

УДК 634.75:631.533:631.547.2

**АНАТОМО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ
РАЗВИТИЯ МИКРОЧЕРЕНКОВ ЗЕМЛЯНИКИ
В КУЛЬТУРЕ IN VITRO**

В.В.ФАУСТОВ, О.О.БЕЛОШАПКИНА

(Кафедра плодоводства)

Проводились исследования анатомического строения микрорастений земляники сорта Зенит, размножаемых на искусственной питательной среде в стерильных условиях методом апикальных меристем, и изучение направленности органогенных процессов, приводящих к образованию из изолированных апикальных меристем целостных растительных организмов. Как и в случае размножения зеленых черенков, у верхушечных микрочеренков земляники формирование надземной части базируется на митотической активности апикальной меристемы. В процессе укоренения микрочеренков происходит структурная перестройка работы веретеновидных и лучевых инициалий камбия с преимущественной паренхиматизацией вторичной ксилемы в зоне широких сердцевинных лучей. Направленность органогенетического развития корней растений при микроклональном размножении та же, что и при зеленом черенковании.

Важным элементом современной технологии возделывания земляники является микроклональное ее размножение *in vitro*, применяемое на ранних этапах производства здорового посадочного материала, а также для интенсификации селекционной работы [2, 3].

Для увеличения коэффициента размножения земляники проводят 2—3-кратное пассажирование эксплантов на питательной среде с цитокинином (6-бензиламинопурином), в результате чего закладывается большое количество пазушных почек, которые пробуждаются, и на их основе формируются боковые побеги. При переносе их на среду укоренения (содержащую ИМК или ИУК) такие побеги формируют корни. В случае с земляникой корни могут часто образовываться на среде и без добавления ауксиновых регуляторов роста.

Восстановление целостного растительного организма протекает на базе репродуктивной регенерации, а это, в свою очередь, обуславливает морфолого-физиологическое сходство восстановительных процессов и соответственно новообразованных структур и органов. Филлогенетически такое сходство объясняется гомологией и однонаправленным становлением у высших растений основных вегетативных органов из теломов прародительских форм [5, 6].

Генетическая стабильность получаемого таким образом посадочного материала базируется на митотической активности апекса микропобега и функциональной

работе камбия, а направленность органогенного развития побегов и корней регулируется экзогенными фитогормонами [1].

Данные об анатомическом строении микрочеренков земляники на среде размножения и придаточном ризогенезе у микрорастений на среде укоренения являются дополняющим звеном в цепи знаний о направленности органогенных процессов, приводящих к образованию из изолированных апикальных меристем целостных растительных организмов.

Методика

Исследования проводили в 1991—1993 гг. на кафедре плодоводства Тимирязевской академии, используя растительный материал земляники, полученный в лаборатории плодоводства на базе Плодовой опытной станции.

Объектами исследований являлись однолетние растения земляники сорта Зенит, из которых выделяли верхушечные меристемы рожков и культивировали их *in vitro*. Среда размножения содержала макро- и микросоли по Мурасиге — Скугу, витамины (тиамин, пиридоксин, аскорбиновую и никотиновую кислоты), 5 г агар-агара, 30 г сахарозы и 0,5—1 мг 6 БАП на 1 л. Среда для укоренения также была составлена по прописям Мурасиге — Скуга и содержала то же количество агара, витаминов, 25 г сахарозы на 1 л, но вместо 6 БАП в нее вводили 0,5—1 мг ИУК или ИМК на 1 л. Для гистологических исследований использовали экспланты на разных стадиях развития *in vitro*, а так-

же сформированные микрорастения. Анатомические исследования растительного материала проводили на фиксированных в 70—75% этиловом спирте образцах с последующим добавлением глицерина из расчета 5—10% к объему фиксатора. Поперечные и продольные срезы выполняли опасной бритвой на ручном микротоме. Препараты изучали с помощью бинокулярного микроскопа МБИ-3. Мацерацию растительных тканей проводили в смеси азотной кислоты с бертолетовой солью [4]. Для измерения размеров структурных элементов ксилемы использовали окуляр- и объект микрометры по рекомендациям А.А.Яценко-Хмелевского [7]. Ткани окрашивали гематоксилином по Делафильду или флороглюцином с соляной кислотой.

Результаты

При микрклональном размножении на искусственных питательных средах в качестве эксплантов, как правило, используют верхушечную часть рожка или боковой почки с апикальной меристемой длиной 300—500 мкм.

Обычно выделяют 3 периода в процессе микрклонального размножения верхушечными меристемами: введение эксплантов в культуру и их развитие на искусственных питательных средах; пролиферация эксплантов — формирование конгломерата боковых и пазушных почек; укоренение выросших микроробегов.

У микроробегов, а также сформировавшихся впоследствии микрорастений земляники сорта Зенит (и согласно нашим наблюде-

ниям, у большинства других сортов этой культуры) формируются листья разной формации — простые и сложные (рис.1). Это свидетельствует, по-видимому, о том, что формирование микроробегов простыми листьями, состоящих из черешка и одной листовой пластинки, связано с процессом ювенилизации микрорастений. Аналогичные ювенильные растения семенного происхождения имеют, как правило, первые листья только простые.

Представляет интерес более детальное изучение особенностей анатомического строения рожков микрорастений. Схематично анатомическое строение верхней части укороченного побега представлено на рис.2. Верхушечная почка такого побега закрытая, она защищена листьями нижней формации и сросшимися прилистниками сложных листьев срединной формации. Кроме этого, почка обильно опушена одноклеточными сильно вытянутыми в длину волосками, которые также, вероятно, играют защитную роль. Сама меристематическая часть почки структурно оформлена по типу туники-корпуса. с четырехслойной туникой. На продольных разрезах можно видеть примордиальные листья, почки и группы инициальных клеток верхушечной меристемы пазушных (боковых, или аксиллярных) почек, что свидетельствует о симподиальном характере бокового типа ветвления таких укороченных побегов. Между флоэмой и ксилемой при первичном строении имеется прокамбий, переходящий при вторичном строении в камбий.

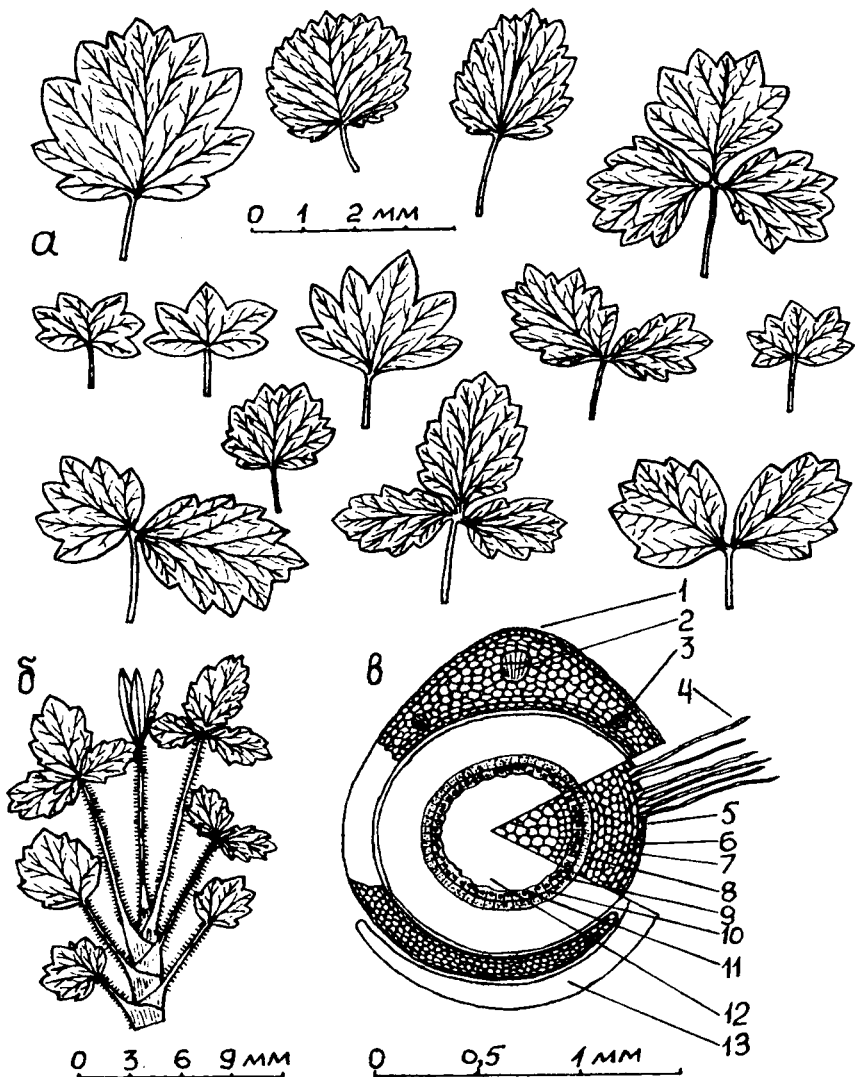


Рис. 1. Разнообразие листовых пластинок на побегах земляники ананасной в пределах одного конгломерата (а) и микропобегов (б), схема присоединения основания черешка листа верхней части стебля микропобега (в, поперечный разрез, $\times 20$) при размножении земляники на искусственной питательной среде методом изолированных верхушечных меристем:

1 — нижняя часть черешка листа с приросшими двумя прилистниками, окружающими стебель в виде раструба; 2 и 3 — соответственно медианный и латеральные листовые следы (коллатеральные открытые проводящие пучки листа); 4 — одноклеточные эпидермальные волоски; 5 — эндермис с кутикулой; 6 — двухслойная колленхима стебля; 7 — паренхима первичной коры; 8 — перичикл, дифференцирующийся в первичную склеренхиму; 9 — первичная флоэма; 10 — прокамбий; 11 — первичная ксилема; 12 — сердцевинная паренхима с перимедулярной зоной, примыкающей к ксилеме стебля; 13 — прилистник.

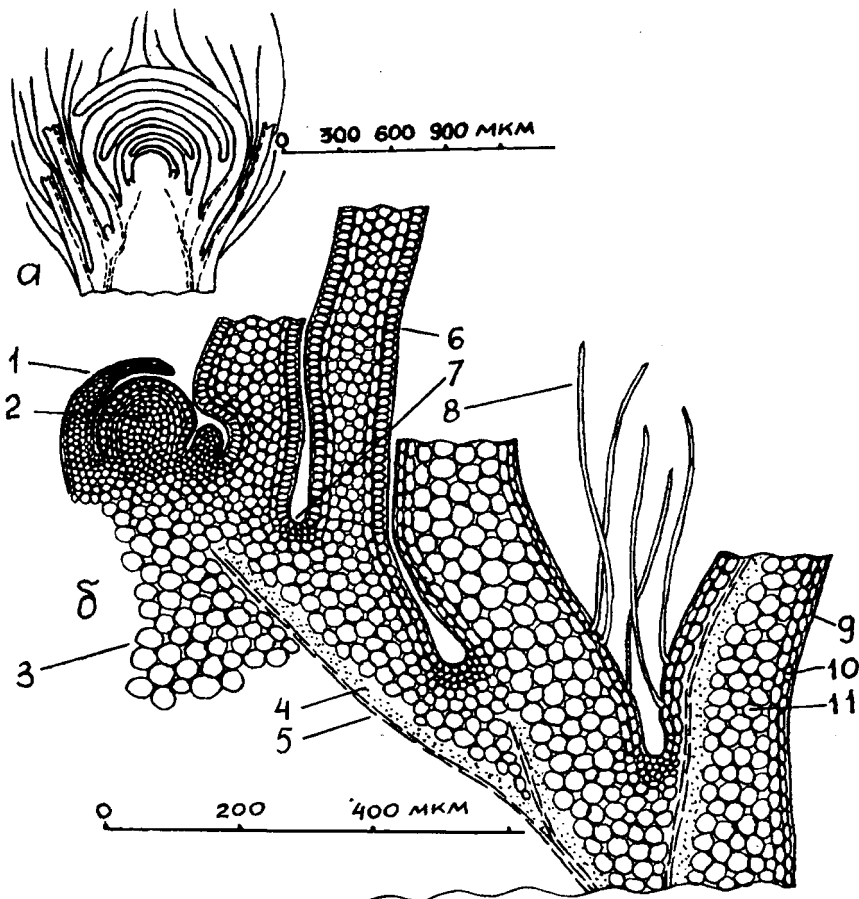


Рис. 2. Продольный разрез верхней части укороченного побега земляники ананасной (схематизированно):

a — верхушечная часть побега длиной около 2 мм; *б* — анатомическое строение апикальной зоны побега; 1 — примордиальный лист; 2 — апикальная почка с 4-слойной туникой и корпусом; 3 — сердцевинная паренхима; 4 — флоэма; 5 — ксилема; 6 — основание растущего листа (нижняя часть рахиса сложного листа с приросшими прилистниками); 7 — группа инициальных клеток верхушечной меристемы пазушной почки; 8 — одноклеточные волоски; 9 — кутикула; 10 — эпидермис; 11 — паренхима листа.

На рис.3 схематично показаны продольные и поперечные разрезы нижней части стебля рожка земляники. Обращает на себя внимание высокая паренхиматизация стебля и формирование специфичной для этой культуры

ткани — полидермы, выполняющей подобно перидерме и ритидому защитную функцию. Эта ткань, как и типичная перидерма, представлена феллемой, феллогеном и феллодермой. Однако феллема полидермы у земляники

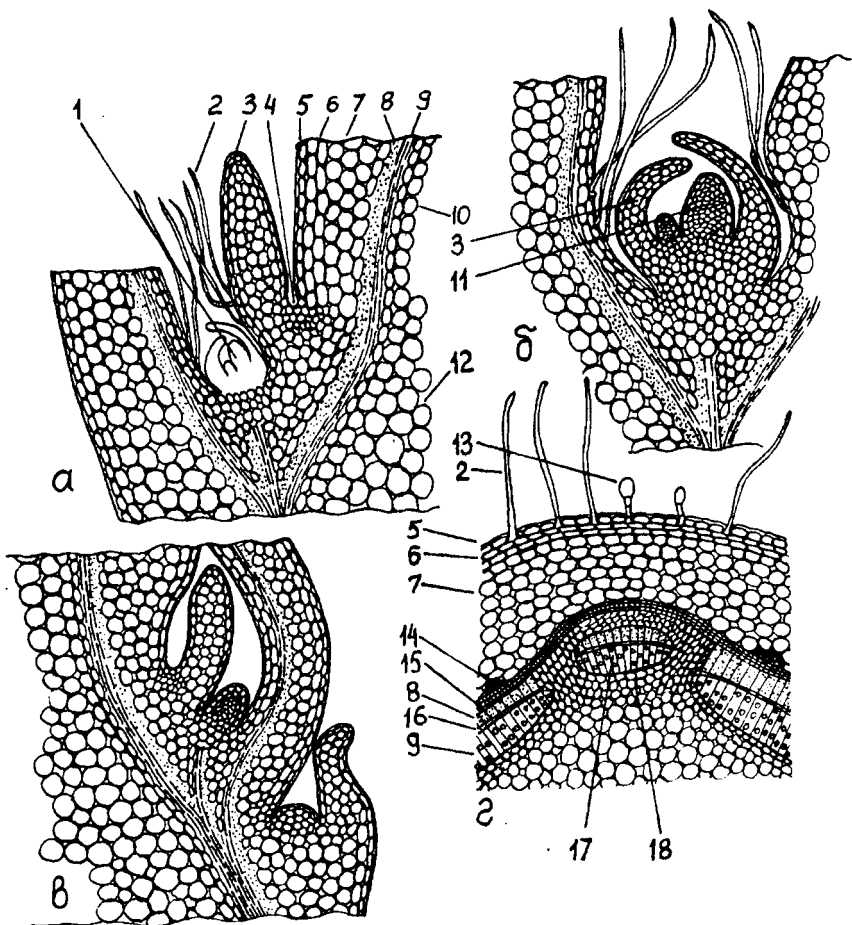


Рис. 3. Продольные (а, б, в) и поперечный (г) разрезы нижней части стебля укороченного побега земляники ананасной (схематизированно, х20).

1 — пазушная почка (более детально изображенная в позиции б); 2 — одноклеточные волоски; 3 — примордиальный кроющий лист; 4 — пазуха примордиального листа с группой инициальных клеток верхушечной меристемы почки; 5 — эпидермис с кутикулой; 6 — двухслойная колленхима стебля; 7 — паренхима первичной коры стебля; 8 — флоэма; 9 — ксилема; 10 — перимедулярная зона сердцевины стебля; 11 — конус нарастания пазушной почки; 12 — сердцевинная паренхима; 13 — многоклеточные железистые трихомы; 14 — склеренхима; 15 — перидерма стебля, формирующаяся в результате функционирования феллогена, заложившегося в зоне первичной флоэмы; 16 — камбий; 17 — медианный листовый след, входящий в центральный цилиндр стебля; 18 — листовый прорыв (лакуна), заполненный клетками основной паренхимы.

представлена опробковевшими паренхимными клетками с живым протопластом. Вероятно, ее живые клетки имеют прямую связь с рядом расположенными клетками

паренхимы первичной коры и центрального цилиндра, о чем свидетельствует функционирование коровой части стебля, а не ее постепенная облитерация и

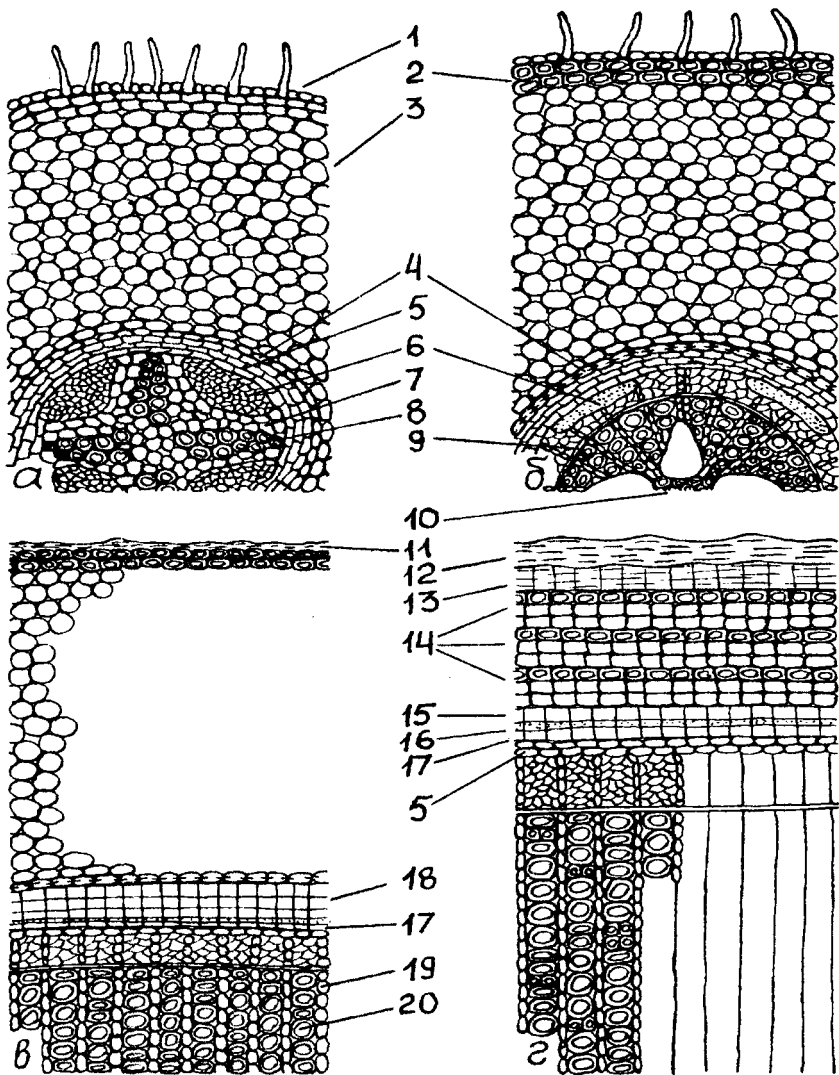


Рис.4. Поперечные разрезы корней первичного (а, б) и вторичного (в, г) анатомического строения корней (схематизированно, х28) земляники ананасной:

а — ростовой корень диаметром около 1 мм; б — корень с заложившимся камбием; в — формирование в перичкле первой перидермы; г — формирование полидермы; 1 — эпителима с корневыми волосками; 2 — экзодерма с суберинизированными клеточными стенками; 3 — мезодерма первичной коры; 4 — эндодерма; 5 — многослойный (2—4 слоя) перичкл; 6 — первичная флоэма; 7 — соединительная паренхима; 8 — первичная ксилема; 9 — камбий; 10 — склерифицированная сердцевинная паренхима; 11 — облитерированная эпителима; 12 — остатки отмершей первичной коры; 13 — отторгающиеся части первой перидермы; 14 — полидерма, состоящая из нескольких повторно развившихся перидерм; 15 — феллоидные опробковевшие клетки с живым протопластом; 16 — феллоген; 17 — феллодерма; 18 — феллема первой перидермы; 19 — сердцевинный луч; 20 — составные элементы проводящей части ксилемы (сосуды, трахеиды и волокна либриформа).

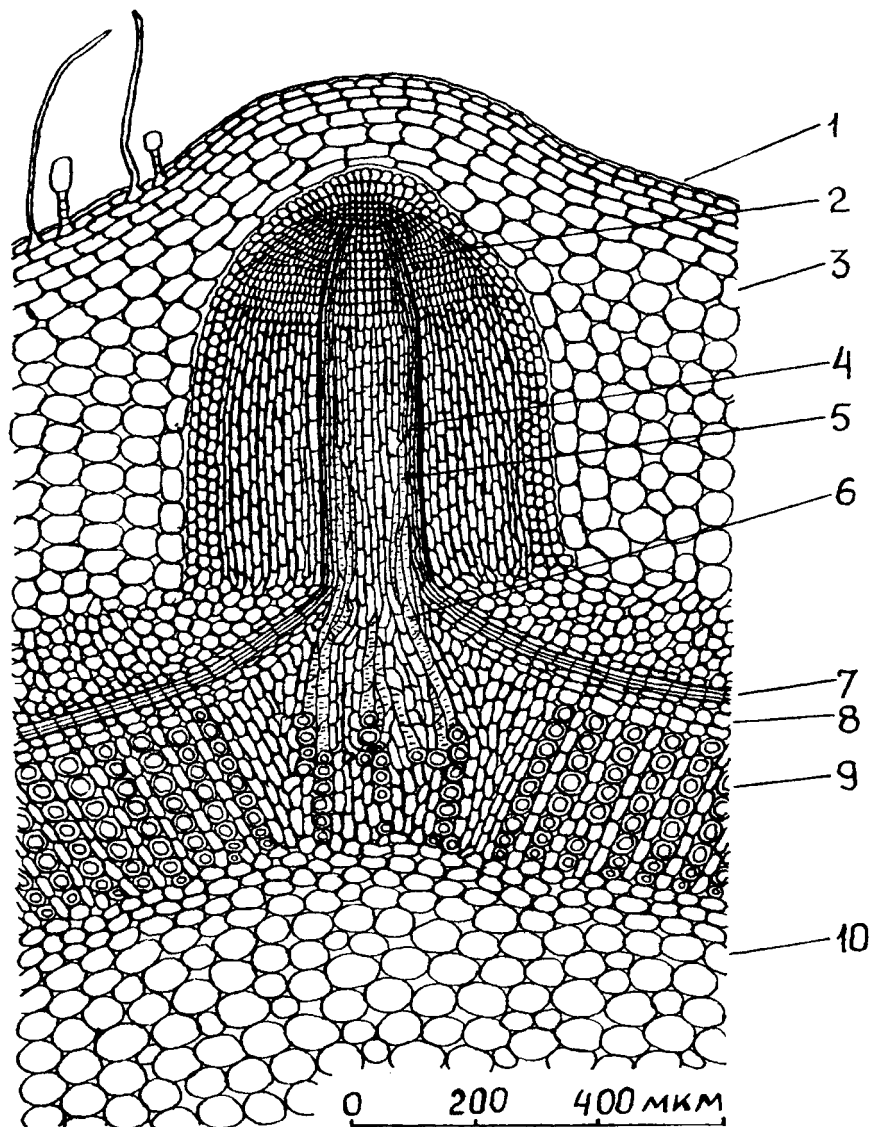


Рис.5. Эндогенно растущий в укороченном стебле (рожке) земляники ананасной молодой придаточный корень длиной около 1 мм:

1 — эпидермис стебля с одно- и многоклеточными волосками; 2 — верхушечная меристема корня с корневым чехликом и гистогенами (плерома, периблема и дерматокалитроген); 3 — паренхима первичной коры стебля; 4 — трехслойный перикарп корня; 5 — дифференцированные трахеиды протоксилемы корня; 6 — дифференцированные членки сосудов в основании корня, приращенные к сосудам стебля; 7 — камбиальная зона стебля, соединяющаяся с перикарпом корня; 8 — молодая, дифференцирующаяся ксилема стебля; 9 — ксилема стебля; 10 — гомогенная сердцевинная паренхима.

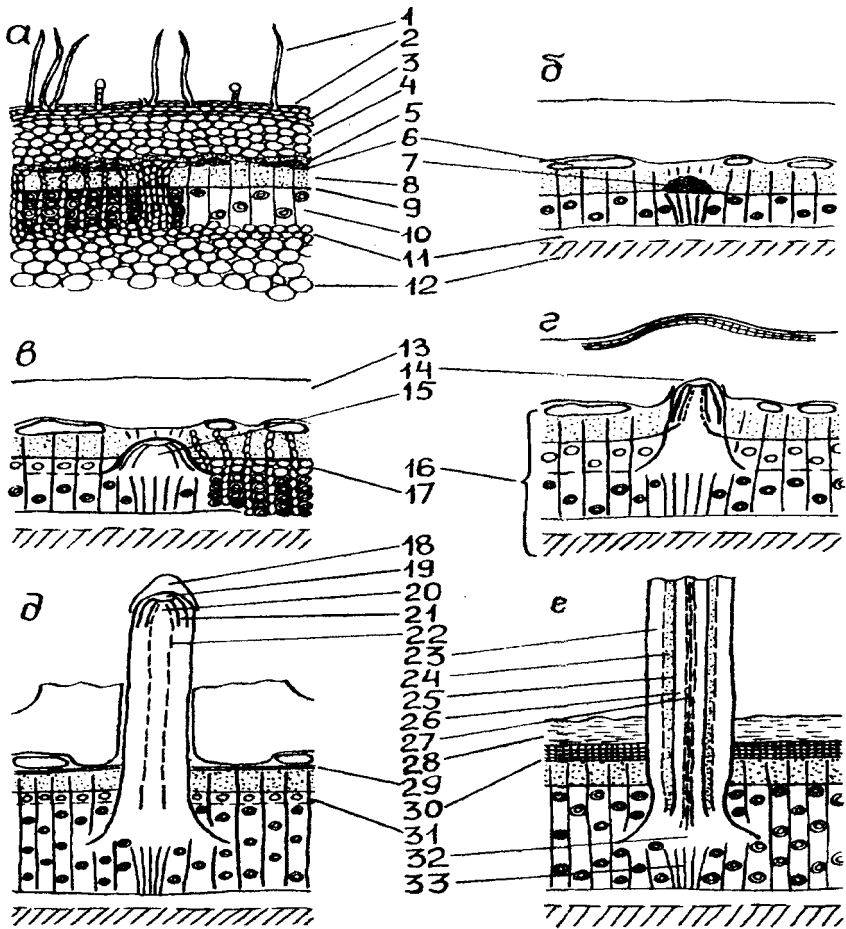


Рис.6. Этапы формирования придаточного корня на укороченном стебле земляники ананасной (схематизированно):

a — поперечный разрез стебля вторичного анатомического строения, не имеющего корневых зачатков; *б* — формирование на основе лучевых инициалий многогранного сердцевидного луча меристематического зачатка, не дифференцированного на гистогены корня; *в* — дифференциация гистогенов зачатка придаточного корня; *г* — эндогенный рост в тканях стебля сформированного придаточного корня; *д* — экзогенный рост корня первичного анатомического строения; *е* — заложение камбия и переход корня к вторичному анатомическому строению; 1 — одно- и многоклеточные эпидермальные волоски; 2 — эпидермис с кутиклой; 3 — двухслойная колленхима; 4 — колленхима первичной коры; 5 — крахмалоносное влагалище; 6 — периваскулярная склеренхима перичиклического происхождения; 7 — не дифференцированный на гистогены меристематический зачаток корня; 8 — флоэма; 9 — камбий; 10 — ксилема; 11 — перимедулярная зона; 12 — сердцевинная паренхима; 13 — первичная кора стебля; 14 — эндогенно растущий придаточный корень; 15 — дифференцированный на гистогены зачаток придаточного корня; 16 — центральный цилиндр стебля; 17 — недифференцированная регенерированная (раневая) ксилема; 18 — корневой чехлик; 19 — дерматокалитроген; 20 — плерома; 21 — периблема; 22 — перичикл корня; 23 — первичная кора корня; 24 — флоэма; 25 — камбий; 26 и 27 — вторичная и первичная ксилема; 28 — облитерированная первичная кора стебля со склеренхимой; 29 — заложение во флоэмной зоне стебля феллогена; 30 — перидерма стебля; 31 — молодая, слабодифференцированная древесина; 32 — зона приращения придаточного корня к стеблю; 33 — многогранный сердцевидный луч стебля, на основе лучевых инициалий которого сформировался придаточный корень.

последующее отмирание при формировании нескольких слоев пробковых клеток в случае типичной перидермы.

Формирование полидермы, по нашему мнению, является редким биологическим явлением у растений из семейства розанных, что представляет определенный интерес в плане познания общего построения разных биологических структур. При дальнейших исследованиях наблюдалось формирование полидермы в ростовых корнях при их вторичном анатомическом строении. Оказалось, что в этом случае феллоген продуцирует многократно феллоидные опробковевшие клетки с живым протопластом, которые впоследствии опробковывают, а протопласт отмирает. Это приводит к тому, что первичная кора корня при переходе во вторичное строение постепенно облитерируется и отмирает (рис.4).

На среде укоренения у микрочеренков земляники на стеблевой части формируются придаточные корни. Этот процесс мало отличается от придаточного корнеобразования у зеленых черенков других плодовых культур (рис.5). Микрочеренки на среде укоренения имеют вторичное анатомическое строение, при этом происходит постепенный переход центрального цилиндра из пучкового типа в характерное сплошное непучковое строение. Проводящие системы придаточного корня и стебля соединены между собой, а камбий стебля причленен к меристеме корня. Придаточные корни у микрочеренка земляники формируются на основе лучевых

инициалий камбия в зоне широких сердцевидных лучей.

Детальные исследования новообразования придаточных корней на стеблевой оси микропобега земляники позволили выделить этапы формирования корней (рис.6). Наблюдаемая мацерация вторичной древесины в стеблях усов, рожков и микропобегов дает возможность считать, что линейные размеры трахеальных элементов уменьшаются пропорционально длине исследуемой части. Так, размеры междоузлий усов больше, чем у рожков и микрочеренков. Соответственно при уменьшении размеров междоузлий значительно уменьшаются линейные параметры волокон либриформы, трахеид и членников сосудов, что представлено на рис.7.

Заключение

Микроклональное размножение земляники получило в последние годы широкое распространение при получении здорового посадочного материала этой культуры. Результаты экспериментальных исследований, приведенные в настоящей работе, позволяют считать, что в принципе микроклональное размножение не отличается от других способов вегетативного размножения садовых растений и прежде всего зеленого черенкования [6]. Как и у зеленых черенков, у верхушечных микрочеренков земляники формирование надземной части базируется на митотической активности апикальной меристемы. В процессе укоренения микрочеренков происходит структурная перестройка работы веретеновидных и

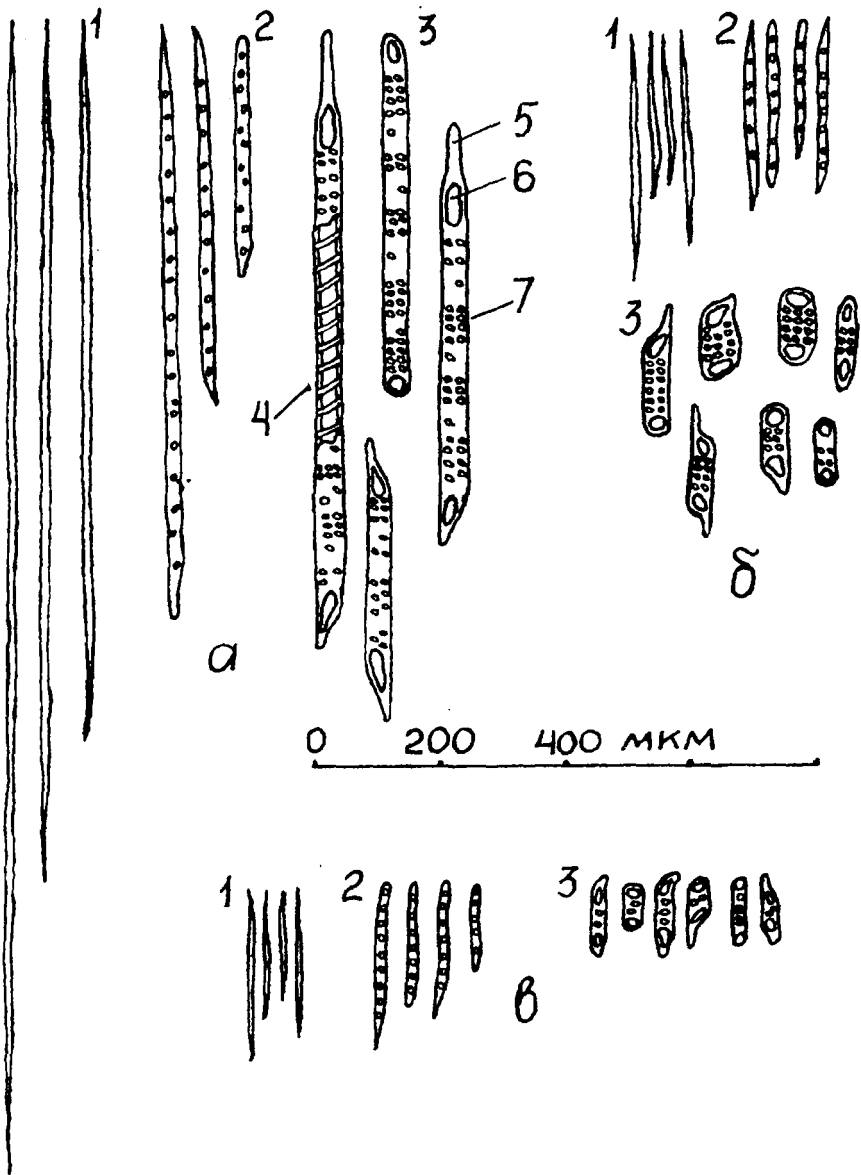


Рис. 7. Трахеальные элементы ксилемы в междоузлии уса (а), стебля рожка (б) и стебля микробега (в) земляники ананасной:

1 — волокна либриформа; 2 — трахеиды; 3 — членики сосудов; 4 — спиральные утолщения клеточной стенки; 5 — клювик; 6 — простая перфорация; 7 — межсосудистая поровость с окаймленными порами.

лучевых инициалей камбия с преимущественной паренхиматизацией вторичной ксилемы в зоне широких сердцевинных лучей. За счет изменения направленности работы лучевых инициалей камбия образуются зачатки придаточных корней, которые при выходе за пределы микрочеренка в питательной среде формируют адвентивную корневую систему. Придаточные корни укорененного микрорастения земляники в своей нижней части прямо воссоединяются с центральным цилиндром стебля, в частности, с вторичными структурами ксилемы и флоэмы, и этим воссоздают непрерывную связь проводящих систем стебля и корня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. — М.: Наука, 1975. — 2. Ницше В., Венцель Г. Гаплоиды в селекции растений. М.: Ко-

лос, 1980. — 3. Попова И.В., Жаркова И.В., Зекалашвили А.У. Изучение потенциальной продуктивности новых сортов земляники, размноженных методом культуры меристематических верхушек. — В сб.: Проблемы вегетативного размножения в садоводстве. М.: ТСХА, 1985, с.112—118. — 4. Прозина М.Н. Ботаническая микротехника. М.: Высшая школа, 1960. — 5. Фаустов В.В., Орлов П.Н. Начальные этапы дифференциации придаточных корней у зеленых черенков садовых растений при обработке регуляторами роста. — Изв. ТСХА, 1985, вып. 4, с. 123—128. — 6. Фаустов В.В., Олешко Е.В., Жаркова И.В. и др. Микроклональное размножение вишни. — Изв. ТСХА, 1988, вып. 5, с.131—138. — 7. Яценко-Хмелевский А.А. Основы и методы анатомического исследования древесины. М.-Л.: Изд. АН СССР, 1954.

Статья поступила 27 июня 1994 г.

SUMMARY

As a result of studying anatomic texture of microclonal strawberry plants variety Zenit reproduced on artificial nutrient medium in aseptic conditions using the method of apical shoot meristems, and of investigating the trend in organogenetic processes resulting in development of strawberry plants from isolated apical meristems it was found, that, as in case of multiplication of green shoots, formation of the upper part in strawberry apical pedunculus is based on mitotic activity of apical shoot meristem. In the process of microshoot rooting structural changes in spindle-like and medullar rays of cambium take place with primary parenchimatization of secondary xylem in the zone of wide corded rays. The trend of organogenetic development of the roots with microclonal reproduction is the same as with green shoot multiplication.