

ТЕХНОЛОГІЇ *IN VITRO*, ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ

БЕЛОКУРОВА В.Б.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, Киев-143, ул. Акад. Заболотного, 148, E-mail: iicb@iicb.kiev.ua

РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO* ОХРАНЯЕМОГО ВИДА *BELLEVALIA SARMATICA* (PALL. EX GEORGI) WORONOW (HYACINTHACEAE)

Современная биотехнология предоставляют широкий спектр практических подходов для сохранения биоразнообразия растений, что особенно актуально по отношению к видам, находящимся под угрозой исчезновения и занесённых в реестры охраняемых видов в различных регионах мира. В основе создания технологий сохранения растительного материала с использованием методов культуры *in vitro* лежит возможность массового размножения растений в асептической культуре с последующим переносом регенерантов в условия открытого грунта. Основные принципы размножения растений с помощью методов культуры *in vitro* разработаны достаточно хорошо [1, 2], однако работа с каждым новым объектом требует совершенствования методик (подбор оптимального типа эксплантов, состава питательных сред, условий культивирования и т.п.).

Банк зародышевой плазмы мировой флоры Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины содержит ряд охраняемых видов растений, в том числе представителей семейства Hyacinthaceae [3]. Вид *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow, который относят, по разным классификациям, к семействам Liliaceae или Hyacinthaceae – степное растение, прежде широко распространённое. В настоящее время встречается редко, занесено в списки региональной охраны ряда южных областей Украины, а также в Красную книгу Российской Федерации. Актуальность разработки методов культивирования *B.sarmatica in vitro* связана не только с охраняемым статусом этого растения, но и с тем, что это перспективный декоративный вид для интродукции и получения новых форм для цветоводства. В связи с этим целью работы было изучение возможностей введения *B.sarmatica* в асептическую культуру и разработка эффективных методов размножения *in vitro*.

Материалы и методы

Поверхностная стерилизация семян. В работе использовали семена *B.sarmatica* из банка семян мировой флоры ИКБГИ. Поверхностную стерилизацию семян проводили следующим образом: обработка 70% этанолом в течение 1 мин, далее наполовину разбавленным водой коммерческим препаратом "Белизна" (10 мин) с последующей трёхкратной промывкой стерильной дистиллированной водой. После этого семена подсушивали на стерильной фильтровальной бумаге и переносили в чашки Петри на безгормональную среду Мурасиге-Скуга (MS) с вдвое уменьшенным содержанием макросолей и сахарозы. Чашки с семенами инкубировали в условиях культуральной комнаты при 16-часовом фотопериоде и температуре 25°C.

Индукция регенерации *in vitro*. Базальные части сформировавшихся луковиц *B.sarmatica* были использованы как экспланты при отработке методов размножения *in vitro*. Экспланты нарезали на фрагменты величиной около 5 мм и культивировали на средах различного минерального состава (MS, среда Гамборга B₅) с бензиламинопурином (БАП) в концентрациях 0,2 и 1 мг/л при 25°C и 16-часовом фотопериоде. Субкультивирование на свежие среды проводили раз в месяц. Сформировавшиеся адвентивные побеги переносили для дальнейшего развития на безгормональную среду B₅ и выращивали в тех же условиях.

Результаты и обсуждение

Прорастание семян началось в течение месяца после поверхностной стерилизации, в итоге через три месяца культивирования проросло 6 семян из 13, использованных в эксперименте (46%). Каких-либо стратифицирующих обработок семян *B.sarmatica* применять не пришлось, в отличие от семян других представителей семейства Hyacinthaceae из нашей коллекции (*Hyacinthella*, *Hyacinthoides*, *Hyacinthus*, *Muscari*, *Ornithogalum*), для прорастания которых требовалась стратификация при 4°C в течение 3-6 месяцев в

зависимости от вида растений. Не исключено, однако, что применение дополнительной стратификации позволило бы увеличить эффективность прорастания семян бэльвалии.

Образовавшиеся проростки были перенесены на безгормональную среду MS. При выращивании в условиях 16-часового фотопериода на этой среде в течение более чем шести месяцев культивирования сформировались луковицы диаметром 7-10 мм, дальнейшее развитие которых приостанавливалось. Вместе с тем условием стабильного сохранения любого типа культуры *in vitro* (культуры асептических растений, органов, дедифференцированных клеток) является активная мультипликация растительного материала (увеличение числа побегов, накопление биомассы и т.п.). Известно, что вегетативное размножение представителей семейств лилейных и гиацинтовых происходит довольно медленно, в то время как использование методов культуры *in vitro* позволяет ускорить темпы размножения, а также даёт дополнительные возможности для улучшения природных и сортовых форм. Целый ряд публикаций свидетельствует о том, что представители однодольных, в частности, лилейных и гиацинтовых, достаточно легко размножаются в культуре *in vitro* из различного типа эксплантов путём как органогенеза, так и соматического эмбриогенеза [2]. Целью дальнейших экспериментов было индуцировать массовое размножение *B.sarmatica* из сформировавшихся *in vitro* луковиц.

Асептически растущие луковицы разрезали на фрагменты, и их базальные части помещали на питательную среду. Сравнивали влияние двух составов питательных сред (среды Мурасиге-Скуга MS и Гамборга В₅) и двух концентраций БАП (0,2 и 1 мг/л) на эффективность регенерации. В результате по ряду параметров среда В₅ была выбрана в качестве базовой для проведения дальнейшей работы. Как известно, содержание макрокомпонентов и сахарозы в ней меньше, чем в среде MS, что возможно, позитивно сказывалось на процессах регенерации бэльвалии. Эти данные согласуются с данными, полученными на некоторых других видах растений. Так, например, в работе [4] сообщается, что редуцированные уровни неорганических солей и сахарозы были важны для эффективной индукции регенерации у *Alstoemeria*. Питательные среды с меньшим содержанием сахарозы оказались более эффективными в отношении формирования адвентивных луковичек в чешуйках луковиц лилии [5].

В наших экспериментах индукция адвентивных почек *B.sarmatica* начиналась на срезах базальных частей луковиц в течение 1,5-2 месяцев культивирования в присутствии БАП в концентрации 1 мг/л (Рис. 1А). Как известно, для целого ряда видов растений адвентивное побегообразование можно индуцировать совместным действием ауксинов и цитокининов при преобладании цитокининов в питательной среде [1]. Для *B.sarmatica* оказалось достаточным использование только цитокинина. Аналогичные результаты получены нами и для других представителей семейства Нуасинтацевые из нашей коллекции (данные не опубликованы). В то же время БАП оказывал на процесс регенерации двойное действие. На начальных стадиях культивирования БАП в концентрации 1 мг/л стимулировал индукцию адвентивных почек, однако тормозил их дальнейшее развитие. Поэтому после формирования адвентивных почек экспланты переносили на среды, в которых концентрацию БАП снижали до 0,2 мг/л, где происходило дальнейшее развитие растений (Рис. 1Б). По мере их роста образовавшиеся кластеры разделяли и переносили поодиночке на безгормональную среду В₅ для укоренения. Эффективность укоренения была близка к 100%. Каждая луковица формировала 2-3 листа и мощные корни длиной 10-15 см.

По данным литературы, на морфогенетическую активность в культуре *in vitro* влияет целый ряд факторов. Один из них – тип экспланта. Эффективным для представителей семейств лилейных и гиацинтовых оказалось использование чешуек луковиц, базальных частей листьев, сегментов цветоноса и некоторых других [2, 6, 7]. В работе [8] по разработке методов размножения *Allium sativum* в качестве эксплантов использовали кончики корней, что значительно повышало регенерационный потенциал по сравнению с другими типами эксплантов. Есть данные о том, что мультипликация путём индукции адвентивных побегов в

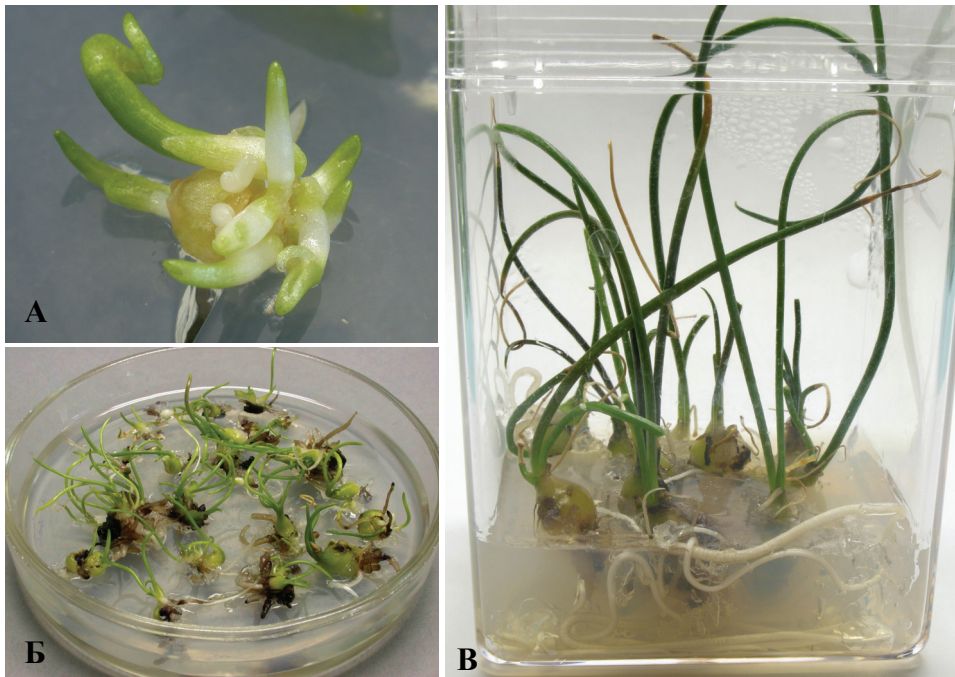


Рис. 1. Размножение *Bellevalia sarmatica* в культуре *in vitro*.

- А – формирование адвентивных побегов в базальной части луковиц на среде с 1 мг/л БАП;
 Б – массовое развитие луковиц на среде, содержащей 0,2 мг/л БАП;
 В – укоренённые растения, готовые к высадке в почву.

эксплантах разного типа (основания листьев, чешуйки или почки) даёт больше побегов, чем развитие меристематических зон в базальной пластинке [7]. В наших экспериментах не удалось индуцировать регенерацию *B.sarmatica* из корневых эксплантов на питательных средах с БАП, как это было сделано при использовании базальных частей луковиц, однако фрагменты корней оказались оптимальными эксплантами для индукции каллусных линий на средах с ауксинами и цитокининами. Полученные каллусные линии могут быть использованы как исходный материал для изучения возможности непрямого регенерации *B.sarmatica*. Тип морфогенеза (прямой или непрямого, органогенез или соматический эмбриогенез) также непосредственно влияет на эффективность размножения *in vitro*. Как известно, регенерация путём соматического эмбриогенеза имеет ряд преимуществ по сравнению с органогенезом для крупномасштабного и быстрого размножения растений, в частности, позволяет значительно увеличить коэффициент размножения. В работе [5] по размножению *Lilium testaceum* регенерацию индуцировали как из чешуек луковиц, так и через каллус. Масштаб размножения был выше при использовании каллуса, однако регенерация из чешуек происходила за более короткие сроки. Кроме того, прямая регенерация всегда предпочтительнее в тех случаях, когда необходимо сохранить генетический статус размножаемого растительного материала.

Результаты, полученные нами по размножению *Bellevalia sarmatica* в культуре *in vitro*, носят предварительный характер. Дальнейшая отработка технологии должна быть направлена на повышение её эффективности, что включает подбор факторов, позволяющих увеличить коэффициент размножения, сократить сроки работы, отработать методы адаптации и переноса в грунт. Вместе с тем разработанный метод является воспроизводимой и эффективной системой поддержания этого охраняемого вида растений в коллекции культур *in vitro*. Кроме того, наличие разработанной системы регенерации является одной из важных предпосылок применения биотехнологических методов для возможного дальнейшего использования данного вида в декоративном цветоводстве.

Выводы

Прорастание семян *Bellevalia sarmatica* в условиях *in vitro* происходило без применения стратификации с эффективностью 46%. Массовое формирование адвентивных побегов индуцируется на среде Гамборга В₅, содержащей 0,2-1 мг/л БАП, при использовании качестве эксплантов базальных частей чешуек луковиц, с последующим развитием и укоренением растений на безгормональной среде.

Работа выполнялась в рамках проекта по поддержанию объекта национального научного достояния Украины "Коллекция зародышевой плазмы растений флоры Украины и мировой флоры".

Литература

1. E.F.George, M.A.Hall, G.-J. De Klerk (eds.) Plant propagation by tissue culture. The 3rd edition. Volume 1. The background. // Springer. – 2008. - 501 p.
2. Кушнір Г.П., Сарнацька В.В. Мікроклональне розмноження рослин // Київ, "Наукова думка". – 2005. – 270 с.
3. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры. // Цитология и генетика. – 2005. - №14. - с. 41-51.
4. Akutsu M., Sato H. Induction of proembryos in liquid culture increases the efficiency of plant regeneration from *Alstoemeria* calli. // Plant Science. – 2002. – v. 163. – p. 475-479.
5. Wozniowski T., Blaschek W., Franz G. *In vitro* propagation of *Lilium testaceum* and structural investigation of the storage β -1,4-glucomannan // Plant Cell Reports. – 1991. - v. 10. – p. 457-460.
6. Pandey R., Chandel K.P.S., Rao S.R. *In vitro* propagation of *Allium tuberosum* Rottl. ex. Spreng. by shoot proliferation // Plant Cell Reports. – 1992. - v.11. – p.375-378.
7. Selles M., Viladomat F., Bastida J., Codina C. Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids // Plant Cell Reports. – 1999. - v. 18, № 7/8. – p. 646-651.
8. Robledo-Paz A., Villalobos-Arambula R., Jofre-Carfias A.E. Efficient plant regeneration of garlic (*Allium sativum* L.) by root-tip culture // In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. – 2000. - v. 36. - p. 416-419.

Резюме

Разработан метод размножения *in vitro* растений охраняемого вида *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow (Hyacinthaceae) путём индукции адвентивных побегов в эксплантах базальных частей чешуек луковиц, полученных в результате асептического проращивания семян.

Розроблено метод розмноження *in vitro* рослин *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow (Hyacinthaceae), що охороняється, шляхом індукції адвентивних пагонів в експлантів базальних частин лусок цибулин, отриманих після асептичного пророщування насіння.

Method of *in vitro* propagation of endangered species *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow (Hyacinthaceae) has been elaborated via adventitious bulblet formation at the basal parts of the bulb scales.

БІЛИНСЬКА О.В., КУЩЕНКО О.О.

Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва Української академії аграрних наук Україна, 61060, Харків, проспект Московський, 142, e-mail: bilinska@ukr.net

ВПЛИВ ГАМЕТНОГО ДОБОРУ У КУЛЬТУРІ ПИЛЯКІВ IN VITRO НА МІНЛИВІСТЬ ОЗНАК ПРОДУКТИВНОСТІ ЛІНІЙ ПОДВОЄНИХ ГАПЛОЇДІВ ЯРОГО ЯЧМЕНЮ

Методи експериментальної гаплоїдії приваблюють можливістю швидкого отримання гомозиготних рекомбінантів, за рахунок чого досягається істотне (на 4–5 років) прискорення селекційного процесу [1, 2]. Окрім цього, відомо, що механізм утворення гаплоїдів *per se*, особливо в умовах штучного клімату, може нівелювати дію природного добору і створювати передумови для виникнення рослин-носіїв рідкісних цінних рекомбінацій [3]. Разом з тим, накопичено значний обсяг даних щодо відхилення від теоретично очікуваного розщеплення