

УДК 575:631.527

Морфогенез и регенерация в культуре оси соцветия *Iris ensata* Thunb.

Тихомирова Людмила Ивановна

Приведены результаты анатомо-морфологического изучения регенерации в эксплантах оси соцветия некоторых культиваров *I. ensata* Thunb. Выявлены особенности прохождения морфогенеза и регенерационная активность данного типа эксплантов. Отмечено, что морфогенез происходит по типу геммогенеза, минуя стадию каллусообразования. Побеги сформированные *de novo* имели исключительно эндогенное происхождение.

Ключевые слова: *морфогенез, регенерация, эксплант, микроразмножение, I. ensata, геммогенез, анатомо-морфологическое изучение, ось соцветия.*

Morphogenesis and regeneration of inflorescence axis in culture *Iris ensata* Thunb.

Tikhomirova Ljudmila Ivanovna

The results of anatomical-morphological regeneration-investigation in explants of inflorescence axis of some cultivars *I. ensata* Thunb. are presented there. Morphogenesis peculiarities and regenerative activity of the given type of explants are found out. It's noted, that morphogenesis is carried out similar to gemmagenesis, passing by the stage of callus formation. Shoots, formed *de novo*, were of endogenous origin.

Keywords: *morphogenesis, regeneration, explant, micropropagation, I.ensata, gemmagenesis, anatomical-morphological investigation, inflorescence axis.*

Введение

В Японии ирис мечевидный культивируется более 500 лет. Это одна из популярных и любимых культур в стране. По данным Японского Общества *Iris*,

впервые в Японии из незрелых зародышей отдаленных гибридов *I. ensata* успешно регенерированы растения в результате индукции соматического эмбриогенеза в каллусной культуре [1]. В 1991 г. Tcutomu Yabuяа культивировал экспланты молодых побегов *I. ensata* на среде Мурасиге-Скуга, дополненной гормонами и сахарозой. Он наблюдал индукцию двух видов каллуса: зеленого и белого. Из зеленого каллуса были получены побеги. Введение активированного угля в питательную среду положительно влияло на образование корней у этих побегов [2].

С целью микроразмножения сортов *I. ensata* были использованы различные органы цветка в качестве эксплантов, в частности цветоножка. Регенерировать побеги не удалось. Ось соцветия была источником формирования корней с частотой 30% на безгормональной среде по прописи Мурасиге и Скуга [3].

Цель нашей работы — выявить морфогенетические особенности развития и регенерационную способность оси соцветия в культуре *in vitro* для культиваров *I. ensata*.

Материалы и методы

В качестве растительного материала использовали сорта и гибриды *I. ensata* из коллекции НИИСС Россельхозакадемии г. Барнаул. Использовали цветки в фазе бутонизации при величине 20—30мм (VI—VII этапы органогенеза). После стерилизации для культуры *in vitro* от генеративных побегов брали участки между кроющим листом и цветком. Стерильные сегменты цветоножки помещали на стандартную питательную среду MS [4], в которую вводили следующие фитогормоны: цитокининового типа действия — 6-бензиламинопурин (БАП) 4—8, 20 мкМ; ауксинового типа действия — α -нафтилуксусную кислоту (НУК) 3—5 мкМ. Экспланты выращивали в культуральной комнате, где поддерживалась температура 24—26° С, 16-часовой фотопериод, интенсивность освещения — 2000—4000 лк. Субкультивирование тканей и органов проводили через 15—30 суток.

Провели серии анатомических срезов в разные сроки культивирования эксплантов с частотой 3—5 дней. Были приготовлены постоянные препараты по общепринятым методикам [5] в нашей модификации. Препараты просматривали на микроскопе МБ — 30 do MPI — 5 made in Poland при увеличении $\times 100$, $\times 400$. Фотографии были выполнены цифровым фотоаппаратом Sanyo VPC — S600.

Результаты и их обсуждение

Способность к регенерации у фрагментов оси соцветия *I. ensata* отмечена в основном на средах, где содержание цитокинина 6, 8, 20 мкМ (БАП). Исключением составляют среды с 4 мкМ БАП и 4 мкМ НУК. Все экспланты регенерировали побеги на средах с 4 мкМ БАП 4 мкМ НУК и 8 мкМ БАП 3 мкМ НУК. Отличием явилось время прохождения регенерационных процессов: на средах с 8 мкМ БАП 3 мкМ НУК — через 18 суток после введения в культуру *in vitro*, на средах с 4 мкМ БАП 4 мкМ НУК — через 28 суток. Удвоенное содержание БАП (8 мкМ) первого варианта среды по сравнению со вторым (4 мкМ), вероятно явилось причиной сокращения времени прохождения регенерационных процессов на 10 суток.

Изучение анатомического строения оси соцветия *I. ensata* гибрида 28 (VI—VII этапа органогенеза) показало следующее. Генеративный побег покрыт эпидермой, образованной одним слоем клеток с кутикулой. Эпидермальные клетки плотно сомкнутые друг с другом, имеют таблитчатую форму. Антиклинальные стенки клеток ровные (рис. 1).

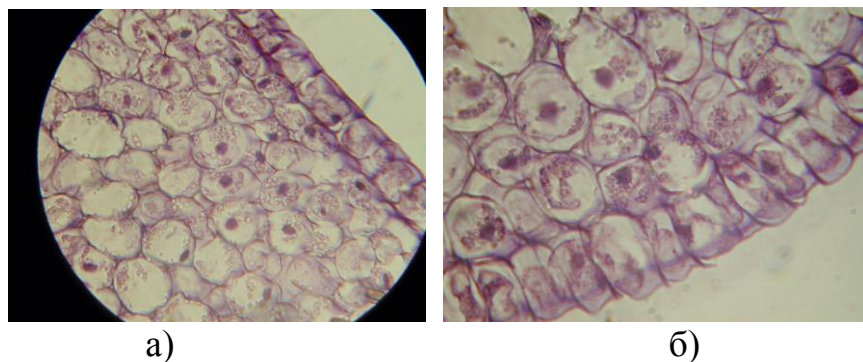


Рисунок 1 — Анатомическое строение оси соцветия *I. ensata* гибрид 28 (VI—VII этапы органогенеза), ткани первичной коры: а) увел. $\times 100$; б) увел. $\times 400$

Первичная кора оси соцветия *I. ensata* гибрид 28 на данном этапе развития состоит из 15 слоев паренхимных клеток. Эти клетки имеют почти сферическую форму с тонкими целлюлозными стенками. Цитоплазма клеток первичной коры содержит продукты обмена веществ, вероятно, крахмальные зёрна. Пигментных включений не наблюдается. На границе с центральным цилиндром клеток склеренхимы не обнаружено. В толще паренхимного слоя равномерно располагаются полости имеющие диаметр, который в несколько раз превышает диаметр соседних паренхимных клеток первичной коры (рис. 2).

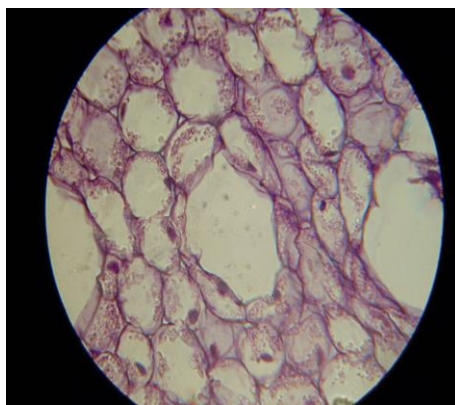
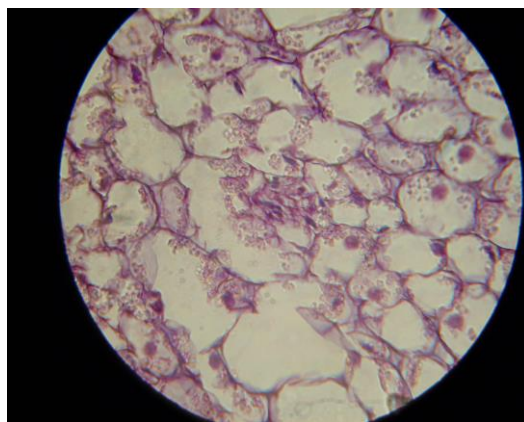


Рисунок 2 — Анатомическое строение оси соцветия *I. ensata* гибрид 28 (VI—VII этапы органогенеза) (Увел. $\times 100$)

При малом увеличении (увеличение $\times 100$) хорошо видно кольцо клеток, представляющее собой перицикл. Перицикл является наружным слоем центрального цилиндра, внутрь от которого, среди паренхимных клеток сердцевины расположены небольшие коллатеральные пучки. Между клетками паренхимы первичной коры, ближе к перициклу видны очаги деления (интеркалярная меристема), так как на данном этапе органогенеза рост генеративного побега ещё не закончен (рис. 3).



а)



б)

Рисунок 3 — Анатомическое строение оси соцветия *I. ensata* гибрид 28 (VI—VII этапы органогенеза); а) первичная кора и многорядный перицикл. (Увел. $\times 100$), б) очаг интеркалярной меристемы. (Увел. $\times 400$).

У большинства видов ириса наиболее интенсивно цветонос растет в предцветный период. Причем, у генеративного побега преобладал вставочный или интеркалярный рост, то есть рост за счет интеркалярных меристем. Ткани интеркалярных меристем нельзя назвать совершенно недифференцированными.

В этих меристемах в период их активного роста уже имеются проводящие пучки [6].

Так как ось соцветия *I. ensata* гибрида 28 имеет многогранную форму в поперечном сечении, пограничная зона между первичной корой и центральным цилиндром также имеет форму многогранника на срезе. По сторонам многогранника сплошной линией расположены проводящие пучки. Клетки перицикла располагаются над пучками и между ними.

При анатомическом изучении, отмечено, что всё пространство центрального цилиндра занято основной паренхимой, среди которой располагаются закрытые проводящие пучки. Клетки паренхимы изодиаметрической формы. Проводящие пучки центрального цилиндра более крупного размера, чем пограничной зоны.

При изучении процессов морфогенеза у эксплантов *I. ensata* на 4 день культивирования был отмечен рост за счет растяжения. Число клеточных слоев паренхимы первичной коры не изменилось, осталось в пределах 15.

На 7—12 сутки культивирования у экспланта в области перицикла была отмечена зона меристематической активности в виде сплошного кольца. Множественные очаги деления в паренхиме первичной коры не одинаковой степени развития. За счет роста и давления внутренних слоев клеток, край экспланта становится не ровным. Отмечено образование полиад (несколько делящихся клеток под общей оболочкой) (рис. 4).

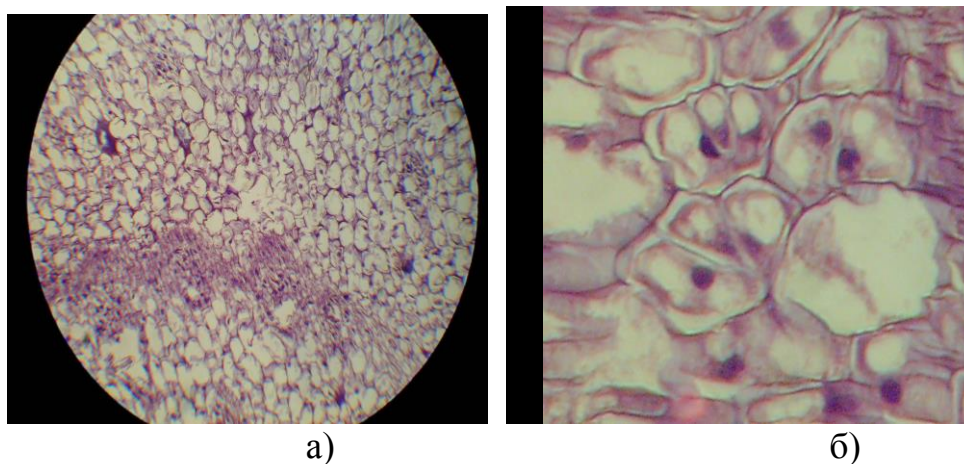


Рисунок 4 — Анатомическое строение оси соцветия *I. ensata* гибрид 28 на 7 сутки развития; а) меристематическая активность в зоне перицикла (Увел. $\times 100$), б) полиады. (Увел. $\times 400$)

На 15 сутки культивирования слой перицикла сохраняется. Меристематические очаги развиваются как в толще паренхимы первичной коры, так и с внешней стороны перицикла. В первичной коре значительное количество клеток с включениями, вероятно крахмальные зерна.

Первые визуальные признаки регенерации побегов у эксплантов оси соцветия *I. ensata* были отмечены на 18 сутки культивирования. Побеги формировались в паренхиме первичной коры и в области перицикла. При этом перицикл не был разрушен (рис. 5).

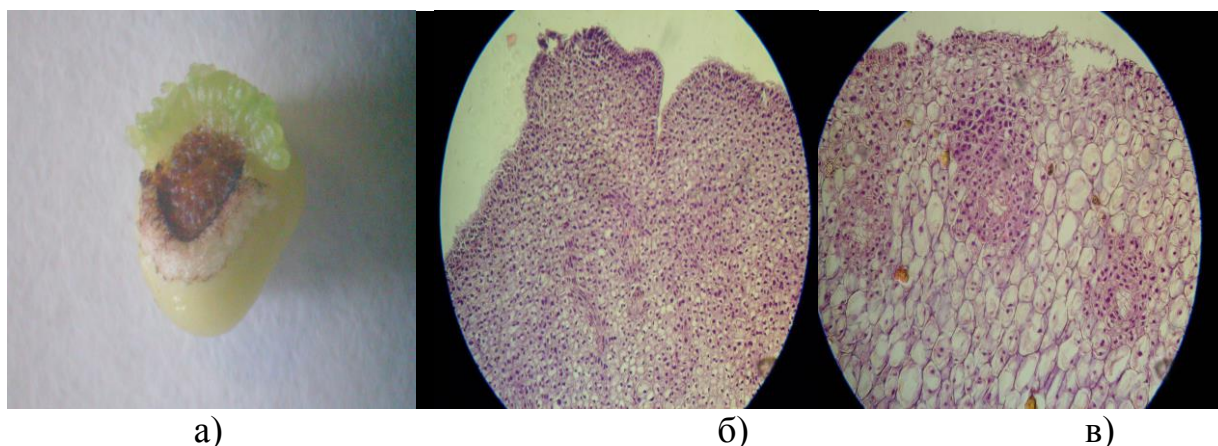


Рисунок 5 — Внешний вид и анатомическое строение оси соцветия *I. ensata* гибрид 28 на 18 сутки; а) внешнее строение экспланта, б) побеги образованные *de novo*, продольный срез, в) поперечный срез побега (Увел. $\times 100$)

При гистологическом изучении процессов в эксплантах оси соцветия *I. ensata* гибрид 28 нами установлено однозначно эндогенное заложение побегов. Образовавшиеся побеги в своем росте прокладывают себе путь сквозь клеточные слои материнского экспланта.

Таблица 1 — Этапы морфогенеза в эксплантах оси соцветия *I. ensata* гибрид 28 с 8мкМ БАП и 3мкМНУК

<i>Время фиксации материала от момента введения в культуру in vitro</i>	<i>Изменения, произошедшие в тканях экспланта</i>
4 суток	Отмечен рост за счет растяжения. Число клеточных слоев паренхимы первичной коры не изменилось, осталось в пределах 15.

7—12 суток	В области перицикла была отмечена зона меристематической активности в виде сплошного кольца. Очаги деления в паренхиме первичной коры не одинаковой степени развития. За счет роста и давления внутренних слоев клеток, край экспланта становится неровным. Отмечено образование полиад
15 суток	Многорядный слой перицикла сохраняется. Меристематические очаги развиваются как в толще паренхимы первичной коры, так и с внешней стороны перицикла.
18 суток	Первые визуальные признаки регенерации побегов на поверхности экспланта.

Выводы

1. В эксплантах оси соцветия *I. ensata* на питательных средах с содержанием 4—8 и 20 мкМ БАП 3—5 мкМ НУК морфогенез проходил по типу геммогенеза, минуя стадию каллусообразования.
2. Скорость развития регенерационных процессов в эксплантах оси соцветия зависела от концентрации гормонов в питательной среде и от генотипа источника.
3. Анатомическое строение генеративного побега на *I. ensata* гибрид 28 на VI—VII этапах органогенеза типично для выполненного стебля однодольных растений.
4. Меристематическая активность (возникновение полиад) в эксплантах *I. ensata* гибрид 28 отмечалась, начиная с 10 дня культивирования, и была ограничена областью перицикла и внутренними слоями клеток первичной коры.
5. Системы тканей побегов в экспланте оси соцветия *I. ensata* гибрид 28 развивались как из клеток перицикла, так и из клеток паренхимы первичной коры.
6. Побеги, развившиеся на эксплантах оси соцветия *I. ensata* гибрид 28 имели исключительно эндогенное происхождение.

Литература

1. Yabuya T., Yavagata. Embryo growth and Cultural Condition in *Iris ensata* Thunb. //Japan J. Breed., 1981.— 31 (4). — P. 377—382 .
2. Yabuya T, Ikeda Y., Adachi T. In vitro propagation of japanese garden iris *iris ensata* Thunb. //Euphytica. 1991.— 57.— P. 77—82.

3. Kawase K, Mizutani H, Yoshioka M, Fukuda S Shoot formation on floral organs of Japanese iris in vitro //Journal of the Japanese Society for Horticultural 1995.– Science 64.– P. 143—148.
4. Murashige T., Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassaya with Tobacco Tissue cultures // Physiol. Plant. 1962.–V. 15. № 4.– P. 473—480.
5. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятов А.Г. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
6. Эсау К. Анатомия растений. Изд-во Мир. Москва. 1969. – 564 с.