

В. И. Маляровская, зав. лаб., к. б. н.,
Л. С. Самарина, снс, к. б. н.,
Р. С. Рахмангулов, нс, к. б. н.,
Н. Г. Конинская, мнс
ФГБНУ ВНИИЦиСК, г. Сочи
malyarovskaya@yandex.ru

УДК 578:581.5:582.992(07)

DOI 10.31676/2073-4948-2018-55-71-77

ИЗУЧЕНИЕ ЭТАПОВ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *GALÁNTHUS WORONOWII* LOSINSK.

Резюме. В статье показано, что для инициации и заложения структур *de novo*, а также на этапе собственно микроразмножения необходимо воздействие на ткани экспланта *Galánthus woronowii* Losinsk. регуляторов роста (6-БАП и НУК) в концентрации 2,0 и 1,0 мг/л и длительный начальный период культивирования до развития первых адвентивных микролуковичек. Установлено, что использование питательных сред с различным сочетанием и концентрациями регуляторов роста влияет на пути морфогенеза культивируемых эксплантов (части чешуй луковичек). Так, на среде с содержанием 6-БАП отмечен прямой органогенез. Добавление тидиазурона (TDZ) и кинетина вызывало образование каллусных тканей, из которых путем непрямого органогенеза получены микролуковички.

Ключевые слова: *Galánthus woronowii* Losinsk., индукция морфогенеза, культура *in vitro*, регуляторы роста, микролуковички, сохранение биоразнообразия.

Summary. The results of tissue culture micropropagation and conservation of endangered endemic species of the Western Caucasus *Galánthus woronowii* Losinsk. are presented in the article. It has been shown that each stage of *in vitro* culture such as explants initiation, *de novo* development and multiplication required addition of exogenous growth regulators (6-BAP and NAA) into a culture medium at a concentration of 2.0 and 1.0 mg/l and initial cultivation period needed to be long for the development of the first adventive micro-bulbs. It has been established that the use of nutrient media supplemented with growth regulators affects various pathways on morphogenesis of cultured explants (bulbs scales parts). A direct organogenesis was obtained on the medium with addition of 6-BAP. Addition of thidiazuron (TDZ) and kinetin enhanced the callus development, from which micro-bulbs were obtained by indirect organogenesis.

Keywords: *Galánthus woronowii* Losinsk., induction of morphogenesis, *in vitro* culture, growth regulators, micro-bulbs, biodiversity conservation.

Введение

В настоящее время из-за увеличения антропогенной нагрузки на окружающую среду во всем мире остро встает вопрос сохранения биологического разнообразия. Привлечение методов биотехнологии, базирующихся на культивировании изолированных органов, тканей и

клеток растений является одним из эффективных способов решения данной проблемы, поскольку имеет преимущества перед традиционно используемыми подходами [1, 2].

В этой связи нами уделяется большое внимание вопросу разработки приемов размножения и сохранения редких и исчезающих видов Западного Кавказа в условиях *in vitro* [3-6]. Особое положение занимает подснежник Воронова *Galanthus woronowii* Losinsk. (*Amaryllidaceae*) – эндемик Кавказа, численность которого сокращается в результате чрезмерного антропогенного пресса. Этот вид внесен в Красную книгу Краснодарского края и рекомендован к охране на территории Большого Сочи [7, 8]. К тому же использование методов культуры тканей в большей степени необходимо для размножения *G. woronowii* в сравнении с другими луковичными (*Leucojum aestivum* L. и *Pancratium maritimum* L.) из-за малых размеров луковиц этого вида, что не позволяет в необходимом объеме размножать растения вегетативным способом [9]. Ранее проведенные исследования по введению различных частей луковичных чешуй *G. woronowii* в условия культуры *in vitro* выявили высокую морфогенную активность первичных эксплантов. Было показано, что морфогенетический потенциал чешуй возрастал в ряду: апикальная – медиальная – базальная часть (донце). Однако на начальном этапе инициации и заложения структур *de novo* отмечен длительный период культивирования до развития первых адвентивных побегов [10]. Оптимизация питательных сред по концентрации и различному сочетанию регуляторов роста на этапах введения и собственно микроразмножения подснежника Воронова – важное условие для активации регенерационных процессов. Поэтому целью наших исследований было изучение этапов микроразмножения *G. woronowii*.

Методика проведения исследований

Исследования были проведены в период 2016-2017 гг. на базе лаборатории биотехнологии, физиологии и биохимии растений ВНИИЦиСК (г. Сочи) с использованием современных методов культуры клеток и тканей [11, 12]. Объектом исследований послужили экспланты (части чешуй луковицы) *G. woronowii*. На этапе инициации эксплантов *G. woronowii* использовали питательную среду по прописи Мурасиге – Скута [13], дополненную регуляторами роста в различных концентрациях. Варианты опыта: 1. 6-бензиламинопуридин (6-БАП) 1,0 мг/л и индолил-3-масляная кислота (ИМК) 0,5 мг/л; 2. 6-БАП 2,0 мг/л и нафтилукусная кислота (НУК) 1,0 мг/л; 3. тидиазурон (TDZ) 0,25 мг/л; 4. кинетин (Кин) 0,5 мг/л; контроль – без регуляторов роста. На этапе оптимизации стадии собственно микроразмножения применяли следующие регуляторы роста: 1. 6-БАП 2,0 мг/л, индолилукусная кислота (ИУК) 1,0 мг/л; 2. 6-БАП 2,0 мг/л, НУК 1,0 мг/л; 3. 6-БАП 3,0 мг/л; НУК 1,0 мг/л.

Длительность пассажа на этапе введения в культуру *in vitro* составила 78-90 дней. Отделение полученных адвентивных микролуковичек производили по мере их нарастания на тканях первичного экспланта и переносили на среды для размножения. Микролуковички поддерживали в условиях активного роста при температуре $+22 \pm 2$ °С, фотопериоде (16/8) и длительности пассажа 45–50 дней, что обеспечивало активную регенерационную способность.

Статистический анализ данных проводили с применением стандартных программ Statistica-6.0 и MS Excel. На каждый вариант питательной среды было высажено по 30 эксплантов в трехкратной повторности.

Результаты

На этапе инициации эксплантов *G. woronowii* установлено, что по сравнению с контролем (среда без регуляторов роста) добавление в питательную среду регуляторов роста 6-БАП, НУК и ИМК индуцировало регенерацию в тканях чешуй адвентивных микропобегов (рис.). При этом наибольшая частота их регенерации (65,7%) и среднее количество образовавшихся микролуковичек *de novo* (3,4 шт./экспл.) было на питательной среде, содержащей 6-БАП и НУК в концентрации 2,0 и 1,0 мг/л соответственно (табл. 1).



Рис. Регенерация микролуковичек *G. woronowii* на поверхности первичного экспланта на среде МС: а) контроль; б) 6-БАП 2,0 мг/л, НУК – 1,0 мг/л; в) 6-БАП 1,0 мг/л, ИМК 0,5 мг/л, 73 день культивирования.

Кроме того, необходимо отметить, что регенерация адвентивных микролуковичек проходила в тканях экспланта по пути прямого органогенеза. Наименьшая частота регенерации микролуковичек наблюдалась в опытных вариантах, содержащих TDZ и кинетин, однако по сравнению с контролем этот показатель был выше на 9,2-12,8%. На этой же среде отмечено формирование

желтого морфогенного каллуса и образование корней. Частота морфогенного каллуса составляла 27,8 и 31,2%. В дальнейшем, через 5-7 недель из сформированных в каллусе почек наблюдалось образование микролуковичек. В данном случае регенерация микролуковичек подснежника Воронова проходила по пути непрямого органогенеза. Необходимо отметить, что только 9,8% сформированных в каллусе почек образовали микролуковички.

Таблица 1.

Влияние регуляторов роста на частоту регенерации и количество микролуковичек *G. woronowii* (на начальном этапе инициации культуры)

Регуляторы роста, мг/л	Частота регенерации адвентивных микролуковичек, %	Частота индукции морфогенного каллуса, %	Кол-во образовавшихся микролуковичек <i>de novo</i> , шт./эксплант
6-БАП - 1,0; ИМК - 0,5	55,1	-	3,1±0,2
6-БАП - 2,0; НУК - 1,0	65,7	-	3,4±0,1
ТДЗ - 0,25	34,3	27,8	1,9±0,4
Кин - 0,5	30,7	31,2	1,7±0,3
контроль (без регуляторов роста)	21,5	-	2,4±0,3

Далее полученные на начальном этапе инициации культуры *in vitro* микролуковички *G. woronowii* использовали в опыте по оптимизации этапа собственно микроразмножения. Известно, что подбор оптимальных питательных сред по концентрации и соотношению регуляторов роста является ключевым фактором, способствующим развитию имеющихся у растения меристем или закладке их *de novo* [14]. Поэтому на этапе оптимизации стадии собственно микроразмножения использовали различные экзогенные регуляторы роста: цитокининовой 6-БАП в концентрациях 2,0-3,0 мг/л и ауксиновой природы ИУК, НУК в концентрации 1,0 мг/л, показавшие наилучшие результаты на начальном этапе введения и инициации культуры. Согласно полученным результатам частота регенерации варьировала от 28,9% в контроле (среда без регуляторов роста) до 79,8% на среде, дополненной БАП и НУК в концентрации 2,0 и 1,0 мг/л (табл. 2). На этой же среде отмечено и наибольшее количество микропобегов – 3,7 ±0,4 шт./экспл.

При увеличении концентрации 6-БАП до 3,0 мг/л в сочетании с 1,0 мг/л НУК отмечали снижение регенерации и активности побегообразования (3,3

$\pm 0,2$ шт./эксплант), а также увеличение периода (на 8-10 дней), необходимого для индукции микролуковичек. Кроме того, замена ауксина с НУК на ИУК приводила к уменьшению частоты побегообразования до 59,3% с образованием в среднем $2,9 \pm 0,5$ луковичек на эксплант. На контрольной (без регуляторов роста) среде также наблюдали регенерацию адвентивных микропобегов, что можно объяснить последствием накопленных в тканях экспланта экзогенных регуляторов роста, используемых на начальном этапе введения в условия культуры.

Таблица 2.

Влияние регуляторов роста на регенерацию микропобегов *G. woronowii* (на этапе собственно микроразмножения)

Регуляторы роста, мг/л	Частота регенерации, %	Количество микропобегов, шт./эксплант
6-БАП - 2,0; ИУК - 1,0	59,3	$2,9 \pm 0,5$
6-БАП - 2,0; НУК - 1,0	79,8	$3,7 \pm 0,4$
6-БАП - 3,0; НУК - 1,0	56,1	$3,3 \pm 0,2$
контроль (без регуляторов роста)	28,9	$2,1 \pm 0,3$

Использование TDZ на этапе инициации культуры приводило к образованию адвентивных микролуковичек, однако частота и скорость развития микропобегов из этих почек были низкими. Негативное влияние TDZ на регенерацию различных видов растений также отмечалось в работах других авторов [15, 16]. В то же время выявлена высокая эффективность эндогенного регулятора роста 6-БАП в сравнении с другими цитокининами на этапах инициации в культуру *in vitro* и собственно микроразмножения подснежника Воронова. Необходимо также отметить, что на этапе введения в культуру при культивировании *G. woronowii* наблюдали как прямой, так и непрямой органогенез.

Заключение

Таким образом, для инициации и заложения структур *de novo*, а также на этапе собственно микроразмножения необходимы воздействие на ткани экспланта *G. woronowii* регуляторов роста 6-БАП и НУК в концентрации 2,0 и 1,0 мг/л и длительный начальный период культивирования до развития первых адвентивных микролуковичек. Выявлена высокая морфогенная активность луковичных чешуй, как первичных эксплантов в культуре *in vitro*. Установлено, что использование питательных сред с комбинированными

регуляторами роста влияет на пути морфогенеза культивируемых эксплантов. На среде с содержанием 6-БАП отмечен прямой органогенез, а добавление TDZ и кинетина вызывало образование каллусных тканей, из которых путем непрямого органогенеза получены микролуковички.

Список использованной литературы

1. **Вечернина Н. А.** Сохранение биологического разнообразия редких, исчезающих видов, уникальных форм и сортов растений методами биотехнологии: дисс. ... д. б. наук. – Барнаул, 2006. – 325 с.

2. **Рындин А. В., Белоус О. Г., Притула З. В., Маляровская В. И.** Лаборатория биотехнологии, физиологии и биохимии растений Всероссийского научно-исследовательского института цветоводства и субтропических культур: вчера, сегодня, завтра // Субтропическое и декоративное садоводство, 2015. – Вып. 54. – С. 9-22.

3. **Самарина Л. С., Коломиец Т. М., Слепченко Н. А.** Сохранение *in vitro* исчезающего псаммофита черноморского побережья России *Pancratium maritimum* // Субтропическое и декоративное садоводство, 2012. – Т. 47. – № 2. – С. 172-177.

4. **Маляровская В. И., Коломиец Т. М., Соколов Р. Н., Самарина Л. С.** Влияние спектрального состава света на рост и развитие *Lilium caucasicum* в условиях культуры *in vitro* // Политематический сетевой электронный научный журнал КубГАУ. Краснодар, 2013. – № 94. – С. 1016-1026.

5. **Соколов Р. Н., Коломиец Т. М., Маляровская В. И.** Введение в культуру *in vitro* некоторых редких и исчезающих видов флоры Западного Кавказа // Научный журнал КубГАУ, 2013. – № 94(10). – С. 1-17.

6. **Коломиец Т. М., Маляровская В. И., Губаз С. Л.** Создание и поддержание коллекции субтропических плодовых, цветочно-декоративных культур, редких и исчезающих видов Западного Кавказа в культуре *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России, 2015. – Т. 43. – С. 99-103.

7. **Красная книга Краснодарского края.** Том Растения и грибы. – Краснодар: ООО «Дизайн Бюро № 1», 2007. – 489 с.

8. **Солодько А. С., Кирий П. В.** Красная книга Сочи. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды. Растения и грибы. – Сочи, 2002. – Том 1. – 148 с.

9. **Слепченко Н. А.** Редкие и исчезающие виды семейства *Amaryllidaceae* Jaume Saint-Hilaire на Черноморском побережье России и стратегия их сохранения: автореф. дисс. ... к. б. наук. – Махачкала, 2013. – 23 с.

10. **Коломиец Т. М., Маляровская В. И., Самарина Л. С.** Введение в культуру *in vitro* подснежника Воронова // Субтропическое и декоративное садоводство, 2017. – № 61. – С. 108-114.

11. **Бутенко Р. Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – С. 14-16.

12. **Черевченко Т. М., Лаврентьева А. Н., Иванников Р. В.** Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – К.: Наукова Думка, 2008. – 558 с.

13. **Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures // *Physiologia Plantarum*, 1962. – № 15. – P. 473-497.

14. **Bacchetta L., Remotti P. C., Bernardini C., Saccardo F.** Adventitious shoot regeneration from leaf explants and stem nodes of *Lilium* L. Bacchetta // *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 2003. – Vol. 74. – P. 37-44.

15. **Parić A., Cakar J., Muratovic E., Karalija E.** Induction of bulblets on leaf and bulb explants of endangered *Lilium bosniacum* (G. Beck) G. Beck ex Fritsch // *Botanica Serbica*, 2011. – Vol. 35 (1). – P. 31-35.

16. **Мурасева Д. С.** Размножение и сохранение *in vitro* редких и эндемичных видов рода *Fritillaria* L.: Дисс. ... к. б. наук. – Новосибирск, 2016. – 149 с.

V. I. Malyarovskaya, L. S. Samarina, R. S. Rakhmangulov, N. G. Koninskaya

Federal State Budgetary Scientific Institution All-Russian Research Institute
of Floriculture and Subtropical Crops, Sochi, Russia

**STUDY OF MICROPROPAGATION STAGES
OF *GALÁNTHUS WORONOWII* LOSINSK.**