

## КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ГЛАДИОЛУСА ГИБРИДНОГО, ПОЗВОЛЯЮЩЕЕ МОДЕЛИРОВАТЬ ПРОЦЕССЫ СТАРЕНИЯ

И. И. АНДРЕЕВА, Н. В. КАТАЕВА, Д. Л. МАТЮХИН

(Кафедра ботаники)

Описан способ культивирования *in vitro* гладиолуса гибридного, разработанный на основе известных методов выращивания данной культуры. Он включает последовательное культивирование побегов на средах с регулятором роста бензиламинопурином и без него. Этот способ позволяет формировать и поддерживать клон за счет тех же структур, что и *in vivo* (почек возобновления клубнелуковиц). Полученные растения могут быть использованы для изучения старения клонов.

В настоящее время большой интерес исследователей вызывают процессы старения растений, в частности их вегетативного потомства, т. е. клонов. Выяснить, стареет ли клон, важно по двум основным причинам. Во-первых, для ответа на вопрос, возможно ли в принципе неограниченно долгое существование конкретной генетической системы, пусть даже в виде клона. Во-вторых, для установления длительности эффективного использования конкретного клона (сорта).

Мнения исследователей о старении клона расходятся. Одни считают, что клон не стареет, поскольку вегетативные потомки имеют те же признаки, что и молодые растения, выращенные из семян [6—8]. Другие придерживаются противоположной точки зрения, так как вегетативные потомки живут в основном меньше, а признаки старения проявляются у них раньше, чем у растений семенного происхождения [1, 5, 10].

Использование метода культивирования растений *in vitro* существенно облегчает изучение старения клонов. Экспериментатор получает возможность в строго контролируемых условиях оценить потенции изолированных из целого организма органа, ткани, клетки и изменить их структуру путем воздействия разнообразных факторов [4]. Уменьшается возмущающее влияние внешней среды, исключается опасность заражения патогенными микроорганизмами. Культивирования *in vitro* позволяет ускорить эксперимент, уве-

личивая темп вегетативного размножения.

Задачей настоящего исследования являлась разработка способа культивирования *in vitro* экплантатов гладиолуса гибридного, который позволил бы смоделировать формирование клона *in vivo*. Полученные таким способом клоны можно будет использовать для сравнительного изучения старения клонов *in vivo* и *in vitro*. Для этого необходимо было добиться увеличения абсолютного порядка побега, т. е. получить постоянное ветвление *in vitro*; увеличить порядок побегов за счет тех же почек, что и *in vivo* (1—2 верхние боковые почки вегетативной части побега); избежать возникновения в культуре *in vitro* аномальных структур, не встречающихся у растений *in vivo*.

Гладиолус гибридный был выбран в качестве объекта исследований по следующим причинам: 1) для культуры гладиолуса хорошо изучены возрастные изменения клона *in vivo* и убедительно показано его естественное старение [1—3]. Определена зависимость возрастных изменений от абсолютного порядка побега у растений семенного происхождения; 2) известен ряд способов клонального микроразмножения гладиолуса *in vitro*: методом активации уже заложённых побеговых меристем [11, 12] и методом индукции их образования из каллуса; 3) в онтогенезе гладиолуса имеется стадия покоя (клубнелуковица), что позволяет облегчить процесс адаптации к нестерильной культуре и дает

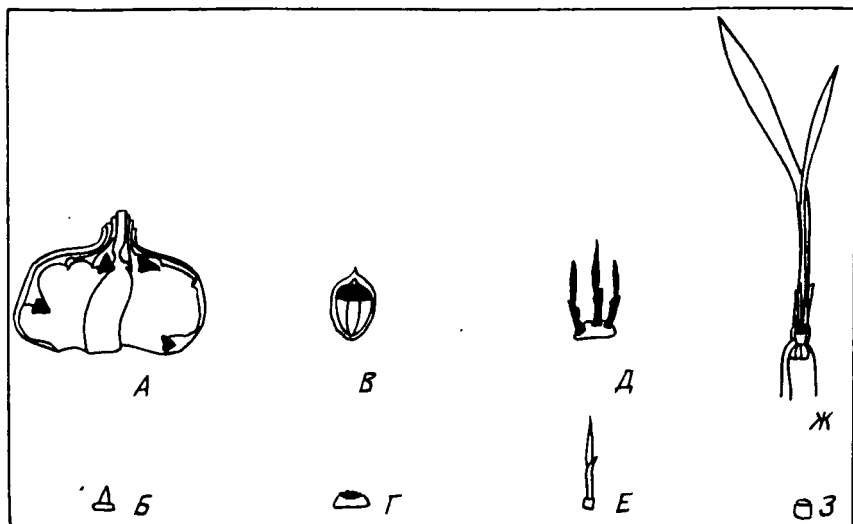


Рис. 1. Эксплантаты, использованные в опыте (Б, Г, Е, З), и их источники (А, В, Д, Ж, эксплантаты заштрихованы).

А — клубнелуковица; Б — почка возобновления клубнелуковицы; В — детка; Г — верхние узлы детки с почками; Д — часть стебля с пролиферирующими почками; Е — начавший рост побег; Ж — побег с листьями низовой и срединной формаций; З — верхние узлы стебля этого побега.

возможность описать все растения клона, не теряя их.

Исходным материалом служили клубнелуковицы и детки (клубнепочки) двух сортов гладиолуса гибридного разного возраста: Oscar (селекция 1958 г.) и Plum Tart (селекция 1976 г.) [9]. Клубнелуковицы и детки были получены из отдела цветоводства ГБС АН СССР и со станции цветоводства ТСХА. Все работы по культуре гладиолуса *in vitro* проводили в отделе биологии клетки и биотехнологии ИФР АН СССР.

Изолированные почки стерилизовали 30 с в 70 % этаноле и 15 мин в 1 % растворе диоксида, а затем трижды промывали стерильной дистиллированной водой (3, 15 и 15 мин). После стерилизации эксплантаты помещали на агаризованную среду

в пробирки 200×20 мм. На этапе введения в культуру *in vitro* эксплантаты представляли собой либо почки возобновления клубнелуковицы (рис. 1, А, Б), либо верхние части деток (1—2 метамера) с верхушечной и боковыми почками (рис. 1, В, Г). Всего было высажено 95 почек возобновления клубнелуковицы и 50 верхушек деток сорта Oscar, 82 почки возобновления клубнелуковицы и 2 верхушки деток сорта Plum Tart. При введении в культуру *in vitro* от инфекции погибло около 20 % первичных эксплантатов.

Основная среда культивирования имела следующий состав: соли по прописи Мурасиге и Скуга, инозит (100 мг/л), тиамин-хлорид (0,4 мг/л), пиридоксин-хлорид и никотиновая кислота (по 1,0 мг/л), сахароза

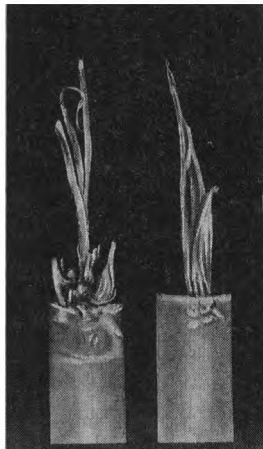
(30 г/л), агар (7 г/л). Для стимуляции роста эксплантатов в основную среду были добавлены (на 1 л) 0,5 мг бензиламинопурина (БАП) и 0,1 мг нафтилуксусной кислоты (НУК).

Растения в пробирках культивировали в камере фитотрона при температуре 25 °С, влажности 70 %, освещенности около 5000 лк и продолжительности светового дня 16 ч.

Для пассирования (в среднем через 4 нед) использовали либо начавшие рост побеги (рис. 1, Д, Е), либо 1—2 верхних метамера побега с верхушечной и боковыми почками (рис. 1, Ж, З).

Прорастание всех почек на основной среде с 0,5 мг БАП и 0,1 мг НУК на 1 л началось на 5—7-й день после посадки. Часть из них формировала побеги с зелеными листьями, как чешуевидными (низовая формация), так и типичными, с развитыми листовыми пластинками (срединная формация) (рис. 2). Остальные почки (62,1 %) лишь

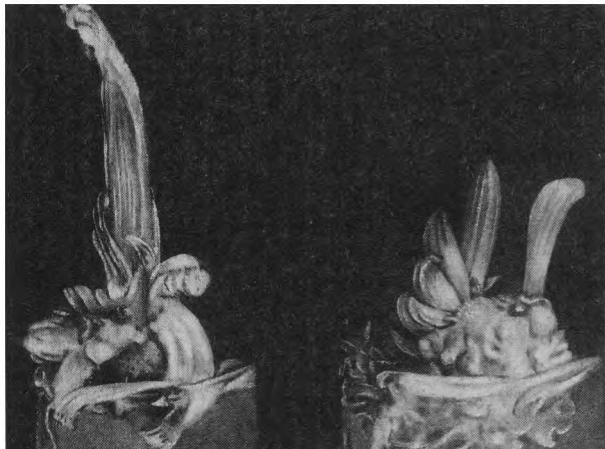
Рис. 2. Побег с листьями низовой и срединной формаций.



увеличивались в размерах и состояли из укороченного стебля и чешуевидных листьев без листовых пластинок (рис. 3). Впоследствии в культуре *in vitro* образовывались только укороченные вегетативные побеги. Через 3—5 нед культивирования на побегах обеих групп начали появляться структуры, несвойственные гладиолусу *in vivo*: каллус (формировался на погруженных в субстрат частях эксплантата), адвентивные почки (формировались на каллусе и на стебле, но не в пазухах листьев) и группы коллатеральных (т. е. расположенные бок о бок в пазухе одного листа) почек. Типичные же одиночные пазушные почки при этом не образовывались. Чтобы избежать появления аномалий, нами было испытано несколько вариантов сред, контрастных по содержанию регуляторов роста.

При культивировании побегов на основной среде с добавлением 0,01 мг БАП и 0,1 мг НУК на

Рис. 3. Побег с листьями только низовой формации.



1 л наблюдались интенсивный рост каллуса и дифференциация адвентивных почек. На погруженных в субстрат частях стебля образовывались корни, диаметр которых был в 2,5—3 раза больше, чем в других вариантах нашего опыта. Одновременно угнеталось развитие верхушечной почки культивируемого побега. Через 2 мес у 63,2 % побегов рост и образование пазушных почек полностью прекратились, формировался только каллус.

Использование для выращивания побегов основной среды без инозита, содержащей (на 1 л) 0,5 мг гибберелловой кислоты, 0,5 мг БАП, 0,1 мг НУК и 10 г сахарозы приводило к сильному угнетению эксплантатов, полной остановке роста, частичной витрификации. Через 2 мес 59,5 % побегов погибло.

Внесение на 1 л основной среды 0,1, 0,2, 0,5 и 5,0 мг БАП способствовало образованию через 2—4 нед коллатеральных почек в пазухах всех листьев побега; листья не имели листовых пластинок и часто были скрученными. Одновременно с развитием коллатеральных почек происходило угнетение верхушечной почки. Через 2 мес в группе сформировавшихся равновеликих побегов невозможно было выделить по мощности побег, выросший из верхушечной почки. Одиночные боковые побеги не развивались. На средах, содержащих только БАП, каллус и адвентивные почки образовывались редко — у 6,3—10,2 % побегов.

При культивировании эксплантатов на основной среде без

регуляторов роста развивались побеги с чешуевидными и типичными листьями. Через 1—3 нед на погруженных в среду частях стебля образовывались корни, похожие на питающие корни растений гладиолуса *in vivo*. Ветвление, а следовательно, и увеличение абсолютного порядка побегов наблюдалось только после формирования у исходного побега клубнелуковиц и происходило за счет почек его основания. При этом в пазухах 1—2-го нижних листьев (либо низовой формации, либо срединной, но без листовых пластинок, удаленных при пассировании) образовывались или одиночные побеги, или коллатеральные группы побегов (подобные группам деток *in vivo*). Эти боковые побеги имели обычно по одному листу низовой и срединной формаций. Впоследствии междуузлие между листьями разрасталось и формировалась боковая клубнелуковица. Для получения побега следующего порядка на среде без регуляторов роста требовалось 3,5—4 мес.

Ни один из испробованных вариантов сред в отдельности не давал желаемого результата — длительного культивирования *in vitro* побегов, сохраняющих нормальный морфогенез, и увеличения абсолютного порядка побегов в результате ветвления за счет одиночных пазушных почек верхней части побега.

В связи с этим мы отказались от культивирования побегов гладиолуса на среде одного состава и применили схему с чередованием сред (рис. 4).

Исходный эксплантат (рис. 4, А), взятый у культивируемого

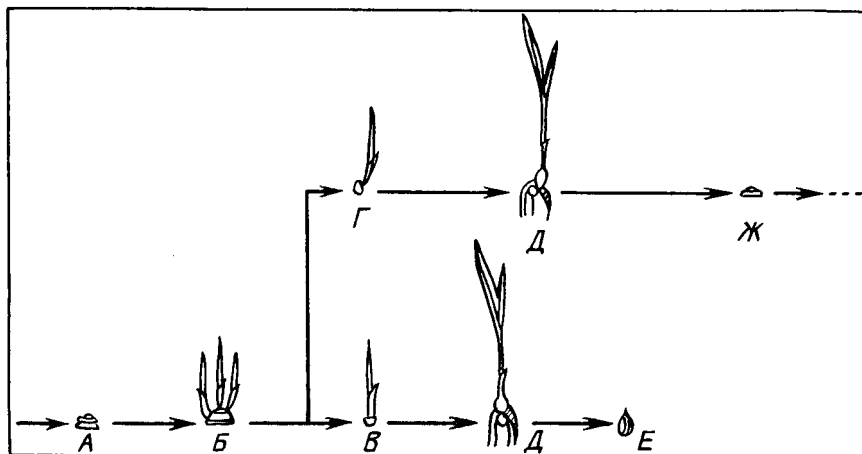


Рис. 4. Схема культивирования *in vitro* побегов гладиолуса, позволяющего моделировать естественное формирование клона (экспликация в тексте).

*in vitro* побега и представляющий собой 1—2 верхних метамера побега с верхушечной и боковыми почками, пересаживали на основную среду с 0,2 мг БАП на 1 л. Через 2—4 недели начиналась пролиферация почек в побеги (рис. 4, Б). Эти побеги при достижении ими длины 15—25 мм разделяли и пересаживали на основную среду без регуляторов роста (рис. 4, В, Г). Здесь они формировали листья низовой и срединной формации и укоренялись (рис. 4, Д). На этой стадии побеги состояли из 5—6 (до 8) метамеров, 2 из которых принадлежали исходному эксплантату, имели 1—3 листа низовой формации и 2—4 листа срединной формации. Корни (обычно 5—6), морфологически сходные с питающими корнями растений *in vivo*, образовывались на исходном эксплантате. Одновременно начиналось утолщение стебля (1—3 метамеров) и формировались одиночные пазушные почки. При

этом побег, выросший из верхушечной почки (рис. 4, В) и имевший тот же абсолютный порядок, что и исходный побег (эксплантат), оставался на среде без регуляторов роста вплоть до формирования через 2—3 мес покоящейся клубнелуковицы (рис. 4, Е), которую можно либо высаживать в грунт для последующего изучения ее развития традиционными методами, либо использовать как источник эксплантатов для культуры *in vitro*. Формированию клубнелуковицы обычно предшествовало появление 2—3 корней, морфологически сходных с контрактильными на клубнелуковице вновь образовавшегося побега. Размеры полученных клубнелуковиц приведены в таблице. Побеги, образовавшиеся из боковых почек эксплантата (рис. 4, Г), абсолютный порядок которых был на единицу больше, чем исходного побега, развивались аналогично. Через 4 нед культивирования верхушки этих побегов исполь-

Параметры полученных клубнелуковиц

Параметр	Oscar		Plum Tart	
	M±m <sub>M</sub>	Lim	M±m <sub>M</sub>	Lim
Диаметр, мм	7,0±0,26	5,0±9,0	8,0±0,30	4,5±12,0
Высота, мм	7,0±0,26	5,0±10,0	8,5±0,30	6,0±11,0
Отношение высоты к диаметру	1,0±0,034	0,8±1,2	1,1±0,035	0,7±1,5

зовали в качестве исходных эксплантатов для следующего цикла (рис. 4, Ж).

Чередование среды, содержащей БАП, и среды без регуляторов роста позволило, с одной стороны, практически подавить образование каллуса, адвентивных и коллатеральных почек, а с другой стороны — добиться ветвления побегов за счет почек возобновления клубнелуковицы. Таким образом, увеличение абсолютного порядка побега происходит *in vitro* за счет тех же структур, что и *in vivo*, и полученный по этой методике клон можно сравнивать с естественными клонами.

#### Заключение

В результате проведенной работы подобран оптимальный режим культивирования гладиолуса гибридного для получения растений с известным относительно исходного порядком побега, заключающийся в чередовании культивирования побегов на среде, содержащей 0,2 мг БАП на 1 л, и на среде без регуляторов роста.

Чередование сред позволило предотвратить образование аномальных структур и добиться ветвления за счет одиночных пазушных почек, т. е. создать клон, аналогичный естественному. Это дает возможность в относитель-

но короткий срок получить побеги высокого порядка, которые можно использовать как материал для сравнительного изучения старения клонов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Андреева И. И. Возрастные изменения в жизненном цикле шпажника гибридного *Gladiolus hybridus hort.* (Iridaceae).— Изв. ТСХА, 1980, вып. 1, с. 48—55.— 2. Андреева И. И. Особенности структуры побегов шпажника гибридного (*Gladiolus hybridus hort.*), развивающихся из деток разных порядков.— Изв. ТСХА, 1981, вып. 5, с. 34—39.— 3. Андреева И. И. Основы рационального выращивания и размножения шпажника гибридного.— Бюл. ГБС, 1984, вып. 131, с. 71—75.— 4. Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений.— М.: Наука, 1964.— 5. Гупало П. И. Возрастные изменения растений и их значение в растениеводстве.— М.: Наука, 1969.— 6. Дубровицкая Н. И. Регенерация и возрастная изменчивость растений.— М.: Изд-во АН СССР, 1961.— 7. Кренке Н. П. Теория циклического старения и омоложения растений и ее практическое применение.— М.: Сельхозгиз, 1940.— 8. Смирнова О. В., Кагарлицкая Л. О. О двух типах жизненного цикла *Viola mirabilis* L.— Ботан. журн., 1972, т. 57, № 5, с. 481—492.— 9. Сорты гладиолуса зарубежной селекции (источники и доноры полезных признаков) / Сост. Т. Г. Тамберг.— Л., 1983. (Каталог мировой коллекции ВИР; Вып. 387).— 10. Юсуфов А. Г. Регенерация высших растений.— М.: Знание, 1981.— 11. Dantu P. K., Bhojwani S. S.— Gartenbauwissenschaft, 1987, Bd. 52, N 2, S. 90—93.— 12. Hussey G.— Scientia Hortic, 1977, vol. 6, p. 287—296.