

**УДК 581.143.6**

Т.В. ПОЛУБОЯРОВА, кандидат биологических наук; Т.И. НОВИКОВА, доктор биологических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный Сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск, Россия

**КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ДЕКОРАТИВНЫХ ЛУКОВ ПОДРОДА *MELANOCROMMYUM* ИЗ ОРГАНОВ ЦВЕТКА**

Исследован морфогенный потенциал *in vitro* флоральных эксплантов (фрагментов оснований соцветий, бутонов и зрелых цветков) *Allium giganteum* Regel и *A. altissimum* Regel. Наиболее эффективная регенерация адвентивных побегов получена из бутонов среднего яруса закрытого соцветия с использованием среды BDS, дополненной 2 мг/л БАП и 2 мг/л НУК для *A. altissimum* и 1 мг/л БАП и 1 мг/л НУК для *A. giganteum*. Культивирование *in vitro* ускоряет развитие луков.

**Ключевые слова:** морфогенный потенциал, *Allium giganteum*, *A. altissimum*, клональное микроразмножение, условия *ex vitro*.

**Введение**

Дикорастущие виды подрода *Melanocrommyum* Webb et Berth. рода *Allium* L., известны своими высокими декоративными качествами, позволяющими использовать их в ландшафтном дизайне и флористике. Луки гигантский (*A. giganteum* Regel) и высочайший (*A. altissimum* Regel), относящиеся к анзурам или горным лукам, являются эндемиками Средней Азии и нуждаются в охране [5]. Разрабатываемые технологии клонального микроразмножения позволяют решить проблему массового воспроизведения востребованных в декоративном садоводстве видов. Они базируются в основном на использовании в качестве эксплантов фрагментов луковиц [1, 3]. Регенерационный потенциал таких эксплантов в культуре *in vitro* невысок и варьирует в зависимости от вида [4]. Кроме того, использование подземных органов часто сопряжено с сильной контаминацией и ведет к гибели материнских растений, что нежелательно для сохранения эндемичных и редких видов.

В последние годы для микроразмножения ряда геофитов в качестве эксплантов успешно используются органы цветка [9, 10]. Целью настоящего исследования являлась разработка технологий клонального микроразмножения *A. giganteum* и *A. altissimum* из флоральных эксплантов.

**Объекты и методы исследования**

В качестве объектов исследования использовали растения *A. giganteum* и *A. altissimum* из коллекции лаборатории Гербария ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск). Исходными эксплантами послужили соцветия, изолированные за 1-2 дня до раскрытия покрывала. Для введения в культуру соцветия стерилизовали двумя способами: погружение в 70% этиловый спирт на 30 сек. и последующий обжиг над пламенем спиртовки или стерилизация в 70% этиловом спирте (30 сек.), затем в течение 7-9 минут в 0,2%-ном растворе хлорида ртути (II) и последующее промывание (3-4 раза) в стерильной дистиллированной воде.

После стерилизации покрывало снимали и срезали бутоны, разделяя их на группы в соответствии с положением в соцветии. Также в качестве эксплантов использовали фрагменты основания соцветия и распустившиеся цветки верхнего яруса. Экспланты помещали на питательную среду BDS [6], дополненную регуляторами роста БАП (6-бензиламинопурином), КН (кинетином), НУК (α-нафтилуксусной кислотой) в

различных концентрациях и комбинациях. Затем экспланты переносили на среду для дифференциации побегов BDS, дополненную ТП (триапентинолом) в концентрации 2,0 мг/л. Для укоренения использовали BDS, содержащую 50 г/л сахарозы, 2 г/л активированного угля и 1 мг/л ИМК (индолилмасляной кислоты).

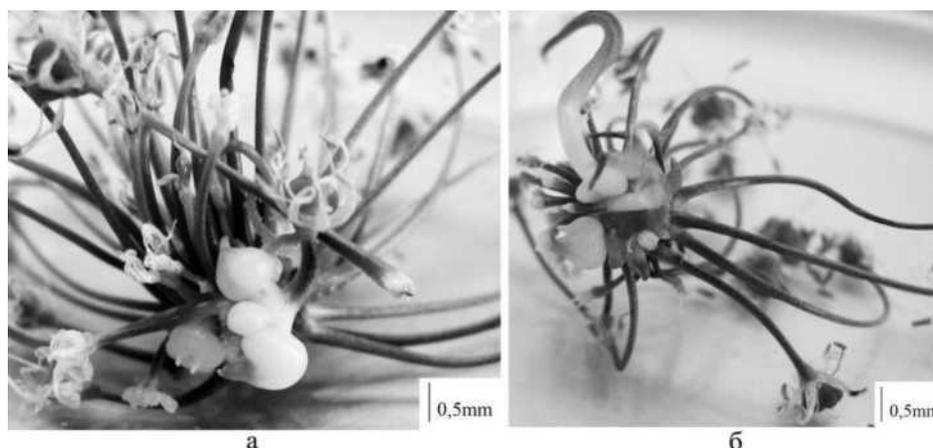
Условия культивирования:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  при 16/8 ч. фотопериоде и освещении холодно-белыми флуоресцентными лампами 4000 лк. Опыты проводили в трехкратной повторности. Статистическая обработка данных проводилась по стандартным методикам [2].

### Результаты и обсуждение

По нашим данным, при обжиге соцветий изучаемых видов цветки, находящиеся близко под покрывалом, частично обгорали, что приводило к потере эксплантов. Использование второго способа стерилизации с последовательным применением в качестве стерилизаторов растворов этанола и хлорида ртути (II) наиболее эффективно: выход асептических эксплантов составил 100%.

После стерилизации закрытых соцветий *A. giganteum* и *A. altissimum* с них снимали покрывало. Затем основание соцветий разрезали на 4 части и полученные фрагменты, используемые в качестве эксплантов, помещали на среды BDS без регуляторов роста (контроль) и дополненные регуляторами роста в различных комбинациях и концентрациях: 1-2 мг/л БАП и 1-2 мг/л НУК; 1-3 мг/л КН и 1-2 мг/л НУК; 1-3 мг/л КН. На среде без регуляторов роста не отмечено морфогенного ответа - экспланты исследуемых видов темнели и не развивались. На средах с регуляторами роста уже через две недели у фрагментов оснований соцветий лука высочайшего отмечено появление почек, из которых через 5-6 недель формировались луковички-детки (рис. 1 а, б). Далее луковички изолировали и высаживали на среду BDS, дополненную 1 мг/л ТП. Наибольшее количество луковичек, в среднем 8 шт., образовывалось на среде с БАП и НУК в равных концентрациях. На среде с добавлением КН в испытанных концентрациях наблюдали образование морфогенного и неморфогенного каллусов.

У фрагментов оснований соцветий лука гигантского на используемых средах морфогенных реакций не выявлено.



**Рис. 1. Формирование луковичек-деток из фрагментов основания соцветий *A. altissimum* на средах BDS, дополненных а) БАП 1 мг/л; б) КН 3 мг/л.**

В качестве следующего типа экспланта использовали бутоны луков-анзуров на разных стадиях развития, извлеченные из закрытого покрывалом соцветия. Поскольку у исследуемых видов наблюдается ярусная разновозрастность цветков, особенно у *A. altissimum*, нами визуально выделено три яруса: верхний, средний и нижний. После

стерилизации бутоны изолировали из разных ярусов соцветий и помещали на питательные среды, содержащие цитокинины и ауксины в различных концентрациях и комбинациях (табл.).

В культуре *in vitro* цветки *A. altissimum* распускались в зависимости от их положения в соцветии: из бутонов верхнего яруса - через 3-4 дня, из бутонов среднего яруса - через 7-8 дней, и, в единичных случаях, из бутонов нижнего яруса - через 9-10 дней. Характерно, что в условиях культуры листочки раскрывшихся околоцветников у *A. altissimum* и *A. giganteum* приобретали свойственную видам фиолетовую окраску. У цветков верхнего яруса значительно удлинялись тычиночные нити, вынося пыльники выше листочков околоцветника, в отличие от цветков среднего яруса, у которых тычинки оставались сравнительно короткими. Большая часть бутонов нижнего яруса после помещения на питательную среду оставалась без изменений.

Через две-три недели культивирования бутонов на питательной среде BDS с регуляторами роста наблюдали: разрастание тканей в нижней части цветка в области срастания тычинок и листочков околоцветника и формирование почек. Следует заметить, что у *A. giganteum* эту морфогенетическую реакцию наблюдали на некоторых средах на 4-7 дней позже, чем у *A. altissimum* (табл.). У лука высочайшего в зоне срастания тычиночных нитей и листочков околоцветника уже через две недели культивирования сформировалось множество почек, а у лука гигантского отмечено только разрастание тканей (рис. 2, а, б)

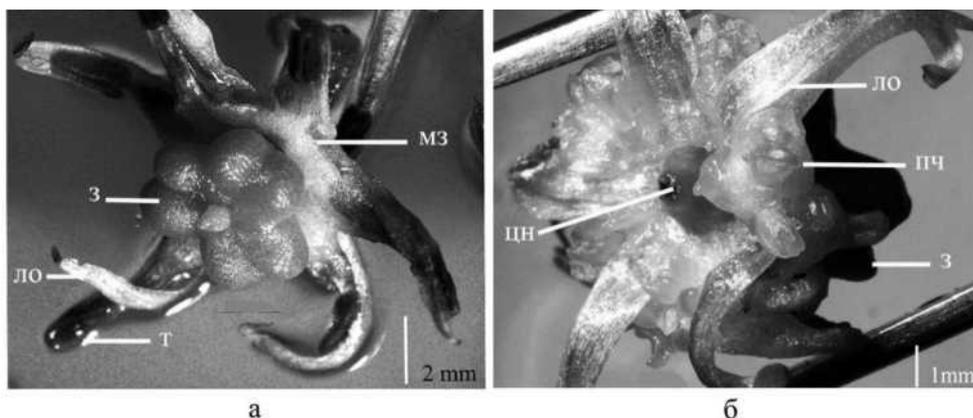
Таблица

**Влияние регуляторов роста на регенерацию побегов из бутонов луков на среде BDS**

Регуляторы роста	Происхождение экспланта	Количество побегов на эксплант	
		<i>A. altissimum</i>	<i>A. giganteum</i>
1	2	3	4
БАП 1 мг/л	Верхний ярус	0	0
	Средний ярус	2.30±0.33	0
	Нижний ярус	2.00±0.58	0
БАП 1 мг/л + НУК 1 мг/л	Верхний ярус	0.70±0.33	0
	Средний ярус	5.00±0.58	4.00±0.58
	Нижний ярус	2.70±0.88	1.00±0.58
БАП 1 мг/л + НУК 2 мг/л	Верхний ярус	1.00±0.58	1.70±0.33
	Средний ярус	6.00±0.58	2.70±0.33
	Нижний ярус	2.30±0.33	0
БАП 2 мг/л	Верхний ярус	2.00±1.00	0
	Средний ярус	4.70±0.88	0
	Нижний ярус	3.30±0.33	0
БАП 2 мг/л + НУК 1 мг/л	Верхний ярус	3.30±0.88	1.00±0.58
	Средний ярус	5.70±1.20	0
	Нижний ярус	5.60±0.88	0
БАП 2 мг/л + НУК 2 мг/л	Верхний ярус	3.70±1.33	0
	Средний ярус	8.30±0.33	0
	Нижний ярус	5.00±0.58	0
БАП 3 мг/л + НУК 1 мг/л	Верхний ярус	4.00±0.58	0
	Средний ярус	7.30±0.33	0
	Нижний ярус	6.00±0.58	0
БАП 3 мг/л + НУК 2 мг/л	Верхний ярус	3.00±0.58	0
	Средний ярус	7.70±0.67	0
	Нижний ярус	7.0±0.58	0

0 – морфогенез не наблюдали

При сравнении данных по влиянию регуляторов роста на индукцию адвентивного побегообразования исследуемых видов-анзуров через 4 недели культивирования следует отметить, что наиболее активно регенерация побегов происходила из бутонов среднего яруса (табл.). При этом отмечается видоспецифичность реакций на воздействие регуляторов роста, которые наиболее выражены у *A. altissimum*. Оптимальным вариантом оказалось использование БАП и НУК в равных концентрациях (2 мг/л). Морфогенетические реакции у *A. giganteum* выражены значительно слабее. Оптимальной комбинацией регуляторов роста из испытанных нами оказалась БАП и НУК в равных концентрациях (1 мг/л).



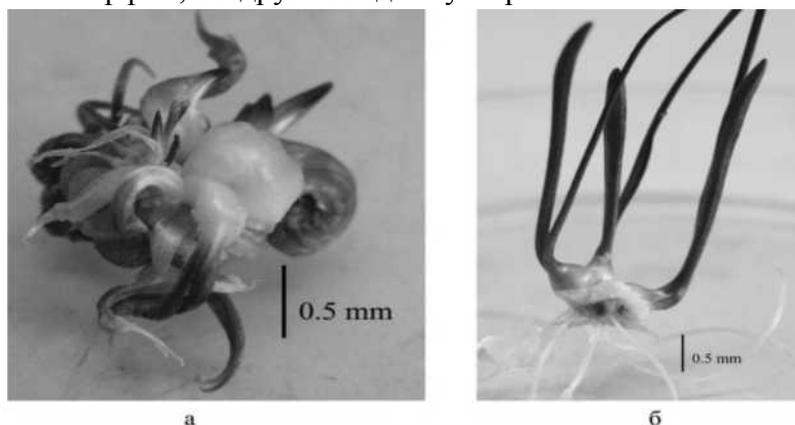
**Рис. 2. Бутоны среднего яруса соцветий: а) *A. giganteum* через 2 недели культивирования на среде BDS с 1 мг/л БАП и 1 мг/л НУК; б) *A. altissimum* через 2 недели культивирования на среде BDS с 2 мг/л БАП и 2 мг/л НУК.**

з – завязь, ло – листочек околоцветника, мз – меристематическая зона, пч – почка, т – тычинка, цн – цветоножка.

Пересадка эксплантов на среду для дифференциации побегов (BDS + 2.0 мг/л ТП) приводила к активному развитию сформировавшихся регенерантов и интенсивному росту их листьев. Через 9 недель культивирования при переносе на безгормональную среду, способствующую вытягиванию побегов, на одном экспланте наблюдали многочисленные, частично этиолированные побеги, находящиеся на разных стадиях развития, и формирование луковичек-деток (рис. 3, а).

Нами отмечено, что в конце второго месяца культивирования у регенерантов появился второй лист (рис. 3, б), в то время как в природных условиях у изучаемых луков он формируется на следующий год после посадки. Следовательно, введение в культуру *in vitro* ускоряет развитие луков, что имеет важное значение для интродукции этих высокодекоративных видов. Данные о возможности ускорения развития геофитов благодаря использованию биотехнологических подходов получены и при микроразмножении *Lilium auratum* [8].

Через 7-8 месяцев культивирования луковички, достигшие диаметра от 0,5 до 1,5 см, высаживали в условия *ex vitro* в различные типы субстратов: песок, мох, смесь песка и мха (1:1), смесь вермикулита с торфом (1:1). Нами отмечено, что луковички выживали только в смеси вермикулита с торфом, а в других видах субстратов погибали.



**Рис. 3. *A. altissimum* в культуре *in vitro*: а) формирование побегов после 9 недель культивирования; б) регенеранты перед перенесением в условия *ex vitro*.**

При использовании в качестве эксплантов распустившихся цветков верхнего яруса, изолированных из закрытого покрывалом соцветия, никаких морфогенных реакций на средах, аналогичных используемым для бутонов, не наблюдалось – ни увеличения размеров

органов, ни формирования каллуса или каких либо других структур. Следовательно, морфогенная активность флоральных органов изучаемых луков-анзуров сопряжена с фазой бутонизации, что согласуется с результатами, полученными при использовании бутонов в качестве эксплантов при размножении пищевых видов луков [7].

### Выводы

Использование флоральных эксплантов позволяет углубить представления о морфогенном потенциале *in vitro* тканей и органов цветка, преодолеть проблемы с контаминацией исходных эксплантов и сохранить материнские растения, что особенно важно при размножении редких и эндемичных видов. Проведенное исследование выявило, что наиболее компетентными к регенерации адвентивных побегов у исследованных видов оказались бутоны среднего яруса. Процесс органогенеза происходил прямым путем, минуя стадию каллусогенеза, посредством геммогенеза. Культивирование *in vitro* способствует ускорению онтогенетического развития луков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», проект №9.

### Список литературы

1. Байтулин И.О. Интродукция и морфогенез дикорастущих луков Казахстана / И.О. Байтулин, И.Р. Рахимбаев, И.И., И.И.Каменецкая. – Алма-Ата: Наука Казахской ССР, 1986. – 156 с.
2. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике / Г.Н. Зайцев. – М.: Наука, 1984. – 424 с.
3. Каменецкая И.И. Вегетативное размножение лука каратавского в культуре изолированных тканей / И.И.Каменецкая, И.Р.Рахимбаев // Бюллетень ГБС. – 1984. – Вып. 131. – С. 63-65.
4. Полубоярова Т.В. Действие регуляторов роста на размножение декоративных луков подрода *Melanocrommyum* в культуре *in vitro* / Т.В. Полубоярова, Т.И. Новикова // Научные ведомости БелГУ. – 2011. – Вып. 14/1, №3. – С. 304-308.
5. Юрьева Н.А. Многообразие луков и их использование / Н.А. Юрьева, В.А.Кокарева. – М.: Изд-во МСХА. – 1992. – 160 с.
6. Dunstan D.I. Shoot production from onion callus tissue culture / D.I. Dunstan, K.C. Short // *Sci Hortic.* – 1978. – V. 9. – P. 99-110.
7. Gantait S. An Overview on *in vitro* Culture of Genus *Allium* / S. Gantait, N. Mendal, P.K. Das // *Am. J. Plant Physiol.* – 2010. – V. 5. – P. 325-337.
8. Furyyuya T. Rapid production of *Lilium auratum* bulbs from zygotic embryos / T. Furyyuya, K. Nomura // *Asia Pacific J. Mol. Biol and Biotech.* – 2004. – V. 12. – P. 39-42.
9. Susek A. Factors affecting direct organogenesis from flower explants of *Allium giganteum* / A. Susek, B. Javornik, B. Bohanec // *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* – 2002. – V. 68. – P. 27-33.
10. Ziv M. Bud regeneration from inflorescence explants for rapid propagation of geophytes *in vitro* / M. Ziv, H. Lilien-Kipnis // *Plant Cell Report.* м 2000. – V. 19. – P. 845850.

Статья поступила в редакцию 06.03.2013 г.

T.V. POLUBOYAROVA, *PhD in Biology*; T.I. NOVIKOVA, *DrSc in Biology*  
Federal State Institution of Science Central Siberian Botanical Garden, Siberian Branch of the  
Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

### **CLONAL MICROPROPAGATION OF ORNAMENTAL ONIONS OF THE SUBGENUS MELANOCROMMIUM FROM FLOWER ORGANS**

*In vitro* morphogenetic potential of floral explants (parts of the inflorescence base, flower buds and mature flowers) of *Allium giganteum* Regel and *A. altissimum* Regel have been studied. The highest efficiency of adventitious shoot regeneration was obtained with flower buds formed in the middle layer of unopened inflorescence using BDS supplemented with 2.0 mg l<sup>-1</sup> BA and 2.0 mg l<sup>-1</sup>NAA for *A. altissimum* and 1.0 mg l<sup>-1</sup> BA and 1.0 mg l<sup>-1</sup>NAA for *A. giganteum*. *In vitro* cultivation has shortened the onion development time.

Т.В. ПОЛУБОЯРОВА, кандидат біологічних наук; Т.І. НОВІКОВА, доктор біологічних наук  
Федеральна державна бюджетна установа науки «Центральний Сибірський ботанічний сад  
Сибірського відділення РАН», м. Новосибірськ, Росія

### **КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ДЕКОРАТИВНЫХ ЦИБУЛЬ ПДРОДУ MELANOCROMMIUM З ОРГАНІВ КВІТКИ**

Досліджено морфогенний потенціал *in vitro* флоральних експлантів (фрагментів основ суцвіть, пуп'янків і зрілих квіток) *Allium giganteum* Regel і *A. altissimum* Regel. Найбільш ефективну регенерацію адвентивних пагонів отримано з пуп'янків середнього ярусу закритого суцвіття з використанням середовища BDS, доповненого 2 мг/л БАП і 2 мг/л НОК для *A. altissimum* та 1 мг/л БАП і 1 мг/л НОК для *A. giganteum*. Культивування *in vitro* пришвидшує розвиток цибуль.

Т.В. ПОЛУБОЯРОВА, кандидат биологических наук; Т.И. НОВИКОВА, доктор  
биологических наук  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Центральный Сибирский  
ботанический сад Сибирского отделения РАН», г. Новосибирск, Россия

### **КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ДЕКОРАТИВНЫХ ЛУКОВ ПОДРОДА MELANOCROMMIUM ИЗ ОРГАНОВ ЦВЕТКА**

Исследован морфогенный потенциал *in vitro* флоральных эксплантов (фрагментов оснований соцветий, бутонов и зрелых цветков) *Allium giganteum* Regel и *A. altissimum* Regel. Наиболее эффективная регенерация адвентивных побегов получена из бутонов среднего яруса закрытого соцветия с использованием среды BDS, дополненной 2 мг/л БАП и 2 мг/л НУК для *A. altissimum* и 1 мг/л БАП и 1 мг/л НУК для *A. giganteum*. Культивирование *in vitro* ускоряет развитие луков.