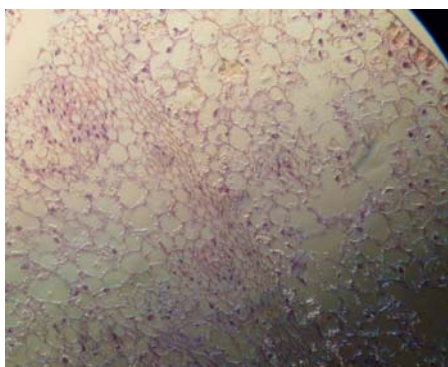
При культивировании *in vitro* фрагментов оси соцветия культиваров *I. sibirica* было выявлено, что тип морфогенетической реакции зависел от количества и соотношения экзогенных фитогормонов. На питательных средах с 4 мкМ БАП, 4 мкМ НУК (1:1) и 4 мкМ БАП, 5 мкМ НУК (1:1,25) ответной реакцией было корнеобразование (рис. 1). На средах где содержание цитокининов превышало содержание ауксинов в 1,2 раза и более, начиная с 6 мкМ БАП фрагменты оси соцветия образовывали побеги.



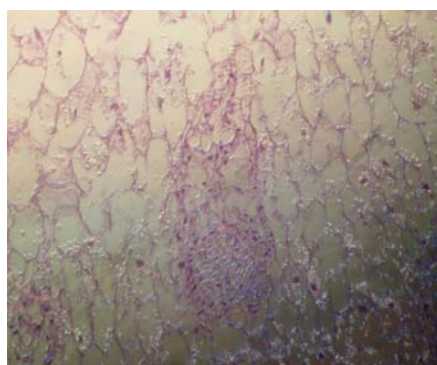
Рис. 1. Ризогенез у эксплантов оси соцветия *I. sibirica* гибрид 21 на среде с 4 мкМ БАП и 5 мкМ НУК

Скорость развития регенерационных процессов в экспланте зависела от концентрации гормонов в питательной среде и от генотипа источника. На среде с 8 мкМ БАП и 3 мкМ НУК у эксплантов сорта Стерх первые признаки геммогенеза отмечали на 15 сутки культивирования, а на среде с 6 мкМ БАП и 5 мкМ НУК – на 25 сутки. Максимальное время составило 35 суток, позже этого срока видимых признаков органогенеза у испытанных сортообразцов не наблюдали.

Проведенное изучение анатомического строения оси соцветия *I. sibirica* (VI-VII этапа органогенеза) на поперечном срезе показало следующее. Генеративный побег покрыт эпидермой, образованной одним слоем клеток с кутикулой. При малом увеличении (8×10) хорошо видно кольцо клеток, представляющее собой многорядный перицикл. В молодых органах перицикл представлен первичной латеральной меристемой, клетки которой в стебле позже утрачивают способность делиться и полностью дифференцируются, превращаясь в склеренхимные волокна. Перицикл является наружным слоем центрального цилиндра. С его внутренней стороны среди паренхимных клеток сердцевины расположены небольшие коллатеральные пучки. Ткани, расположенные к периферии от цилиндра принадлежат первичной коре, которая по ширине в два раза меньше чем центральный цилиндр и представлена, в основном, хлоренхимой. Клетки первичной коры имеют тонкие целлюлозные стенки, некоторые из них, как и клетки эпидермы содержат пигмент. Между клетками паренхимы первичной коры, ближе к перициклу видны очаги деления, так как на данном этапе органогенеза рост генеративного побега еще не закончен. При большом увеличении (8×40) видно, что все пространство центрального цилиндра занято основной паренхимой, среди которой рассеяны закрытые проводящие пучки. Клетки паренхимы изодеаметрической формы. Проводящие пучки располагаются в беспорядке. На периферии их больше, но они мелкие, в центре побега их меньше, но они крупнее, что характерно для однодольных растений. Расположение проводящих пучков можно определить, как рассеяно-пучковой. Также прослеживается разная степень сформированности проводящих пучков (рис. 2).



а)



б)

Рис. 2. Анатомическое строение оси соцветия *I. sibirica* сорт *Berlin Ruffles* (VI-VII этап органогенеза): а) ткани первичной коры (увел. 8×10); б) закрытый проводящий пучок центрального цилиндра, продольный срез (увел. 8×40)

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

На 4 сутки культивирования отмечали изменения во всех тканях экспланта в сравнении с тканями интактных растений. Клетки всех тканей увеличились в размере. Эпидермальный слой приобрел палисадную форму. Среди общей массы выделялся определенный тип клеток, более крупных, тонкостенных, сильно вакуолизированных.

По-видимому, это пузыревидные клетки. Считают, что они способны внезапно и быстро растягиваться в течение определенной стадии развития органа, запасая избыток воды, отсюда и термин «клетки растяжения», часто применяемый к ним [8]. Содержание пигмента в некоторых клетках эпидермы и первичной коры сохранилось. Клетки хлоренхимы стали более округлой формы и разной величины за счет неравномерного роста растяжением. Четкой границы между первичной корой и центральным цилиндром на данном этапе развития эксплантов нет. Кольцо из клеток перицикла отчетливо не выражено. В этой области отмечены очаги скопления мелких клеток с крупными ядрами – зоны деления. Нарушается видимая четкость строения проводящих пучков за счет деления клеток обкладки. Трахеальные элементы имеют спиральное утолщение, говорящее о том, что орган способен к росту и растяжению.

При изучении анатомического строения на 7 сутки культивирования эксплантов, нами отмечено, что изменения в тканях становятся ярче выраженными. Клетки эпидермы еще более утолщаются и округляются. За счет неравномерного роста клеток эпидермиса и их различной величины поверхность экспланта становится неровной. В то время как клетки паренхимы первичной коры становятся более выровненными в этот период. Слой перицикла полностью разрушен, в этой зоне в большом количестве формируются очаги деления. Выявляются полиады (рис. 3).

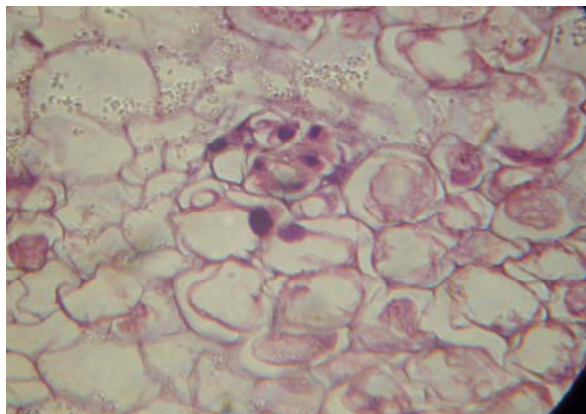


Рис. 3. Анатомическое строение эксплантов оси соцветия *I. sibirica* сорт Berlin Ruffles на 7 сутки культивирования, образование полиад (увел. 10×40)

На 10 сутки развития эксплантов в их анатомическом строении отмечено, увеличение числа паренхимных клеточных слоев первичной коры до 18. Клетки перицикла продолжают образовывать очаги деления. В этот процесс включаются паренхимные клетки внутренних слоев первичной коры, хорошо просматриваются полиады. Вместе все эти очаги образуют в пограничной области между первичной корой и центральным цилиндром сплошное кольцо меристематической зоны. Проводящие пучки центрального цилиндра хорошо развиты (рис. 4).

К 14 суткам культивирования эксплантов количество клеточных слоев первичной коры сокращается до 12, вероятно за счет активного вовлечения последних в процессы формирования очагов деления. Очаги деления в меристематической зоне разного возраста. Наблюдались крупные, их как бы охватывают клетки перицикла, за которым располагаются пучки центрального цилиндра. Отмечены мелкие очаги деления (более молодые), образующиеся из клеток внутренних слоев первичной коры. На данном этапе в одном экспланте нами установлено около 6 штук крупных и ряд мелких очагов. Клетки паренхимы, как первичной коры, так и центрального цилиндра имеют края звездчатой формы, вероятно за счет давления быстро делящихся клеток меристематической зоны (рис. 5).

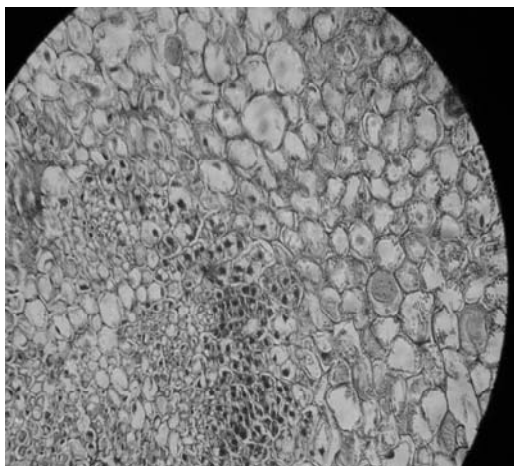


Рис. 4. Анатомическое строение эксплантов оси соцветия *I. sibirica* сорт Berlin Ruffles на 10 сутки культивирования, образование меристематического пояса (увел. 10×10)

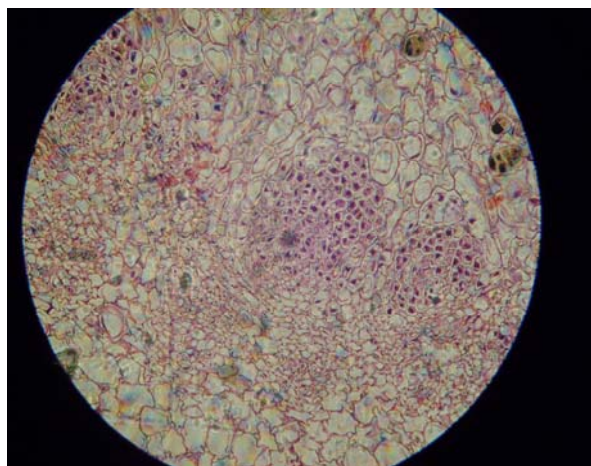
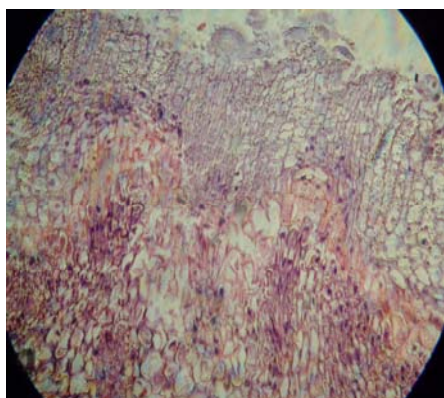


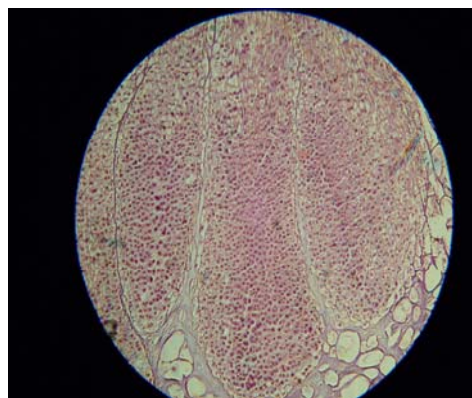
Рис. 5. Анатомическое строение экспланта оси соцветия *I. sibirica* сорт Berlin Ruffles на 14 сутки культивирования (поперечный срез) (увел. 10×10)

На 17 сутки культивирования активные деления в очагах продолжают. В первичной коре меристематические очаги возникают ближе к перициклу. Клеточные деления в паренхиме центрального цилиндра не отмечены. Появляются побеги. На продольном срезе экспланта видно, что параллельно относительно проводящих пучков материнского экспланта формируются побеги. Побег в своем развитии движется вверх к раневой пробке экспланта, на рисунке окрашенной серым цветом.

На 20 сутки у одних эксплантов на поверхности отмечено появление корней (рис. 6).



а)



б)

Рис. 6. Анатомическое строение эксплантов оси соцветия *I. sibirica* сорт Berlin Ruffles на 20 сутки культивирования: а) побеги сформированный *de novo* (продольный срез); б) корни, сформированные *de novo* (продольный срез). Увел. 10×10

Гистологический анализ этапов морфогенеза в эксплантах оси соцветия *I. sibirica* сорт Berlin Ruffles

В результате изучения тканей эксплантов было отмечено, что анатомическое строение генеративного побега *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles на VI-VII этапах органогенеза типично для выполненного стебля однодольных растений. В тоже время систе-

мы тканей на VI-VII этапах имели ряд отличий от таковых в зрелом цветоносе. Согласно Г.И. Родионенко [9], первичная кора отчленена от центрального цилиндра кольцом периклической склеренхимы. Нами установлено, что на данном этапе развития оси соцветия, одревеснение клеток периклики и превращение их в склеренхиму, еще не произошло, и они не утратили способность делиться. По этой причине первые локальные участки меристемы наблюдали именно в этой ткани. По данным Г.И. Родионенко [9], у большинства видов ириса наиболее интенсивно (до 10-15 мм в сутки) цветонос растет в предцветный период. Причем, у генеративного побега преобладает вставочный или интеркалярный рост, то есть рост междоузлий стебля в длину за счет длительно сохраняющейся меристематической активности клеток, находящихся в их основании (интеркалярных меристем). В наших исследованиях за первые 10 суток культивирования размеры эксплантов увеличивались не только за счет растяжения клеток, но и за счет увеличения паренхимного слоя первичной коры с 12 до 18 клеточных рядов. Диаметр экспланта в этот период практически соответствовал диаметру цветоноса у интактных растений этого периода развития. Очагов каллусной ткани ни наружных, ни внутренних обнаружено не было.

Известно, что большую часть в выполненном стебле однодольных растений занимает сердцевина. На данном этапе развития эксплантов (VI-VII этапы органогенеза) центральный цилиндр занимал две третьих от общего объема, а первичная кора одну третью часть, соответственно. По мере созревания тканей цветоносного побега у *I. sibirica* клетки основной ткани становятся пустотелыми, при этом значительное количество клеток центрального цилиндра полностью разрушается, что приводит к возникновению полого цветоносного побега [9]. На момент эксплантации стебель цветоносного побега был выполненным.

Как отмечает О.А. Чурикова [9], у нарцисса и гиацинта первой ответной реакцией эксплантов цветоноса на поранение является формирование защитной пленки, а у нарцисса, вместе с тем и образование многочисленных длинных 2-4 клеточных трихом. Нами установлено, что у *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles формировалась такая пленка из нескольких клеточных слоев, но образование трихом не наблюдали.

Способность к дедифференциации и восстановлению меристематической активности в цветоносах гиацинта и нарцисса проявляют, прежде всего, клетки неповрежденного субэпидермального и прилегающих к нему нескольких наружных слоев первичной коры [10]. Меристематическая активность в эксплантах *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles отмечалась, начиная с 7 дня культивирования, и была ограничена областью периклики. Первые клеточные перегородки были ориентированы периклинально. Под общей оболочкой инициальной клетки возникала группа мелких клеток с густым цитоплазматическим содержимым и четко различимыми ядрами – полиада. В дальнейшем происходил лизис клеточной стенки полиады. Клетка, произведя от себя путем деления дочерние клетки, восстанавливала свою форму и величину и оставалась неизменно меристематической. Дочерние клетки, порожденные путем деления инициальных клеток, в течение некоторого времени сохраняли характер меристематических и размножались. Таким образом, в экспланте возникали очаги деления. Волна клеточных делений к 10 дню культивирования распространялась вдоль границы между первичной корой и центральным цилиндром, образуя сплошной пояс. К этому времени отмечали образование полиад из клеток первичной коры.

Развивающиеся экспланты на 14-17 сутки размер свой не увеличивали, в то же время отмечались активные процессы во всех тканях. Число клеточных слоев паренхимы первичной коры уменьшалось с 18 до 12 за счет вовлечения внутренних слоев в процессы формирования меристематических очагов. В массовом количестве возникали полиады из внутренних слоев паренхимных клеток первичной коры между уже суще-

ствующими крупными очагами деления. В это время на поверхности экспланта появлялись побеги. В данном случае, вероятно, системы тканей побегов в экспланте оси соцветия *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles развивались как из клеток перицикла, так и из клеток паренхимы первичной коры. Появление первых признаков ризогенеза на поверхности эксплантов отмечали к 20 суткам культивирования (табл. 1).

Таблица 1

Этапы морфогенеза в эксплантах оси соцветия *I. sibirica* сорт 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	Кольцо перицикла отчетливо не выражено. Рост клеток паренхимы растяжением.
7 суток	Слой перицикла разрушен, в этой зоне формируются очаги деления. Выявляются полиады.
10 суток	Число паренхимных клеточных слоев увеличилось от 12 до 18. В процесс деления включаются клетки первичной коры. Образуется сплошное кольцо деления в районе перицикла.
14 суток	Число клеточных слоев паренхимы первичной коры уменьшилось до 12 за счет вовлечения их в процесс деления и формирования новых очагов деления. Очаги меристематической активности разного размера. Крупные, их около 6 штук на один эксплант, мелких гораздо больше.
17 суток	В первичной коре меристематические очаги возникают ближе к перициклу. Появляются побеги.
20 сутки	В области перицикла на поверхности экспланта появляются корни.

На продольных срезах экспланта через 20 суток развития было хорошо видно, как в результате ряда делений возникший корешок обладает собственной меристемой и чехликом. Границы между системами тканей у развившихся корней были выражены очень четко. Срединную его часть составлял центральный цилиндр с плотно примыкающими друг к другу проводящими элементами, отделенный от коры эндодермой и окруженный хорошо различимым слоем – перициклом. Растущий зачаток прокладывал себе путь через первичную кору материнского экспланта и выдвигался наружу.

Выводы

1. Тип морфогенетической реакции в эксплантах оси соцветия *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles зависел от количества и соотношения экзогенных фитогормонов.
2. Скорость развития регенерационных процессов в экспланте зависела от концентрации гормонов в питательной среде и от генотипа источника.
3. Анатомическое строение генеративного побега *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles на VI-VII этапах органогенеза типично для выполненного стебля однодольных растений.
4. Меристематическая активность (возникновение полиад) в эксплантах *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles отмечалась, начиная с 7 дня культивирования, и была ограничена областью перицикла и внутренними слоями клеток первичной коры.

5. Системы тканей побегов в экспланте оси соцветия *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles развивались как из клеток перицикла, так и из клеток паренхимы первичной коры.

6. Побеги и корни, развившиеся на эксплантах оси соцветия *I. sibirica* сорта Berlin Ruffles, имели исключительно эндогенное происхождение.

Примечания:

1. Ишмуратова М.М. Особенности культивирования *in vitro* растений различных экологических групп на примере видов рода *Iris* L // Растительные ресурсы. М., 1999. № 4. С. 67-74.
2. Тихомирова Л.И. Получение стерильной активно пролиферирующей культуры ириса в условиях *in vitro* // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 8. С. 37-40.
3. Ziv M., Lilien-Kipnis H. Bud regeneration from inflorescence exsplants for rapid propagation of geophytes *in vitro* // Plant Cell Reports. 2000. No. 19. P. 845-850.
4. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: учебник. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002. 232 с.
5. Бутенко Р.Г. Дифференциация и морфогенез в культуре тканей, клеток и протопластов // Биология развития растений. М.: Наука, 1975. С. 48-65.
6. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassaya with Tobacco Tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, No. 4. P. 473.
7. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р.П. Барыкина, Т.Д. Веселова, А.Г. Девятков [и др.]. М.: Изд-во МГУ, 2004. 312 с.
8. Эсау К. Анатомия растений. М.: Мир, 1969. 564 с.
9. Родионенко Г.И. Ирис. М.: Изд-во Минкомхоз РСФСР, 1961. 60 с.
10. Некоторые особенности морфогенеза *in vitro* при масс-клональном размножении лилий / О.А. Чурикова, В.А. Румынин, Р.П. Барыкина, А.Г. Слюсаренко // Бюллетень главного ботанического сада. Академия наук СССР. М.: Наука, 1991. Вып. 159. С. 43-49.

References:

1. Ishmuratova M.M. Features of cultivation of *in vitro* of plants of various ecological groups on the example of types of the *Iris* L sort // Vegetable resources. M., 1999. No. 4. P. 67-74.
2. Tikhomirova L.I. The production of a sterile and actively proliferating culture of an iris in the *in vitro* conditions // Achievements of science and technology. 2010. No. 8. P. 37-40.
3. Ziv M., Lilien-Kipnis H. Bud regeneration from inflorescence exsplants for rapid propagation of geophytes *in vitro* // Plant Cell Reports. 2000. No. 19. P. 845-850.
4. Batygina T.B., Vasilyeva V.E. Reproduction of plants: a textbook. SPb.: SPbGU publishing house, 2002. 232 pp.
5. Butenko R.G. Differentiation and morphogenesis in the culture of tissues, cells and protoplasts // Biology of plant development. M.: Nauka, 1975. P. 48-65.
6. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassaya with Tobacco Tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, No. 4. P. 473.
7. The directory on botanical microtechnics. Foundations and methods / R.P. Barykina, T.D. Veselova, A.G. Devyatov [etc.]. M.: MSU publishing house, 2004. 312 pp.
8. Esau K. Anatomy of plants. M.: Mir, 1969. 564 pp.
9. Rodionenko G.I. Iris. M.: The RSFSR Min-komkhoz publishing house, 1961. 60 pp.
10. Some features of the morphogenesis *in vitro* at mass-clone reproduction of lilies / O.A. Churikova, V.A. Rumynin, R.P. Barykina, A.G. Slyusarenko // The bulletin of the main botanical garden. The USSR Academy of Sciences. M.: Nauka, 1991. Iss. 159. P. 43-49.