

P-4

И. Р. РАХИМБАЕВ
Д. К. ДЖУМАШЕВА
Г. А. НУРМУХАНБЕТОВА

ВЕГЕТАТИВНОЕ
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ
ЛУКОВИЧНЫХ
РАСТЕНИЙ



ТС
857

АКАДЕМИЯ НАУК КАЗАХСКОЙ ССР
ГЛАВНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД

И. Р. РАХИМБАЕВ, Д. К. ДЖУМАШЕВА,
Г. А. НУРМУХАНБЕТОВА

ВЕГЕТАТИВНОЕ
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ
ЛУКОВИЧНЫХ
РАСТЕНИЙ



Издательство «НАУКА» Казахской ССР
АЛМА-АТА · 1985

Рахимбаев И.Р., Джумашева Д.К., Нурмуханбетова Г.А.
Вегетативное микроразмножение луковичных растений. –
Алма-Ата: Наука, 1985. – 112 с.

Отражено современное состояние исследований по микроразмножению луковичных и клубнелуковичных растений. Представлен экспериментальный материал по оптимизации условий, контролирующих образование каллусных тканей, органогенез, соматический эмбриогенез и формирование целых растений – регенерантов в культуре тканей. Изложены методы ускоренного вегетативного размножения редких видов шафрана, унгернии и иксиолириона с целью введения их в культуру и сохранения генофонда.

Книга рассчитана на ботаников, физиологов и биохимиков растений, агрономов, аспирантов и студентов.

Библиогр. 173 назв. Ил. 22. Табл. 1.

Ответственный редактор
член-корреспондент АН КазССР И.О.Байтулин

Рецензент
член-корреспондент АН КазССР Ф.А.Полимбетова

Р²⁰⁰⁴⁰⁰⁰⁰⁰⁰⁻⁰⁰⁷ 133.85
407(05)-85

© Издательство "Наука" Казахской ССР, 1985

ВВЕДЕНИЕ

Культура изолированных органов и тканей является удобной биологической моделью для выяснения механизмов гормональной регуляции морфогенеза растений. Во многих случаях регенерация, т.е. воссоздание целого растительно-го организма в культуре ткани осуществляется сменой гормональных факторов. В процессах дифференциации и морфогенеза первостепенная роль наряду с другими гормонами принадлежит ауксином и цитокинином. Согласно концепции F.Skoog, C.Miller (1957), можно индуцировать органогенез или недифференцированный рост каллуса, изменяя относительное содержание ауксинов и цитокининов в питательной среде.

Фитогормоны, играющие ведущую роль в индукции клеточных делений в эксплантатах, в образовании каллуса и соматических эмбрионидов, а также органогенезе и морфогенезе, выполняют важные функции в процессе клонального микроразмножения на основе регенерации целых растений из изолированных органов и тканей.

В последнее время метод культуры тканей начинает применяться для массового вегетативного размножения редких и исчезающих видов растений в целях сохранения их генофонда (шафран Королькова, шафран алауавский, унгерния Северцова и иксиолирион татарский, ареалы и численность которых резко сокращаются).

В связи с этим необходимо разработать приемы микроразмножения данных растений *in vitro*. Однако не существует универсальной технологии культивирования *in vitro*,

которая могла бы быть пригодна для всех растений. Для каждого вида, даже сорта, требуется разработка сугубо специфических методических приемов, обеспечивающих формирование целых растений-регенерантов в культуре тканей (Бутенко, 1964). Прежде всего это касается выяснения особенностей действия отдельных типов фитогормонов и их соотношений на процессы морфогенеза в культуре тканей.

Глава 1

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛУКОВИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

Декоративные луковичные растения в таксономическом отношении представлены в основном сем. *Liliaceae*, *Amarillidaceae*, *Iridaceae*, *Alliaceae*, встречающимися во флоре СССР. Все луковичные растения относятся к классу однодольных (*Monocotyledones*), происходящих непосредственно от голосеменных саговникового типа (Тахтаджян, 1966).

Эволюция геофитной жизненной формы класса однодольных высших растений могла идти в направлении ксерофитизации (Хохряков, 1975). Изначальная предковая форма однодольных имела облик толстостебельного неветвистого дерева с пучком листьев на верхушке. Засушливые условия обитания определили процесс соматической редукции, который проявился в раздревеснении, уменьшении размеров тела и усилении втягивающей деятельности корней. Вследствие чего образовались наземно-розеточные формы растений. Дальнейшее приспособление постепенно привело к углублению розетки в землю. Луковица, типичный для геофитов орган, трактуется именно как погруженная в почву розетка из запасящих листьев. Такова в общих чертах естественная история возникновения экологической группы геофитов.

Формирование геофитного габитуса вызвано приспособлением к климату средиземноморского типа, характеризующемуся резкими сезонными изменениями температуры и

влажности. Это привело к необходимости защиты точки роста путем образования запасующих чешуй и почек возобновления. Эволюция луковичных шла также по пути изменения генеративных органов. Размеры соцветия уменьшались, количество цветков сокращалось порой до одного: соцветие из ботрического становилось цимозным (нарциссы, подснежники, штернбергия), верховые листья цветоноса превращались в зеленые ассимилирующие листья (юноны, лилии, рябчики, тюльпаны). И.Л.Крылова (1976) полагает, что группа эфемероидов, возникшая в процессе длительной эволюции путем приспособления к климатическим и ценоотическим факторам, характеризуется редукцией, специализацией и детерминацией вегетативных органов. Это отчетливо проявляется в формировании высокоспециализированных запасующих органов, сокращении числа метамеров, приобретении своеобразной морфологической структуры.

Луковичные геофиты – типичные эфемероиды (Коровин, 1934), характерной особенностью которых является длительный летний перерыв в вегетации и чрезвычайно быстрое прохождение роста и развития весной за короткий срок.

Для перенесения сильной летней засухи и жары у эфемероидов выработалась приспособительная реакция, заключающаяся в засыхании и сбрасывании листьев, прекращении вегетации и вступлении в состояние покоя. Однако глубокого покоя у луковичных эфемероидов, по-видимому, нет, ибо в летний период у них происходят процессы закладки и формирования зачатков вегетативных и генеративных органов. Условность понятия покой применительно к луковичам подтверждают И.Г.Серебряков (1952), А.Ю.Ахвердов (1955), В.В.Скрипчинский, Вл.В.Скрипчинский (1961). Термин покой в отношении лукович чаще употребляют для обозначения состояния, когда отсутствуют внешние признаки жизнедеятельности.

Наиболее существенная особенность эфемероидов – летний перерыв в вегетации. Многие эфемероиды характеризуются также потребностью в воздействии холода для развития цветка, высокой интенсивностью роста при очень коротком ростовом периоде, ранним цветением и плодоношением.

В.В.Скрипчинский (1977) считает, что у луковичных растений приспособление отдельных органов происходило путем смены функций (ассимилирующий лист – запасующая чешуя), ускорения сезонных темпов онтогенеза и эфемеризации тех этапов, которые приурочены к надземному существованию. Становление эфемероидного типа онтогенеза обусловлено образованием органов с большим запасом питательных веществ, обеспечивающих определенную независимость, автономизацию начальных этапов морфогенеза вегетативных и генеративных органов внутри луковичи от внешних воздействий. Эфемероидность луковичных растений, выражающаяся в "мгновенном" надземном росте, цветении и плодоношении весной обеспечивается длительным формированием и ростом органов внутри луковичи.

У луковичных геофитов запасующие органы и почки возобновления находятся в почве, благодаря чему они могут обитать в жарких и холодных областях земного шара. W.Burns (1946) указывает на любопытный факт: луковичные растения произрастают только между 23–45° с.ш. и 23–45° ю.ш., где климат и длина дня – важнейшие факторы в эволюции геофитов.

Географическое расселение луковичных геофитов обширно – Европа, Африка, Азия, Америка, т.е. преимущественно в аридной и только отчасти в умеренной зонах. Луковичные растения занимают разнообразные местообитания: в низинах – аридные зоны тропического пояса, гумидные зоны умеренного и даже полярного поясов, в горах – субальпийский и альпийский пояса. Такая широкая экологическая амплитуда обеспечила луковичным растениям возможность для произрастания в различных природно-климатических условиях.

Характерные морфологические признаки эфемероидов – небольшое число листьев и междоузлий, небольшие размеры стеблей, крупные, часто поникающие цветы. Другой отличительной особенностью является отсутствие у них зеленых прикорневых листьев (Ворошилов, 1960). Луковичи по типу строения запасующих чешуй делятся на туникатные, полутуникатные, черепитчатые и имприкатные типы (Федоров и др., 1962). Запасующие чешуи – это низовые ли-

ствя, приспособленные для выполнения функции накопления и долгосрочного хранения питательных веществ.

Стебель у луковичных растений выражен в следующих формах: донце – укороченный, метаморфизированный побег; столон – видоизмененный побег и, наконец, стебель, традиционно представляемый как цветоносный побег. Корни у луковичных растений только придаточные, ежегодно сменяющиеся. Закладываются корни в период покоя в нижней части донца, где локализована корневая меристема. По расположению ассимилирующих листьев луковичные растения можно разделить на две группы: лист сидячий на стебле (стебель облиственный), характерен для сем. Лилейных и Ирисовых; лист выходит из недр луковицы, прикреплен к донцу (стебель безлистный), характерен для сем. Луковых и Амариллисовых (кроме иксиолириона).

Итак, возникновение в процессе эволюции геофитного габитуса и эфемероидного "образа жизни" стали возможными благодаря соматической редукции и метаморфизации, которые способствовали предельному упрощению морфологического строения луковичных растений (Серебряков, 1952). Все экологические и морфологические особенности детерминировали специфический цикл развития луковичных растений.

Рост и развитие луковичных растений четко синхронизированы с сезонными изменениями климата, так как эволюция геофитов прошла путь длительного приспособления к климатическим условиям средиземноморского типа. Такой тип характеризуется резко отличающимися периодами: жарким засушливым летом и холодной зимой, прерываемыми влажной, теплой весной и осенью.

Несмотря на ряд незначительных индивидуальных особенностей, почти все луковичные растения имеют в общих чертах однотипный цикл развития.

В годовом цикле развития луковичных растений ясно выражены совпадающие с сезонами года 4 периода: покоя – отсутствие внешних признаков жизнедеятельности, внутренний морфогенез вегетативных и генеративных органов (лето); выхода из покоя – корнеобразование и рост вегетативных и генеративных органов внутри луковицы (осень); вы-

нужденного покоя – торможение процессов жизнедеятельности в луковице (зима); активации роста и цветения с последующим плодоношением (весна).

Таким образом, цикл развития луковичных растений характеризуется выраженной ритмичностью процессов роста и морфогенеза. Эта ритмичность выработалась в процессе эволюции геофитов как необходимое приспособление к сезонным изменениям климата и позволяет синхронизировать жизнедеятельность организма с условиями среды.

Проблема гормональной регуляции регенерации луковичных растений *in vitro*

В основе микроразмножения *in vitro* лежит процесс регенерации, который имеет большое теоретическое и практическое значение (особенно для плодоводства, лесоводства, овощеводства и декоративного садоводства). Вопросы вегетативного размножения растений являются составной частью общепромышленной проблемы регенерации (Кренке, 1950; Токин, 1959; Дубровицкая, 1961; Синног, 1963; Юсуфов, 1982).

На практике применяют следующие способы вегетативного размножения (Турецкая, Поликарпова, 1968): использование апомиктических семян (у цитрусовых); размножение специализированными вегетативными структурами: усы (земляника), луковицы (тюльпаны), клубнелуковицы (гладиолусы, крокусы), корневища (ирисы), отпрыски (краснодер), стеблевые клубни (картофель), клубнеподобные корни (батат); искусственные способы, обеспечивающие регенерацию придаточных корней или побегов – размножение отводками (регенерация из неотделенных от материнского растения частей), черенкование (регенерация из отделенных от материнского растения частей); прививка (соединение частей растений на основе регенерации тканей); культура изолированных органов и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях.

G.Haberlandt (1902) впервые применил метод культуры ткани на растительных объектах. Большая заслуга принадлежит и Ф.Р.Уайту (1949). Их исследования слу-

жат руководством при использовании метода культуры тканей на растительных и животных объектах (Haberlandt, 1902; Уайт, 1949; Gautheret, 1959). Р.Г.Бутенко (1964), Ф.Л.Калинин с соавт. (1980) обобщили теоретические достижения и методические рекомендации по культивированию растительных клеток, тканей, органов (Культура клеток растений, 1981).

Культура клеток и органов — уникальная система для изучения клеточной дифференциации, гистогенеза, органогенеза и других морфогенетических процессов (Понтович, 1979; Fosket, 1979; Hicks, 1980; Homes, 1980; Zbell, 1980; Демкив, 1981; Thanh, 1981; Thorpe, Biondi, 1981). Она открывает новые блестящие возможности в генетике соматических клеток (Глеба, Сытник, 1982). Метод культуры тканей наглядно и убедительно доказывает тотипотентность в реализации генетической информации растительной клетки. При этом рост и развитие органа могут быть изучены с минимальным наложением коррелятивных влияний, имеющих место в целом организме (Murashige, 1977).

Метод культуры клеток и тканей особо интересен для прикладных целей, прежде всего для клонального микроразмножения растений (Bonga, 1977; Holdgate, 1977; Shaeffer, 1977; Лейке и др., 1980; Marrou, 1980; Minier, 1980; Murashige, 1980; Oudin, 1980; Zimmer, 1980; Debergh, Maene, 1981; Lachary, 1981; Schmid, Keller, 1981; Wolfgang, Brian, 1981; Бутенко, 1982, 1983).

По сравнению с традиционными методами размножения, используемыми в сельскохозяйственной практике, клональное микроразмножение растений в культуре тканей обладает рядом преимуществ (Beauchesne, 1980; Катаева, Аветисов, 1981): коэффициент размножения в последнем случае гораздо выше, чем при обычных методах; можно поддерживать рост растений круглый год; метод размножения *in vitro* очень экономичен, тысячи растений можно выращивать на относительно небольшой лабораторной площади; наряду с размножением часто происходит оздоровление расте-

ний от вирусов и патогенных микроорганизмов; методом культуры тканей возможно выращивать растения, которые с трудом или совсем не размножаются вегетативно.

Говоря о вегетативном микроразмножении растений в культуре тканей, прежде всего важно уточнить тот путь, по которому нужно следовать для получения целых растений-регенерантов. Существуют два типа микроразмножения: культура меристемы и культура каллуса (Beauchesne, 1980). При использовании культуры меристемы рост тканей происходит так, что эпидермис остается сплошным и придаточные образования не возникают. Источником меристемы может служить зародыш или верхушка побега (почка, верхушка уса, верхушка стебля и т.п.) вместе с зачаточными листьями. Меристема обычно бывает свободна от патогенов, в том числе вирусов. На этом основано применение культуры меристемы для получения здоровых клонов различных декоративных растений (гвоздики, хризантемы, орхидеи), а также картофеля. Культура каллуса включает рост ткани и дифференциацию органов, что в конечном итоге должно привести к образованию вполне развитого растения. Так, из одного кусочка ткани массой в несколько миллиграмм можно получить десятки тысяч растений. Этот путь привлекает многих исследователей, в частности группу французских ученых (Beauchesne, 1980), пытающихся разработать приемы клонирования трудноразмножающихся либо вообще не размножающихся вегетативно растений (например, финиковой пальмы).

Исследования клонального микроразмножения декоративных растений, в том числе луковичных и клубнелуковичных растений, относящихся к классу однодольных, широко ведутся во многих лабораториях мира. До недавнего времени однодольные растения считались материалом, трудно поддающимся культивированию *in vitro* (Hunault, 1979). Например, R.Gautheret (1959) среди 142 видов высших растений, описанных им в качестве пригодных для тканевой культуры, упоминает только 13 видов однодольных. Однако в последнее время методом тканевой культуры успешно размножены злаковые (пшеница, овес, рис, сахарный тростник, сорго), а также некоторые луковичные и клубнелуковичные растения.

В лаборатории культуры тканей и морфогенеза ИФР АН СССР ведется работа по оптимизации условий микроразмножения фрезии с применением методов математического планирования экспериментов (Катаева, Голикова, 1983). Начато производственное оздоровление фрезии методом меристемных культур в г. Огре (Вилчане, Земите, 1983). В ГБС АН КазССР проводятся исследования по разработке приемов клонального микроразмножения в целях сохранения генофонда редких и исчезающих видов луковичных растений (Рахимбаев и др., 1983). В Институте горного садоводства и цветоводства в Сочи ведутся работы по культивированию *in vitro* ирисов, нарциссов, тюльпанов (Выхристова, 1979, 1981).

Гиацинт – удобный объект для изучения процессов роста и регенерации *in vitro*, так как его луковичные чешуи чутко реагируют на изменение внутренних и внешних факторов. Метод культуры ткани применяется для изучения формирования и роста бульбочек на изолированных сегментах чешуй гиацинта с 1968 года. Исследование различных факторов на процесс регенерации изолированных луковичных чешуй гиацинта (*Hyacinthus orientalis* L.) детально описано R.Pierik, M.Ruibing (1973). При этом в качестве основных критериев, характеризующих процесс регенерации, были названы способность эксплантатов к формированию лукович, количество лукович, приходящихся на 1 эксплантат, и масса образовавшихся на эксплантате лукович.

Первоначально возник вопрос, влияет ли продолжительность хранения на регенерационную способность изолированных чешуй гиацинта. Было отмечено, что число сформированных на эксплантате бульбочек не зависит от сроков хранения, однако масса луковичек постепенно увеличивается с удлинением периода хранения с оптимумом, приходящимся на первые две недели октября.

Пока трудно объяснить изменчивость регенерационной способности лукович одного и того же клона и даже имеющих одинаковые размеры. R. Pierik, M.Ruibing (1973) при сравнении регенерационной способности 7 отдельных лукович гиацинта показали, что все параметры по

регенерации и росту сильно варьируют у разных лукович. Авторы отмечают, что очень рискованно считать равноценными в отношении регенерационной способности лукович одного и того же клона, даже одинаковые по размерам и времени сбора. Далее они сравнивали регенерационную способность чешуй лукович гиацинта различного физиологического возраста. В опыте для удобства все луковичные чешуи объединили в 3 группы (счет велся от центра к периферии): с 1 по 6, с 7 по 12 и с 13 по 18. В результате проведенных экспериментов установлена зависимость увеличения скорости регенерации от возрастания порядкового номера чешуи (4 и 8 нед культивирования). Это различие стиралось спустя 12 нед культивирования. Однако масса бульбочек у молодых чешуй (с 1 по 6) была значительно ниже, чем у старых (с 7 по 12 и с 13 по 18).

Происхождение эксплантатов влияет на их регенерационную способность. В результате сравнения поведения эксплантатов, взятых из верхней и нижней частей чешуй гиацинта, R.Pierik и M.Ruibing показали, что скорость регенерации и количество бульбочек на 1 эксплантат, а также их масса в более верхних частях резко уменьшались по сравнению с нижними. Эти данные согласуются и с более поздними работами, проведенными на эксплантатах чешуй гиацинта (Paek, Kee, 1982).

R.Pierik, A.Post (1975) показали, что интенсивность размножения *in vitro* в большой мере зависит от способа деления эксплантата. Так, основными требованиями для лучшей регенерации и роста луковичек гиацинта являются наличие базальной части чешуи, относительно малая ширина и большая длина эксплантатов. Рост новообразованных луковичек гиацинта зависит от размеров эксплантатов, следовательно, от общего содержания питательных веществ и каких-то других, еще неизвестных компонентов, содержащихся в эксплантатах. Количество формирующихся луковичек на 1 эксплантат возрастает почти линейно при увеличении длины эксплантата. По мнению авторов, существуют какие-то "факторы регенерации", их распределение по всей луковичной чешуе хаотично, неравномерно, т.е.

прирост массы луковичек достигает максимума при длине эксплантата 2 – 3 см, минимума – при длине 3 – 4 см.

Метод культуры гиацинта *in vitro* позволяет регулировать число и массу луковичек, образующихся на эксплантатах. Так, большое число мелких луковичек может быть получено из эксплантатов шириной 0,5 см и малое число крупных луковичек – из эксплантатов шириной 1 – 1,5 см при постоянной длине эксплантатов.

На основе своих опытов авторы предложили эффективный метод ускоренного вегетативного размножения гиацинта, с помощью которого из сегментов чешуй длиной 3–4 см и шириной 0,5 см через 12 нед получили 240–300 лукович-регенерантов.

R.Pierik, M.Ruibing (1973) также изучили влияние ориентации эксплантата чешуи гиацинта на ее регенерационную способность. Для этого сегменты чешуи помещали на питательную среду базальными концами либо вниз, либо вверх (перевернутые эксплантаты с обращенной полярностью). В первом случае количество луковичек на эксплантат было 1,2, во втором – 1,7. При этом сырая масса луковички у эксплантата с нормальной полярностью составляла 18 мг, с обращенной – 31 мг. Регенерационные и ростовые параметры были значительно выше у перевернутых эксплантатов. Подобный "эффект ориентации" описан и для изолированных сегментов чешуй лилии (Robb, 1957) и гиацинта (Paek, Kee, 1982). Одним из объяснений этого явления может быть лучшее снабжение кислородом базальных концов у перевернутых эксплантатов или более эффективное поступление гормональных и трофических веществ. У эксплантатов, помещенных на среду базальными концами вниз, происходит, по-видимому, истощение необходимых питательных веществ вследствие перехода их в агар.

Явление полярности луковичных чешуй гиацинта исследовал и S.Tamura (1978). Он показал, что при культивировании чешуй гиацинта на питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) с добавлением 0,01 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л БАП происходило образование адвентивных почек на эпидермисе с внешней стороны чешуи. Если эпидермис культивировался отдельно от всей чешуи, то образования почек не

происходило, тогда как сама чешуя без эпидермиса могла образовать каллус или придаточные корни. Итак, способность формировать адвентивные почки зависела от положения чешуи при посадке в среду. Кроме того, вероятно, локализация эндогенных ауксинов и цитокининов имеет важное значение в образовании адвентивных почек на чешуе луковички гиацинта; существует полярность между внешним и внутренним эпидермисом, которую, однако, можно устранять некоторыми веществами.

Очень мало известно о физических, трофических и гормональных факторах, действующих на рост и регенерацию изолированных частей луковичных растений. R.Pierik, J.Woets (1971) изучали влияние состава среды и отдельных гормонов на регенерационную способность изолированных чешуй лукович гиацинта. Они показали, что хотя степень регенерации (число эксплантатов с регенерировавшими бульбочками) сильно зависит от состава и концентрации макроэлементов, продуктивность (масса луковички) выше на среде Кнопа и Хеллера с половинной нормой макроэлементов. При этом концентрация глюкозы не играет существенной роли. Регенерация усиливается при возрастании концентрации НУК ($0-10^{-5}$ г/л) в питательной среде, в то время как продуктивность луковичек не изменяется. Высокие концентрации кинетина снижают продуктивность бульбочек, т.е. образуются луковички с меньшей массой. Регенерация и продуктивность луковичных чешуй гиацинта снижаются при добавлении в среду гибберелловой кислоты. Однако авторы не учитывали фактор взаимодействия гормонов, его влияние на регенерацию луковичек. Такую работу проводили M.Saniewski e.a. (1974), R.Rundnicki (1979), которые изучали совместное действие ауксина и цитокинина на процесс регенерации луковичек гиацинта в культуре ткани. Исследования показали, что регенерация корней и луковичек зависит от уровня регуляторов роста в среде. Оптимальное сочетание для заложения луковичек 1 ppm НУК и 10 ppm БАП (среда МС).

Не только луковичные чешуи, но и ткани генеративных органов гиацинта обладают высокими морфогенетическими

потенциями в культуре *in vitro* (Kim, 1981; Paek, Kee, 1982). Цветочные почки и отрезки цветоноса культивировали на среде МС. Через 6 нед на среде, содержащей по 0,3 мг/л НУК и БАП, на поверхности среза цветочных почек формировались луковички. Для дальнейшего развития луковички пересаживали на среду, содержащую БАП (без БАП луковички не развивались). Для стимуляции корнеобразования в среду добавляли 0,1 мг/л НУК. В этих условиях наблюдалось успешное развитие растений, 90-100% их было пригодно для пересадки в почву. Данный способ позволяет получить до 1 тыс. растений от 1 соцветия (Kim, 1981).

R.Pierik, M.Ruibing (1973) также изучали действие физических факторов на регенерационную способность луковичных чешуй гиацинта. Отмечено увеличение скорости регенерации при повышении температуры от 8,8 до 24,8°C. Количество бульбочек на эксплантат максимально при 13°C, оптимальный рост бульбочек - при 21,6°C. Авторы не наблюдали никаких различий в регенерации и росте бульбочек при культивировании эксплантатов как при постоянном освещении, так и в темноте.

Исследование влияния светового режима на регенерационную способность луковичных чешуй лилии (Stimart, Ascher, 1978) показало, что из луковицы лилии (*Lilium longiflorum*), состоящей из 100 чешуй, можно получить более 8 тыс. деток через 6 нед культивирования. При этом в темновой культуре при 25°C увеличивается количество и размер луковичек за счет уменьшения числа и размера листьев. Культура с 16-часовым периодом освещения и 8-часовым темновым периодом при той же температуре подавляет развитие луковицы, но стимулирует листообразование, увеличивает массу корней и каллуса.

Однако новообразование листочков из луковичек, полученных *in vitro*, в темноте при 25 или 30°C, может усиливаться (Stimart e. a., 1982). При этом луковички, выращиваемые при 25°C, требовали более длительной обработки температурой 45°C или красным светом. С другой стороны, луковичкам, выращиваемым при 30°C, требова-

лась инкубация при температуре 4°C. В опытах с постоянным освещением (25°C) предварительное выдерживание луковиц при 5°C перед введением в изолированную культуру значительно усиливало частоту образования адвентивных чешуй (Takayama, Misawa, 1983 a).

Низкие концентрации НУК ускоряли процесс регенерации, число растений и рост луковиц на эксплантатах чешуй луковиц лилии, а высокие дозы ауксинов угнетающе действовали на их регенерационную способность. При этом цитокинины не влияли на регенерационные процессы, но приводили к нарушениям роста (Aartrijk, Blom-Barnhoorn, 1979, 1981). В других работах по клональному микроразмножению лилий показано стимулирующее действие цитокининов на образование многочисленных зачатков чешуй. Последующий рост и формирование луковичек происходили при переносе чешуй в жидкую среду без цитокининов (Takayama, Misawa, 1982, 1983 b).

Особо интересны опыты по микроразмножению ценных клонов гибридов лилии (Holden, 1978; Stimart e. a., 1980; Novak, Petru, 1981). В качестве эксплантатов использовались чешуи, листья и завязи, культивируемые на среде Линсмайера-Скуга. Большинство вновь сформированных растений зацветало уже на второй год. Показана возможность получения и растений-регенерантов в культуре каллусной ткани лилии (Kubitz, 1979).

S.Robb (1957) отмечал, что эксплантаты луковичных чешуй лилии, изолированные весной и осенью, регенерируют легче, чем изолированные летом и зимой. Сезонные колебания в образовании луковичек *in vitro* коррелируют со стадиями развития лилии, способность к регенерации ограничивается периодами вегетативного роста. При этом молодые и старые чешуи лилии обладают одинаковой регенерационной способностью. S.Takayama, M.Misawa (1980), напротив, установили, что внешние луковичные чешуи старых луковиц лилии (возраст 70 сут) обладают невысокой способностью к дифференциации луковиц. Наиболее эффективными в этом отношении были чешуи молодых (возраст 20 сут) луковиц или внутренние чешуи более

старых. На образование корней в культуре *in vitro* возраст луковиц не влиял.

Ткани некоторых луковичных растений из сем. Liliaceae образуют побеги (почки) в культуре *in vitro* довольно легко, например у гиацинта, лилии. Напротив, из тканей взрослого растения тюльпана очень трудно получить *in vitro* побеги, способные развиваться в молодые луковички. В случае использования эксплантатов из мясистых чешуй, листьев, цветоноса, цветка (Bancilhon, 1974; Hussey, 1975; Nishiuchi, Myodo, 1976) удалось получить новообразования типа почек. Однако формирование корней отмечалось только у сорта *Apeldoorn* спустя длительный срок культивирования (Nishiuchi, Myodo, 1976). К сожалению, превращения адвентивных почек в луковицы не происходило.

Вегетативное размножение тюльпана *in vitro* возможно благодаря использованию в качестве эксплантатов чешуек главной дочерней луковицы, изолированной в зимний период, с января по март (Riviere, Muller, 1979). Молодая луковица в зимний период состояла из 3-4 чешуй с низким содержанием крахмала. Еще R. Buvat (1944) показал, что этот признак благоприятствует дедифференциации клеток, формированию каллусных тканей и возникновению меристематических очагов с высокой митотической активностью. S. Riviere, J. Muller (1979) изолировали в стерильных условиях 3 наружные чешуи из луковицы. Их отделяли выше места прикрепления к донцу, не повреждая его тканей. Каждую чешую делили на 2 симметричные части и такие получешуи помещали на питательную среду следующего состава: раствор макроэлементов; раствор микроэлементов (Murashige, Scoog, 1962); модифицированный раствор витаминов (Morel, Martin, 1955); глюкоза 40 г/л; агар 7 г/л; ростовые вещества: НУК и БАП по 0,1 мг/л. Эксплантаты культивировали при постоянной температуре 23°C и освещении 1500 лк при 16-часовом фотопериоде до получения сформированных почек.

Когда у молодых почек появлялись 2-3 зачаточные чешуи, их пересаживали на ту же среду, но без НУК и БАП,

и выдерживали при температуре 5°C в течение 2 мес, чтобы вызвать образование луковиц (Le Nard, Cohat, 1968; Le Nard, 1972). По истечении холодного периода культивирование продолжали при 23°C до окончательного формирования луковиц. Такие луковицы способны продолжить свое развитие в открытом грунте.

Максимальная способность к новообразованию органов наблюдается у тканей, происходящих либо от генеративных органов, либо расположенных вблизи них (Bancilhon, 1974). Итак, способность к образованию почек у изучаемого эксплантата тюльпана можно объяснить тем, что он принадлежит главной дочерней луковице, расположенной у основания цветоноса. Однако чешуи самых наружных пазушных почек, расположенных далеко от генеративных органов, культивировали также, как и чешуи главной дочерней луковицы. Между этими двумя типами чешуй не обнаружены никакие различия, но на практике преимущественно используют главную дочернюю луковицу, которая имеет естественную защиту от заражения в виде сочных чешуй материнской луковицы. Наружная пазушная почка требует более тщательной стерилизации, что приводит к повреждению и порче материала (Riviere, Muller, 1979).

Рассмотрим особенности микроразмножения некоторых амариллисовых *in vitro* (Tompsett, 1973; Hollings, 1974; Фурманова, Олендзкая, 1979; Nel, 1981; Steinitz, Yahel, 1982; Попов, Черкасов, 1983).

L. Seabrook с соавт. (1976, 1982) сообщают о быстром размножении нарцисса *in vitro* из оснований листьев, перевернутых сегментов стебля, завязи. Основные требования для культивирования эксплантатов *in vitro* следующие: питательная среда МС с добавками органических компонентов (Ziv et al., 1970) и ростовых веществ, концентрации которых значительно выше, чем описанные до сих пор для других растений, культивируемых *in vitro*. Так, новообразование побегов нарцисса индуцировали на среде, содержащей 10 мг/л БАП и 1 мг/л НУК. Образованные растения хорошо росли при переносе на среду с 2 мг/л БАП и 2 мг/л НУК. Индукция корней происходила

при половинном количестве солей и сахарозы и исключении из среды регуляторов роста. Зачатки корней формировались на среде, содержащей 0,5–4 мг/л БАП и 4–20 мг/л НУК. При этом основным критерием дифференциации клеток и органо-генеза являлось соотношение цитокинина и ауксина в питательной среде. Корни могут индуцироваться только тогда, когда молярное отношение цитокинина к ауксину составляет 1:1 или несколько меньше. Побеги же индуцируются при молярном отношении цитокинина к ауксину 10:1 и больше.

Данный метод позволил получить 2620 растений нарцисса из 2 кусочков листовых оснований размерами 2 x 10 мм через 5 мес культивирования *in vitro*. При этом луковицы, обработанные холодом (6–8 нед при 11°C), служили более благоприятным материалом по сравнению с покоящимися луковицами.

Г.И.Выхристова (1983) сообщает о неодинаковой реализации морфогенетических потенций различных типов тканей нарцисса, в значительной степени обусловленной генотипом. При изучении регенерационной способности разных сортов нарцисса автор указывает на пути их морфогенеза: из ткани основания листьев, завязи и донца – через каллус (2 сорта) и через разрастание ткани (3 сорта); из ткани цветоноса через каллусообразование, сопровождающееся одновременным разрастанием ткани.

Т.Носоки, Т.Асахира (1980) показали, что не только листья, но и эксплантаты из молодых цветоносов нарцисса способны к образованию адвентивных почек на среде МС с 5 мг/л БАП и 1 мг/л НУК. При перенесении образующихся побегов на среду, содержащую только НУК (0,1 мг/л), наблюдали формирование корней и луковиц. Таким способом можно получить около 140 вновь образованных луковиц от 1 исходной материнской луковицы нарцисса за 4 мес. Авторы связывают высокую потенциальную способность молодых цветоносов и базальных частей листьев формировать адвентивные побеги с распределением интеркалярных меристем.

Для индукции каллуса и органо-генеза сегменты стебля нарцисса должны быть перевернуты (Seabrook e.a., 1976). Это явление, видимо, связано с полярным тран-

спортом ауксина, имеющим место в данных тканях. То же показано ранее на отрезках цветоноса гладиолуса (Ziv e.a., 1970) и аспарагуса (Takatori e.a., 1967).

Эффективный метод размножения нарцисса *in vitro* предложен G.Hussey (1982), которому удалось вызвать формирование адвентивных побегов при культивировании эксплантатов листьев, чешуй и стеблей из базального участка донца луковиц нарцисса на среде МС с 2–16 мг/л БАП и 0,25–4 мг/л НУК. Полученные побеги в свою очередь разделяли для индуцирования новых побегов. Мощность роста первого поколения побегов была пропорциональна уровню использованных гормонов. Все побеги постепенно снижали темп роста, старели и формировали покоящиеся луковицы. Этим методом в течение 18 мес из 1 луковицы можно получить 500–2000. Цитологические наблюдения показали, что у парных чешуй и рассеченных побегов адвентивные побеги формировались, по меньшей мере, из 2 поверхностных слоев меристематических клеток, прилегающих к донцу. Автор считает, что многоклеточное происхождение формирующихся *in vitro* растений предполагает их генетическое однообразие так же, как при естественном вегетативном размножении.

Успешны и опыты по микроразмножению *in vitro* гиппеаструма (Mill e.a., 1974; Yanagawa, Sakanishi, 1977; Jana, 1981). М. Mill с соавт. (1974) изучали регенерационную способность эксплантатов из различных органов, в частности чешуй луковицы гиппеаструма. В качестве эксплантатов использовали средние части чешуй, исключая донце и соединительные ткани. Вырезанные диски помещали на питательную среду МС, дополненную НУК и кинетином в различных концентрациях. Изолированные чешуи луковицы гиппеаструма образовывали почки и корешки. Тип органо-генеза определялся концентрацией НУК в среде. Кинетин оказался не только малоэффективным, но даже токсичным при высоких концентрациях. R.Pierik, J.Woets (1971) также наблюдали неэффективность действия кинетина на органо-генез изолированных чешуй глацинта. Возможно, ткани эксплантата уже содержали доста-

точное количество эндогенного цитокинина, но не ауксина, поэтому обработка ауксином может быть благоприятной для индукции органогенеза. Происходило формирование бульбочек из нижних частей чешуй, прилегающих к тканям донца; средние части чешуй также способны к органогенезу *in vitro* (Mill e.a., 1974). Так, первые корешки отмечены на среде МС с 5 ppm НУК и 1 ppm кинетина, первые почки – при добавлении в среду 5 ppm НУК и 10 ppm кинетина. Успешные результаты получены только осенью, в сентябре, что может быть связано с сезонными колебаниями физиологического состояния используемого материала, как показано для лилии (Robb, 1957).

Х.А.Мауриня и соавт. (1983) показали, что рост и развитие регенерировавших луковиц гиацинта в культуре *in vitro* зависели от этапов периода покоя во время взятия эксплантатов. Это связано, по-видимому, с различной активностью ИУК и АБК в разные периоды покоя.

Культура изолированных тканей – удобный объект для использования в селекции растений. Большое количество экспериментальных работ посвящено изучению возможности применения этого метода в селекции некоторых дикорастущих и культурных видов лука (Fridborg, 1971; Duns-
tan, Short, 1977; Kunimitsu e.a., 1977; Lee e.a., 1977; Hussey, 1978; Tizio, 1979; Laroche, Verhoyen, 1980; Каменецкая, 1982; Каменецкая, Рахимбаев, 1982; Гавел, Новак, 1983). Установлено, что клональное микроразмножение луков зависит от содержания БАП и НУК в питательной среде, возраста растения, из которого брали эксплантат, и генотипа этого растения.

Рассмотрим некоторые эксперименты по микроразмножению *in vitro* растений из сем. Iridaceae. М. Ziv с соавт. (1970) изучали регенерацию органов и целых растений гладиолуса в культуре тканей. Первоначально в качестве эксплантатов брали апикальные части главной почки клубнелуковицы, участки междоузлий, проводящие ткани и расположенные ниже главной почки, цветоносы. Использовали питательную среду МС с добавками НУК и кинетина в качестве регуляторов роста. Хорошее каллусо-

образование отмечено при выращивании апексов главной почки на среде, содержащей 5 ppm НУК и 0,5 ppm кинетина.

Регенерация органов происходила только на эксплантатах цветоносов. У дисков цветоносов, помещенных на среду морфологически верхним концом (среда содержала 10 ppm НУК и 0,5 ppm кинетина), через 1 нед наблюдали образование каллуса у основания, через 3–4 в каллусе формировались эмбриониды. Диски, посаженные на среду морфологически нижним концом, давали сходные результаты, но эмбриониды формировались медленнее. Важно отметить, что чем ниже концентрация НУК, тем меньше интенсивность дифференцировки, приводящая к соматическому эмбриогенезу. Большинство эмбрионидов затем развивалось в корни, несколько эмбрионидов – в структуры, сходные со столонами и имеющие образования, похожие на клубнелуковицы.

Положение эксплантата определяло тип развивающегося побега. Если корневой примордий при пассировании оказывался вверху, то через 60 сут 1–2 почки пробивали агар и выходили на поверхность, изменяя положение эксплантата. В случае пассирования культуры корневыми примордиями вниз развивалась группа клубнелуковиц и 1–2 побега (почки). Каждый эксплантат давал почки и клубнелуковицы. Их отделяли, каждый побег рассаживали на среды, содержащие 0,5 ppm НУК, для повторного корнеобразования, так как старые корни темнели и отмирали. Почки и клубнелуковицы с развивающимися на них корнями в дальнейшем пересаживали на среды, содержащие по 0,5 НУК и кинетина. Содержимые сахарозы при этом было снижено до 2%. В последующем ростовые вещества исключали полностью, а количество сахарозы уменьшали до 1,5%. Растения с хорошо развитыми листьями и корнями пересаживали в грунт.

С. Ginzburg М. Ziv (1973) изучали гормональную регуляцию вторичного побегообразования на столонах гладиолуса *in vitro*. Испытывали взаимодействие 4 регуляторов: кинетина НУК, гибберелловой кислоты (ГК), абсцизовой кислоты (АБК). Изменения в поведении эксплантатов при культивировании на среде без регуляторов роста и содержания ГК и АБК не обнаружены. Добавление только,

НУК (0,5 - 5 мг/л) вызвало каллусообразование. Хотя зачатки корней и побега появлялись, формирование вторичного побега или удлинение столона не наблюдалось. Только кинетин вызывал дифференциацию побега на эксплантате верхушек столонов. Сочетание НУК с кинетином индуцировало побегообразование и рост, причем комбинация 2 гормонов оказывалась более эффективной по сравнению с действием одного кинетина. Вторичные побеги были окружены чешуеподобными листьями и со временем превращались в клубнелуковицы. При изучении действия ингибиторов на клубнеобразование гладиолуса отмечено, что вторичное побегообразование, индуцируемое кинетином, не подавляется при внесении в питательную среду АБК, однако рост побега при этом задерживается. Авторы указывали на тройной эффект гиббереллина на изолированные сегменты столонов гладиолуса: ингибирование развития вторичного побега; удлинение листовой пластинки; увеличение длины столона. Причем действие ГК проявляется только в присутствии кинетина. Проведенные анатомические исследования показали, что побеги, образованные *in vitro* и *in vivo*, не различаются по своей структуре.

G.Simonsen, A.Hildebrandt (1971) детально изучали рост и дифференциацию растений гладиолуса из каллусной культуры. Предложенный ими метод позволяет получать безвирусные растения при культивировании верхушек столонов гладиолуса, формировании каллуса на эксплантатах и последующей индукции органогенеза.

Эффективный способ размножения гладиолуса *in vitro* с помощью быстрого формирования пазушных побегов предложен G.Hussey (1977). У луковиц гладиолуса изолировали половинные нормы солей по МС. Побеги из пазушных почек лучше всего развивались при содержании в среде 0,12-0,5 мг/л БАП. Добавление в среду НУК ингибировало рост побегов, а в концентрациях, равных концентрациям БАП, приводило к образованию каллуса. Пассирование образующихся растений на средах с БАП предотвращало наступление покоя.

Растения, не пересаженные на свежие среды, постепенно впадали в состояние покоя и образовывали луковицы. Из 1 пазушной почки этим методом можно получить за год до 500 растений.

Для изучения морфогенетических потенций изолированных тканей гладиолуса в качестве эксплантатов использовали также сегменты соцветий, цветоноса (стержня колоса), околоцветника, прицветников пыльников, листьев и дочерних луковиц (Bajaj, 1983). Все испытанные ткани и органы обладали высокой каллусообразующей способностью на среде МС с добавлением НУК и кинетина. Максимальной способностью к регенерации побегов обладали сегменты цветоноса. Полную регенерацию растений наблюдали у эксплантатов дочерних луковичек. От сегментов 1 дочерней луковицы получено в среднем 6 растений, а при обычном размножении образуется только одно. При культивировании пыльников происходило образование каллуса и листовидных структур, изредка - многоклеточной пыльцы.

Л.С.Лунева (1977) изучала микроразмножение в культуре тканей 5 видов ириса. Для получения каллусной ткани апикальные меристемы боковых почек необходимо выращивать на среде МС, содержащей 0,3 мг/л кинетина и 1,0 мг/л НУК, в полной темноте и при постоянной суточной температуре $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Выращивание кусочков каллусной ткани этих же ирисов на среде МС, содержащей 0,3 мг/л кинетина и 0,6 мг/л НУК, при 16-часовом световом периоде и с постоянной суточной температурой $11 \pm 2^\circ\text{C}$ способствовало нормальному прохождению органогенеза.

Размножение ириса с помощью метода культуры апикальных меристем проводилось и в целях получения безвирусных растений (Baruch, Quak, 1966).

R.Doss, J.Christian (1979) изучали влияние размера луковиц на закладку цветка при размножении луковичных ирисов с помощью культуры меристем. Исследования показали, что эксплантаты апексов более крупных луковиц при культивировании на среде, содержащей ГК, закладывали больше цветочных побегов (70-73%), чем у луковиц меньшего размера (8-9%).

G. Hussey (1976 б) также разработал эффективный метод клонального размножения ириса в культуре тканей. Эксплантаты из цветоносов базальными концами помещали на питательную среду МС. Через 6 нед сегменты, помещенные на среду, содержащую НУК ($0,03 - 2,0 \text{ ppm}$), увеличивались в размерах. Поверхность эксплантатов покрывалась маленькими, тесно расположенными бугорками, часть которых через 4 нед превращалась в миниатюрные луковички-детки. На этой стадии эксплантаты пересаживали на свежую питательную среду, температуру в камере снижали с 25 до 18°C . 10-15 лукович-деток с каждого эксплантата впоследствии развивались в побеги, которые укоренялись на основной среде и давали жизнеспособные растения. Добавление кинетина в среду, содержащую НУК, несколько ускоряет развитие деток, не влияя на их количество. На среде, содержащей только кинетин, луковички не образуются. При помощи этого метода из 1 эксплантата можно получить до 96-100 растений. При создании благоприятных условий, когда большая часть деток сможет развиваться в жизнеспособные растения, количество их может возрасти до 1000 и более.

Возможности использования метода культуры тканей для вегетативного размножения фрезии изучали T. Bajaj, R. Pierik (1974). Ранее в литературе упоминалось о размножении фрезии *in vitro* (Davies, Griffiths, 1971; Davies, Helsop, 1972; Hussey, Wyvill, 1972). Однако конкретно не указывались состав сред и условия культивирования эксплантатов.

T. Bajaj, R. Pierik (1974) акцентировали внимание на изучении условий индукции каллусообразования, поддержания роста каллуса, регенерации целых растений из различных частей фрезии. Фрезия обладает огромной способностью к регенерации *in vitro*. Из изолированных сегментов клубнелуковицы, листьев, черенков, цветочных почек и пыльников был индуцирован каллус на модифицированной среде МС. Высокой каллусообразующей способностью обладали молодые цветочные почки. Каллусообразование происходило в темноте, причем наиболее эффективным для

индукции каллуса являлось сочетание НУК (5 мг/л) и 6-(бензил)-амино-9-(2-тетрагидропиранил)-9Н-пурина (ПБА) (2 мг/л). Каллус, успешно индуцированный и поддерживаемый в культуре, в дальнейшем мог перейти к морфогенезу и дать целые растения. Регенеранты образовывались на свету при пассировании каллуса на безауксиновую среду, содержащую кинетин или ПБА. Растения регенерировали также из молодых пыльников. Тип органогенеза сильно зависел от соотношения ауксина и цитокинина в среде. Например, пролиферация пыльника на среде, содержащей $0,5 \text{ мг/л}$ НУК, 2 мг/л ПБА и 1 мг/л кинетина, приводит к дифференциации побегов, которые в дальнейшем развиваются в растения. Ризогенез в культуре пыльников из раскрытых цветков отмечается при культивировании их на среде с $0,2 \text{ мг/л}$; 2,4-Д; $0,2 \text{ мг/л}$ НУК; 2 мг/л кинетина. В данном случае ауксины способствовали корнеобразованию, цитокинины - формированию почек. Свет по сравнению с темнотой стимулировал образование корней и почек, а рост каллуса на свету тормозился.

Остановимся подробнее на регенерации растений фрезии из цветочных почек в культуре *in vitro* (Pierik, Steegmans, 1975; 1976). Условия культивирования следующие: среда МС, НУК 1 мг/л , цитокинин ПБА 5 мг/л (среда I). Из культуральной среды после регенерации и развития побегов исключают ПБА, а содержание НУК снижают до $0,1 \text{ мг/л}$ (среда II). В течение первых 8 нед пробирки с цветочными почками содержат при температуре 25°C в темноте, в ходе последующих 8 нед - при 23°C и постоянном освещении. Через 16 нед изолированные побеги пересаживают на среду II, культивируют при 23°C и постоянном освещении.

Опыты показали необходимость чередования светового и темнового периода при регенерации адвентивных почек для их дальнейшего нормального роста и развития. Побеги, укорененные на среде с добавлением $0,1 \text{ мг/л}$ в НУК, давали нормальные жизнеспособные растения, которые можно переносить в открытый грунт. Исследователи установили, что эффективность метода зависит больше от сорта, чем от

соотношения ауксин : цитокинин. Влияние сорта, возможно, коррелирует с эндогенным содержанием цитокинина или ауксина (Pierik e.a., 1975).

Важные сведения получены Н.В. Катаевой (1981) при оценке генетических и эпигенетических потенций к морфогенезу у фрезии. Объектом исследования служили сегменты вегетирующих, хранящихся и воздушных клубнелуковиц, апикальные и пазушные почки клубнелуковицы, цветочные почки, зрелые цветы, пыльники, корни и каллус клубнелуковичного происхождения. Основная питательная среда включала минеральные соли МС.

Апикальные и пазушные почки клубнелуковиц образуют зеленые побеги на основной среде, содержащей разные концентрации цитокининов (0,1–20 мг/л). Автор указывает на существование различий в поведении апикальных и пазушных почек: из пазушных всегда образуется только 1 побег, из апикальных – в 30% случаев – 2–3.

Культивирование цветочных почек показало, что на среде с БАП (0,5 мг/л) и НУК (1 мг/л) происходит естественное развитие бутона и распускание цветка, который имеет нормальные для данного сорта окраску, форму лепестков и аромат. На среде с БАП (1 мг/л) и НУК (0,1 мг/л) цветочные почки легко укореняются, при этом образуются утолщения, часто с обращенной полярностью корня, идет значительный каллусогенез. Зрелые цветы с открытым венчиком способны создавать побеги, но трудно получить их стерильную культуру. На среде с БАП (5–10 мг/л) и НУК (0,1–1 мг/л) из цветоложа возникают 1–3 зеленых побега, а также многочисленные меристематические очаги и стеблевые апексы.

Использование нераспустившихся цветочных почек и культуры меристем фрезии позволяет получить свободный от вирусов посадочный материал в промышленных масштабах (Oertel, 1980).

Для изучения способности побегов фрезии, полученных *in vitro*, к снятию апикальной доминантности Н.В. Катаева (1981) использовала побеги, полученные из пазушных и апикальных клубнелуковичек, цветочных почек и каллуса пыль-

ников. Побеги, развившиеся из почек клубнелуковиц, на основной среде в присутствии цитокининов (0–20 мг/л) не образуют пазушных побегов. Побеги из цветоложа на основной среде с БАП (0,5–5 мг/л) начинают ветвиться. Автор считает, что происхождение побегов влияет на развитие пазушных почек меристем, причем побеги, происходящие из генеративных органов, способны ветвиться и образовывать пазушные побеги в отличие от побегов, происходящих из вегетативных органов.

Итак, отмечена очень высокая генетически обусловленная способность фрезии к различным формам морфогенеза в культуре *in vitro*. Наибольшим морфогенетическим потенциалом обладают репродуктивные органы, на что необходимо обратить внимание при разработке практических приемов размножения этого растения. Показана возможность следующих способов размножения: образование адвентивных побегов из ткани цветочной почки с последующей пролиферацией пазушных меристем; образование адвентивных побегов из ткани клубнелуковицы; образование и пролиферация каллуса с последующей дифференциацией стеблевых апексов.

Суммируя экспериментальные данные по выращиванию декоративных луковичных и клубнелуковичных растений *in vitro*, следует указать, что весь процесс клонального микроразмножения можно разделить на 4 этапа (Катаева, Аветисов, 1981):

- эксплантирование исходной ткани растения: необходимо получить культуру, свободную от инфекций, добиться выживания ее на питательной среде и обеспечить быстрый рост эксплантата;

- собственно микроразмножение, т.е. увеличение числа инициалей на эксплантате и образования из них побегов;

- укоренение размножающихся побегов и депонирование их в прохладном помещении: необходимо обеспечить развитие нормальной корневой системы, после чего растения либо подготавливают к высадке в почву, либо помещают на депонирование при пониженных температурах.

Последнее имеет очень важное значение, так как позво-

ляет задерживать развитие растений и таким образом сохранять их длительное время, используя по мере надобности;

– подготовка растений к высадке в почву – важный этап, которому часто не придают должного значения. Здесь проводят закалку растений, повышают их устойчивость к патогенным микроорганизмам и различным неблагоприятным факторам внешней среды, обычно при этом увеличивают интенсивность освещения и повышают влажность воздуха.

Таким образом, описанные примеры формирования органов в культуре ткани декоративных луковичных и клубнелуковичных растений обнаруживают исключительно большое разнообразие в отношении конкретно применяемых концентраций и соотношений фитогормонов. Не существует общей формулы в отношении концентраций гормонов и других эндогенных и экзогенных факторов. Ясно лишь, что создание подходящего уровня экзогенных гормонов – необходимое условие для получения и каллуса, и эмбриоида, и регенерации целого растения. Поэтому специальная среда, разработанная (эмпирически) для индукции дифференциации и органобразования у ткани одного вида, совсем не обязательно будет индуктивной в культуре ткани другого вида. Одна из главных причин такой вариабельности в ответе тканей на внешние гормональные факторы лежит в неодинаковой способности разных тканей синтезировать свои собственные эндогенные гормоны.

С другой стороны, морфогенетический потенциал культивируемых клеток зависит от генотипа. Морфогенетический потенциал в культуре тканей определяется предшествующей дифференцировкой всех клеточных элементов, составляющих исходный эксплантат.

Существуют уровни дифференцировки у высших растений, лимитирующие каллусообразование, в результате чего теоретически тотипотентное ядро оказывается неактивным. В процессе длительного культивирования формируются популяции клеток с перестройками ядра, которые также ставят "запреты" для вторичной дифференцировки и морфогенеза. Вследствие этого морфогенетический потенциал при культивировании утрачивается, большая роль здесь принадлежит селекции на уровне клеточных популяций (Дмитриева, 1981).

На процесс клонального размножения влияют полярность, источник (происхождение), размеры и физиологический возраст эксплантата. Регенерационная способность эксплантата в значительной степени зависит от таксономической принадлежности растения-донора. Эксплантаты, изолированные в фазу активного роста, обычно более склонны к укоренению побегов по сравнению с эксплантатами, изолированными в фазу покоя. Большое значение имеют температура и условия освещения (Борукаева, Смирнова, 1980). В некоторых опытах показано, что основной частью спектра, влияющей на морфогенез, является синий свет (Goring, Radke, 1980). Изучение морфогенетических потенций разных органов и тканей растения позволяет выявить оптимальную систему, метод и условия размножения *in vitro*.

Один из ведущих факторов, влияющих на процесс клонального размножения *in vitro*, – правильный подбор среды. Фитогормоны играют важную роль в индукции делений в клетках эксплантата, в образовании каллуса и морфогенеза. В связи с этим для микроразмножения каждого вида необходимо разработать специфические методические приемы культивирования *in vitro* и выявить оптимальное соотношение фитогормонов в питательной среде.

Таким образом, можно считать, что основные методические процедуры для клонального микроразмножения луковичных растений в культуре тканей в общих чертах разработаны. Более того, этот метод уже перешагнул порог лаборатории и превратился в биотехнологический прием, используемый в промышленном цветоводстве и овощеводстве для быстрого и массового размножения, оздоровления посадочного материала. Широкое применение находит метод культуры тканей также в селекционной практике и сохранении генофонда редких и исчезающих растений.

Глава 2

КАЛЛУСООБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТАТОВ

При культивировании эксплантатов *in vitro* зачастую образуется каллус, в основе возникновения которого лежит дедифференцировка клеток интактной растительной ткани.

Проявление способности к образованию каллуса изучали у эксплантатов апикальных и пазушных почек, корней, листьев, цветоноса, завязи, тычинок, пестика, лепестков шафрана. Эксплантаты после стерилизации культивировали на среде МС с добавлением регулятора роста. Для опытов использовали растения шафрана алауавского, ш.Королькова, находящиеся на различных этапах морфогенеза (Нурмуханбетова, Рахимбаев, 1982 а).

Первоначально в опытах использовали апексы верхушечных и боковых почек, культивируемые на основной среде в темноте и на 16-часовом световом периоде. Реакция эксплантатов следующая: ткань темнела, основание почки разрасталось, образовывался каллус светло-желтого цвета, состоящий из отдельных комочков.

Каллусообразование при 16-часовом фотопериоде и в темноте не имело больших различий. Между тем фаза развития, на которой были изолированы почки, оказывала большое влияние на продолжительность каллусообразования. Так, увеличение массы каллусной ткани до 2 г при изолировании эксплантатов в августе наблюдали через 6 нед, изолированных на более ранней стадии (май-июнь) - через 10-11 нед.

Такая низкая скорость роста каллусной ткани отмечается на начальном этапе каллусогенеза, что может быть связано с трудностью процесса дедифференциации и пролиферации клеток эксплантатов покоящейся клубнелуковицы.

При помещении пробирок в условиях с пониженной температурой отмечены следующие моменты в поведении эксплантатов. Так, почки, обработанные при температуре $+5^{\circ}\text{C}$ в течение 2 нед, несколько увеличивались в размерах при последующем культивировании при 22°C . Параллельно шло образование каллуса в базальной части эксплантата. Иногда у таких почек каллусообразование было незначительным, сама же почка утолщалась и превращалась в настоящую клубнелуковичку. У контрольных вариантов (постоянное культивирование при 22°C) основание почки разрасталось и превращалось в каллусную ткань. Наиболее интенсивный рост каллуса отмечен на питательной среде, содержащей 2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л аденина, а также 0,4 мг/л кинетина. В дальнейшем эту среду использовали при изучении регенерационной способности различных органов и тканей шафрана. В качестве эксплантатов служили корни, листья, а также части цветка: цветонос, завязь, лепестки, пестик, тычинки. Уже через 2 нед после посадки на питательные среды у всех типов эксплантатов, за исключением лепестков, было обнаружено каллусообразование с базальной стороны. Наиболее активно каллус образовывался из оснований листьев и отличался от каллусной ткани других эксплантатов тем, что был не рыхлым, состоящим из отдельных комочков, а твердым, с гладкой поверхностью.

Важно учитывать стадию развития исходного растения. Так, органы и ткани, изолированные в сентябре-октябре, наиболее удобны для каллусообразования. Как и в случае культивирования апексов верхушечной и боковых почек, условия светового режима не оказывали существенного влияния на каллусообразующую способность исследуемых органов и тканей.

Разные структуры (органы и их части) шафрана проявляют неодинаковую способность к каллусообразованию: она наиболее выражена у кусочков клубнелуковицы, наименее - у цветоноса, завязи и лепестков.

При подборе благоприятных условий практически любой орган (или часть органа) растений оказывается способным к регенерации (Holdgate, 1977; Murashige, 1977). По мнению А.Г. Юсуфова и соавт. (1981), различия в способности отдельных частей растения к дифференцировке и каллусогенезу связаны с их специализацией (под специализацией следует понимать особенности роста и строения данной части растения, особенности метаболизма, продолжительность жизни, разнообразие типов клеток и т.д., поскольку по одному показателю трудно судить о степени специализации).

Учитывая особенности строения и функции исследованных структур, эксплантаты из различных частей шафрана можно расположить в порядке усложняющейся специализации: кусочки клубнелуковицы, лист, корень, органы цветка.

Специализация структур, наблюдаемая в ходе дифференцировки растения в онтогенезе (Lindsay, Northcote, 1976; Юсуфов, 1983), влияет на реализацию потенций интактных тканей шафрана к каллусообразованию *in vitro*. В то же время органы шафрана с низкой каллусообразующей способностью (цветонос, завязь) проявляют тенденцию к усилению каллусогенеза при изменении баланса регуляторов роста в субстрате. Так, культивирование отрезков цветоноса и завязи ш.Королькова на среде с 0,1 мг/л БАП и 1 мг/л НУК приводит к значительному увеличению размеров эксплантата и интенсивному росту каллуса. В неорганизованно растущей каллусной массе на эксплантате завязи закладываются многочисленные эмбриониды, развивающиеся в дальнейшем в корни (рис. 1^х). Активное образование и рост каллусной ткани наблюдаются у верхнего конца перевернутого сегмента цветоноса, посаженного в вертикальном положении в среду. М. Ziv с соавт. (1970), изучая регенерационную способность сегментов цветоноса гладиолуса, выявили, что положение эксплантата определяло скорость регенерации. Например, у дисков цветоносов, помещенных на среду эксплантатов морфологически верхним

^хРисунки, обозначенные звездочкой, см. в "Приложении."

концом, отмечается интенсивное образование каллуса. У дисков же, посаженных на среду морфологически нижним концом, каллусообразование происходит гораздо медленнее.

Таким образом, каллусообразующая способность в культуре тканей шафрана зависит от различных факторов: происхождения эксплантата, его полярности, температуры инкубации, состава и концентрации фитогормонов в питательной среде, фазы развития растения в момент изолирования эксплантата.

Нами изучалась каллусообразующая способность эксплантатов унгернии и иксиолириона, изолированных на различных этапах онтогенеза растений (Джумашева, 1982). Мы обнаружили, что эксплантаты из различных органов иксиолириона в период активации ростовых процессов обладают различной способностью к образованию каллуса.

Кинетин (1-5 мг/л) индуцирует слабое каллусообразование у эксплантатов из листьев иксиолириона. НУК и 2,4-Д индуцируют деление клеток в эксплантатах различных сегментов клубнелуковицы и цветочной почки, причем более эффективными оказались высокие концентрации ауксинов (1-5 мг/л). Однако наиболее оптимальными условиями для каллусогенеза явились сочетания ауксинов и цитокининов. Обильный каллус получен на эксплантатах из базальной части клубнелуковицы при добавлении в питательную среду 2 мг/л НУК и 1 мг/л БАП.

В период активного роста унгернии на основной среде МС без регуляторов роста каллусообразование происходило у эксплантатов из листьев и донца через 2 нед культивирования. Интенсивное образование каллусной ткани наблюдается у эксплантатов, полученных из корней, слабый рост каллуса на эксплантатах из листьев и донца при добавлении в среду кинетина. Эксплантаты из различных частей запасющей чешуи унгернии более отзывчивы к НУК, чем к 2,4-Д. Умеренный рост каллуса отмечается в вариантах с добавлением 2 мг/л НУК и 1 мг/л БАП на эксплантатах листьев, донца, запасющей чешуи унгернии. Интенсивная пролиферация клеток происходит на среде МС с 2 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л кинетина.

В период летнего покоя иксиолириона каллусообразующая способность эксплантатов снижается. Слабый рост каллуса отмечен при внесении БАП, кинетина, 2,4-Д и высоких концентраций НУК на эксплантатах из базальной части клубнелуковицы. Активная пролиферирующая способность клеток выявлена у эксплантатов из зачаточных листьев при концентрации НУК 0,1–1 мг/л. На данной фазе развития также эффективны совместное внесение НУК и БАП или же 2,4-Д и кинетина в соотношениях соответственно 2:1 и 1:1. Эксплантаты из донца не проявляют отзывчивости к этим регуляторам роста.

Во время летнего покоя унгернии незначительный каллусогенез выявлен на эксплантатах из донца на среде МС с добавлением различных концентраций БАП и кинетина. Эксплантаты из других органов не проявили чувствительности к этим регуляторам роста. Высокая каллусообразующая способность наблюдается на эксплантатах из верхушек листьев и донца при добавлении НУК в среду МС. В этот период к НУК нечувствительны эксплантаты из запасающей чешуи унгернии, которые хорошо пролиферировали, если их изолировали в фазу активного роста растений. На эксплантатах из листьев, донца унгернии 2 мг/л НУК и 1 мг/л БАП стимулируют деление клеток, в то время как одновременное внесение в среду 2,4-Д и кинетина не индуцирует каллусогенез. На основной среде МС без регуляторов роста рост каллусных клеток не наблюдается ни на одном из эксплантатов, тогда как в период активного роста унгернии происходит пролиферация клеток.

В период выхода иксиолириона из летнего покоя обнаружена чувствительность эксплантатов из донца и цветочной почки к некоторым концентрациям регуляторов роста. Для индукции каллусообразования на эксплантатах из базальной части клубнелуковицы благоприятно внесение в среду высоких концентраций БАП или кинетина (1–5 мг/л). Низкие концентрации 2,4-Д вызывают пролиферацию клеток на эксплантатах из базальной и средней частей клубнелуковицы. Одновременное добавление НУК и БАП индуцирует каллусогенез на эксплантатах из донца и цветочной почки, но

наиболее активный рост каллусной ткани происходит у эксплантатов из базальной части клубнелуковицы на среде с 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП.

Лучшими индикаторами каллусогенеза у эксплантатов из различных органов иксиолириона явились все комбинации соотношений 2,4-Д и кинетина. Однако наиболее обильная каллусная масса образуется на эксплантатах из зачаточных листьев при внесении 1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л кинетина. На основной среде МС без регуляторов роста каллусогенез обнаружен на эксплантатах из донца, цветочной почки, зачаточных листьев, сегментов клубнелуковицы. При этом активная пролиферация наблюдается уже на второй неделе культивирования.

Эксплантаты из запасающей чешуи и листьев унгернии, изолированные в период выхода из летнего покоя, требуют для индукции каллусообразования внесения низких концентраций БАП или кинетина (0,1–0,5 мг/л). Более интенсивное деление клеток наблюдается при внесении в среду 0,1–0,5 мг/л НУК на эксплантатах из оснований листьев и донца унгернии. 2,4-Д не вызывает пролиферацию клеток ни на одном из вариантов сред. В этот период значительный каллусогенез обнаруживается на средах с добавлением НУК и БАП в соотношении 2:1, причем наибольшее каллусообразование происходит на эксплантатах из оснований листьев на среде, содержащей 2 мг/л НУК и 1 мг/л БАП. На основной среде МС без регуляторов роста также наблюдается образование каллуса на эксплантатах из листьев донца унгернии, что, по-видимому, связано с достаточным содержанием эндогенных ауксинов и цитокининов в интактных тканях в период выхода растений из состояния покоя.

Следовательно, эксплантаты из разных органов иксиолириона и унгернии обладают различной каллусообразующей способностью. Наиболее интенсивное каллусообразование обнаружено на эксплантатах из клубнелуковиц иксиолириона и донца унгернии и иксиолириона. Каллусообразование зависит от фазы развития растений. Так, более высокую каллусообразующую активность проявляют эксплантаты, изолированные в период выхода растений из состояния покоя. Здесь

каллусогенез отмечен и на основной среде МС без добавления регуляторов роста. Для индукции каллусогенеза на разных этапах развития растений меняется потребность в тех или иных регуляторах роста. В период покоя снижается рост каллусной ткани в отдельных органах, хотя пролиферирующая активность клеток в меристематических зонах зачаточных листьев остается высокой. Эффективно для формирования каллусных тканей совместное действие ауксинов и цитокининов, добавляемых в питательную среду.

Соматический эмбриогенез и органогенез в культуре изолированных тканей

Известны два пути превращения недифференцированных клеток каллуса в специализированные клетки тканей, характеризующихся организованным ростом. Один путь, описанный F. Steward с соавт. (1958) и J. Reinert (1965), связан с образованием зародышеобразных структур – соматических эмбриондов. Впервые термин "соматический эмбриогенез" предложен Б.П. Токиным (1959). Среди недифференцированных клеток суспензии или каллусной ткани возникают клетки, которые при делении напоминают фигуры ранних стадий формирования зародыша.

Соматический эмбриогенез, как и спонтанный и индуцированный органогенез, – явление, часто наблюдаемое в культуре изолированных тканей высших растений. Такой тип гистогенеза наблюдала Р.Г. Бутенко (1964) в культуре клеток *in vitro* у женьшеня, раувольфии и моркови. Гистогенез в культуре тканей широко изучается (Torrey, 1965; Roberts, 1969). Другой путь перехода к органогенезу в недифференцированной культуре тканей связан с образованием меристематических рычагов, из которых впоследствии в зависимости от соотношения гормонов и других факторов формируются стеблевые и корневые зачатки (Reinert, 1965).

В качестве индукторов, вызывающих превращение клеток каллусной ткани в клетки меристемы точки роста стебля, корня или зиготообразную клетку, широко применяются цитокинины в различных количественных соотношениях с аук-

синами. Преобладание цитокининов вызывает образование стеблевых почек, преобладание ауксинов – зачатков корней (Skoog, Miller, 1957).

Растения-регенеранты, возникшие в культуре ткани, могут быть потом высажены в почву, где они нормально растут, цветут и образуют семена. Целые цветущие и плодоносящие растения получены в культуре тканей моркови, петрушки, табака, нарцисса и других растений (Steward e.a., 1958; Бутенко, 1964; Seabrook e.a., 1976).

Критерием дифференцировки клеток в культуре каллусной ткани обычно служит образование трахеальных элементов, формирование ксилемы и флоэмы. Дифференциация трахеальных клеток характеризуется утолщением вторичной клеточной стенки и ее лигнификацией.

Перед нами стояла задача изучить гистологические перестройки, происходящие в каллусной ткани шафрана при формировании соматических эмбриондов, что позволит глубже понять механизм процесса дифференциации клеток и органогенеза, а также выяснить роль физиологически активных веществ (Нурмуханбетова, Рахимбаев, 1983). Но сначала необходимо было изучить анатомическое строение интактного растения.

Как показали наши исследования, клубнелуковица шафрана состоит из гомогенной массы паренхимных клеток, наполненных крахмалом. На продольном срезе видно, что центральная область представлена пучком проводящей ткани, проходящим от базальной части через все тело клубнелуковицы и связанным с верхушечной почкой возобновления. Отдельные тяжи сосудистого пучка соединяют донце с пазушными почками, а каллусная ткань шафрана состоит в основном из плотно расположенных друг к другу недифференцированных клеток. В каллусной ткани в процессе культивирования возникают меристематические очаги, разделенные крупными недифференцированными клетками. При проявлении крахмала с помощью йодной реакции отмечаются следы крахмала в дифференцирующихся паренхимных клетках. Сильно вакуолизированные клетки крахмала не содержат.

В процессе дифференциации в культивируемых неоргани-

зованных каллусных тканях формируются морфологические структуры, приводящие к образованию из них почек, корней, побегов, цветков и целых растений. Экспериментальный соматический эмбриогенез и органогенез может быть индуцирован варьированием содержания в среде гормональных и трофических веществ.

В наших опытах для индуцирования органогенеза кусочки каллусной ткани шафрана размером 5x5 мм помещали на среду МС без гормонов и с добавлением 2,4-Д и кинетина в различных концентрациях. На среде без гормонов рост ткани постепенно тормозился, ткань темнела и погибала, не переходя к органогенезу. Добавление к основной питательной среде 1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л кинетина стимулировало дальнейший рост каллусной ткани без индукции органогенеза. При концентрации 1 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина наблюдали образование корней, а при обратном соотношении этих регуляторов роста 0,5 мг/л 2,4-Д и 2 мг/л кинетина формировались побеги. Пассирование каллусной ткани с корневыми отрезками на среду, из которой исключали гормоны, а содержание сахарозы снижали до 20 г/л, привело к образованию настоящих нитевидных корней, характерных для интактного растения шафрана.

Анатомическая картина и гистохимический анализ показывают, что в присутствии указанных регуляторов роста отмечаются направленные клеточные деления, приводящие к дифференцировке элементов ксилемы. При этом в клетках накапливается крахмал, клеточные стенки утолщаются, давая положительную реакцию на лигнин. Формирование промордиев корешка происходит благодаря редифференциации паренхимных клеток каллусной ткани.

Другой тип гистогенеза, так называемый соматический эмбриогенез, наблюдали в каллусных тканях оснований листа, апикальных почек возобновления и кусочков тела клубнелуковицы. После 3-4 пассажей каллусной ткани на свежую питательную среду в большом количестве формировались зародышеподобные образования. Соматические эмбриониды имеют различную форму: шарообразные, иногда округлые с оттянутыми концами. Внутри них можно наблюдать множество очагов усиленно дифференцирующихся клеток,

Изучение микроструктуры отдельного эмбриониды показало, что его поперечный срез напоминает строение побега (рис. 2^х). Снаружи эмбрионидные структуры покрыты четко выраженным эпидермальным слоем, за ним следуют эндодермальные клетки. Центральная часть состоит из паренхимных клеток, среди которых отмечается хорошо заметный узелок сосудистых элементов. Ксилемные клетки с утолщенными стенками окружены клетками флоэмы. Утолщенные клетки ксилемы дают положительную реакцию на лигнин (компоненты М и Ф). В эмбриониде обильно накапливается крахмал, подобно клеткам тела клубнелуковицы интактного растения (Нурмуханбетова и др., 1983).

Формирование в большом количестве эмбрионидов отмечали при пассировании каллусных тканей апикальных почек возобновления и базальных частей листьев шафрана на среде, содержащей по 0,1 мг/л БАП или кинетина и по 1 мг/л НУК или 2,4-Д. При последующем исключении регуляторов роста наблюдали активный рост корней, достигающих длины 60-75 мм.

Эксплантаты из клубневидного корня, лепестков и других органов *Polianthes tuberosa* при культивировании на среде МС с добавлением 2,4-Д (2 мкМ) и кинетина (1 мкМ) дифференцировались в эмбриоподобные структуры (Narayanaswamy, Prabudesai, 1979). Будучи биполярными, эмбриониды были лишены, однако, апикальной меристемы побега (в зоне апекса располагалась масса клеток без проводящих элементов) и развивали только первичный корень. Попытки вызвать дальнейшее развитие эмбрионидов до нормального растения не имели успеха. Авторы считают, что такие структуры по своей природе являются псевдозародышами.

В наших опытах культивирование эмбрионидов на различных вариантах сред приводило к формированию либо побегов, либо корней. Образование побегов можно вызвать, повышая уровень цитокининов по сравнению с ауксинами (2,0 мг/л кинетина и 0,5 мг/л 2,4-Д). Формирование корней требует относительно высокого содержания ауксинов в среде (2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л кинетина).

Дальнейшие исследования показали, что подобного рода закономерности обнаруживаются лишь на начальных этапах культивирования тканей *in vitro*. Начиная с 3-4 пассажей характер ответной реакции каллусных тканей шафрана на изменение содержания экзогенных гормонов в питательной среде меняется. Так, в конце 2 нед культивирования у тканей 3-го пассажа при добавлении в среду 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина происходило образование корней в неорганизованно растущей каллусной ткани. Содержание в среде 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л 2,4-Д в значительной степени активизирует только рост каллусной ткани. Наблюдается увеличение объема каллуса в 2-3 раза спустя 2 нед культивирования на указанной питательной среде. Побеги при этом не образуются.

K. Walker с соавт. (1979) выявили количественный контроль индукции корней и побегов с помощью стимуляторов роста, изучая влияние стимуляторов роста на органо-генез у каллуса люцерны, образовавшегося из незрелых зародышей, стеблей и черешков. Каллус формировал корни после 4-дневного роста на среде с высокой концентрацией кинетина и низкой 2,4-Д. Побеги формировались после 4-дневного индуктивного периода на среде с высокой концентрацией 2,4-Д и низкой кинетина. Дифференциация каллусной ткани происходила не на индукционной среде, а только после ее переноса на среду без стимуляторов роста (что демонстрирует разделение во времени индукции от последующей дифференциации органогенных структур).

И. Москов с соавт. (1980) показали, что влияние регуляторов роста на процесс дифференциации клеток неоднозначно и зависит от возраста каллусной ткани. На дифференциацию и органо-генез в первичном каллусе гиаинга благоприятно действуют условия, когда количество БАП выше, чем НУК. Когда же преобладает НУК или 2,4-Д, дифференциации каллусных клеток не происходит, но после пассирования на среду, в которой концентрация НУК преобладает над БАП, стимулируется органо-образование. У подснежника, независимо от соотношения упомянутых физиологически активных веществ, всегда одновременно протекает образова-

ние луковичек и каллуса. Следовательно, характер действия гормональных факторов в значительной мере определяется генотипом и физиологическим состоянием растений.

В наших опытах, хотя для индукции корней и необходимо определенное соотношение гормонов в среде, их последующий рост и достижение длины до 9 см отмечали при пассаже каллусной ткани на среду со сниженным содержанием сахарозы (20 мг/л), а также исключений из состава питательной среды регуляторов роста. Содержание гормонов в среде 5 мг/л НУК и 2 мг/л БАП поддерживает неорганизованный рост каллусной ткани шафрана и формирование почек. Снижение концентрации регуляторов роста в среде в 2 раза (2 мг/л НУК и 1 мг/л БАП) и дополнительное освещение резко стимулируют образование побегов, которые приобретают ярко-зеленую окраску.

Отмечено формирование до 40 эмбрионов на 1 трансплантате при культивировании первичного каллуса, образованного при дифференциации тканей клубнелуковицы шафрана на среде, содержащей 5 мг/л НУК и 0,1 мг/л БАП. Пассирование отдельных изолированных эмбрионов на питательные среды, содержащие по 1 мг/л НУК или 2,4-Д и по 0,1 мг/л БАП или кинетина, привело к следующим результатам: во всех вариантах опыта отмечали образование зачатков побегов и корней. При последующем снижении концентрации макросолей и витаминов в 2 раза, а также исключении регуляторов роста из состава среды стимулировался рост побегов и корней, а также формирование корней-регенерантов (рис. 3^х).

Таким образом, индукция соматического эмбриогенеза в культуре каллусных тканей обеспечивается высоким уровнем НУК в питательной среде, что свидетельствует о ведущей роли ауксинов в клеточной дифференцировке, приводящей к формированию соматических эмбрионов в каллусной ткани. Интенсивность формирования соматических эмбрионов, дающих начало органо-генным структурам, зависит от возраста каллусных тканей. Из эмбрионов, сформировавшихся в первичном каллусе, легко образуются побеги и корни. После 3-го пассажа подавляется способность

к побегообразованию, а после 5-го – к ризогенезу. Следовательно, для клонального микроразмножения шафрана наиболее пригоден первичный каллус, клетки которого обладают высокими морфогенетическими потенциями.

Формирование зачатков из эмбрионидов можно вызвать, повышая уровень цитокининов в питательной среде по сравнению с ауксинами (2 мг/л кинетина и 0,5 мг/л 2,4-Д). Для последующего роста этих зачатков необходимо вдвое снизить концентрацию регуляторов роста в питательной среде. Для образования зачатков корней из эмбрионидов требуется относительно высокое содержание ауксинов по сравнению с цитокининами (0,5 мг/л кинетина и 2 мг/л 2,4-Д). Дальнейший рост зачатков корней происходит при пассировании эмбрионидов на питательную среду без регуляторов роста.

Определенный интерес вызывает выяснение возможности ко вторичной дифференцировке и проявлению морфогенетической способности унгернии и иксиолириона в культуре каллусной ткани. Нами установлено, что в ряде случаев каллусная ткань унгернии способна к редифференцировке с образованием зародышеподобных структур (соматических эмбрионидов) и в последующем специализированных органов.

Индуктором соматического эмбриогенеза в культуре каллусной ткани из донца унгернии явилась 2,4-Д. При первичном пассировании на среду с 1 мг/л 2,4-Д в каллусной ткани образуются компактные уплотненные зернистые структуры желтого цвета. Через 4 нед инкубации каллусные культуры пересаживали на основную среду МС без регуляторов роста и на варианты сред с добавлением 0,1–5 мг/л 2,4-Д. Однако дальнейшее развитие эмбрионидов происходило лишь на средах без 2,4-Д. Число зародышеподобных структур увеличивалось, они становились более рыхлыми. В случае первичного пассирования каллусной ткани из донца унгернии и иксиолириона на среду с одновременным внесением ауксинов и цитокининов образование зародышеподобных структур наблюдалось значительно реже. Каллусные ткани из донца унгернии обладали наиболее активной способностью к образованию соматических эмбрионидов.

На каллусных тканях иксиолириона легко образовывались зародышеподобные структуры и почки. Инициация морфогенных структур происходила на среде с регуляторами роста. При первичном пассировании каллусной ткани из донца иксиолириона на среду с 1 мг/л 2,4-Д через 1 мес началось формирование соматических эмбрионидов. Образование почек происходило на средах с добавлением определенного соотношения НУК и БАП или НУК и кинетина. В каллусной массе из донца иксиолириона, пассированной на среду 1 мг/л НУК, через 1 мес культивирования формировались зачатки корней. Вторичное их пассирование на среду с более высоким содержанием НУК (2 мг/л) привело к усиленному ризогенезу. На каллусе из эксплантатов клубнелуковицы иксиолириона при пассировании на среду с повышенным содержанием НУК (2 мг/л) вначале также формировались зачаточные корни, которые на следующих пассажах теряли способность к росту.

Инициацию почек с последующим образованием побегов наблюдали на средах с более высоким содержанием цитокининов. Так, на среде с 1 мг/л НУК и 2 мг/л БАП на эксплантате из донца происходило интенсивное каллусообразование, а через 5 нед начала формироваться почка, из которой в дальнейшем развился побег иксиолириона. Индукция органогенеза зависит от срока изолирования эксплантатов. Так, изолированные осенью эксплантаты клубнелуковицы иксиолириона обладали более высокими морфогенетическими потенциями. На основной питательной среде МС с добавлением 0,5 мг/л БАП отмечался быстрый рост каллусной ткани, имеющей рыхлую консистенцию. Впоследствии была обнаружена инициация почки, которая через 3 нед дала начало побегу. При добавлении в среду 0,5 мг/л кинетина на эксплантатах из клубнелуковицы иксиолириона также наблюдали обильное каллусообразование. Через 4 нед на верхней части каллуса образовались эмбриониды и почки. Почки, отдельно пересаженные на среду без регуляторов роста, развились в дальнейшем в побеги иксиолириона.

В тех вариантах опыта, когда культивировали первичные эксплантаты и из питательной среды исключали регу-

ляторы роста, наблюдали активную пролиферацию клеток, образование рыхлой каллусной массы. Затем появились нитевидные выросты на верхней части каллуса, но последующей дифференциации эмбрионидов не наблюдали (рис. 4^х). При пассировании трансплантата от этого каллуса на среду с повышенным содержанием ауксинов (0,1 мг/л кинетин + 1 мг/л НУК) формировались зачатки корней (рис. 5^х). Если же трансплантат от исходной каллусной ткани пересаживали на среду с повышенным содержанием цитокининов (0,1 мг/л НУК + 1 мг/л кинетин), то, напротив, наблюдали образование в большом количестве почек, из которых могли развиваться побеги (рис. 6^х). На среде без регуляторов роста отмечали незначительную пролиферацию клеток на эксплантатах из донца иксиолириона, однако органоогенез не происходил.

На каллусной ткани, возникшей из эксплантатов апикальной части почки унгернии при соотношении в питательной среде ауксинов и цитокининов 1:5, инициировались почки, внутри которых формировались зачаточные листочки. В то же время регенерация листьев из каллусной ткани запасочной чешуи унгернии происходила при обратном соотношении этих регуляторов роста. Так, на среде с 0,2 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК через 1 мес из компантного каллуса образовались зачаточные листья.

Если процессы вегетативного или репродуктивного органоогенеза удается регулировать путем изменения соотношения гормональных факторов, то регенерация целых растений в культуре каллусных тканей — сложное явление. Только в редких случаях удавалось получить целые растения иксиолириона путем регенерации их из каллусной ткани. Вначале на каллусной ткани клубнелуковицы на среде с 0,5 мг/л кинетина инициировались соматические эмбриониды и почки. При пассировании на среду без регуляторов роста через 4 нед из почек образовались корни, затем побеги (рис. 7^х). По-видимому, для регенерации целого растения необходимо определенное соотношение между эндогенными и экзогенными гормональными факторами, которое определяет тот или иной тип морфогенеза *in vitro*.

Итак, индукция соматического эмбриогенеза и органоогенеза в культуре каллусной ткани унгернии и иксиолириона характеризуется рядом особенностей. В наших экспериментах индуктором дифференциации соматических эмбрионидов явилась 2,4-Д. Для дальнейшего развития зародышеподобных структур требуется пассирование культур на питательную среду без 2,4-Д. Для формирования соматических эмбрионидов наиболее удобны каллусные ткани из донца унгернии и иксиолириона. Чаще всего соматические эмбриониды и почки образуются в первичных каллусных тканях. Трансплантаты по мере их последующих пересадок снижают, а затем и вовсе теряют свои морфогенетические потенции.

Инициация почек в каллусных тканях происходит путем изменения соотношения и концентрации регуляторов роста. Процессы вегетативного и репродуктивного органоогенеза индуцировались повышением концентрации цитокининов, причем для дальнейшего формирования цветочной почки необходим свет. Процессы ризоогенеза осуществлялись при повышении уровня ауксинов (НУК).

Обнаружена определенная зависимость между типом исходной растительной ткани и способностью к соматическому эмбриогенезу и органоогенезу в культуре каллусной ткани. Так, каллусные ткани из донца иксиолириона и унгернии, апикальной почки унгернии, а также из самой клубнелуковицы иксиолириона обладают наиболее высокой чувствительностью к индукции соматического эмбриогенеза и органоогенеза. Массовое получение соматических эмбрионидов возможно при использовании в качестве эксплантата ткани донца иксиолириона и унгернии, а для получения стеблевых почек — ткани клубнелуковицы иксиолириона и апикальной почки унгернии.

Регенерация растений в культуре изолированных органов

Для изучения регенерационной способности изолированных сегментов клубнелуковицы шафрана делили на 2, 3, 4, 8 частей путем вертикальных и горизонтальных сечений. У сегментов, полученных в результате вертикального сече-

ния с захватом тканей донца, отмечалось интенсивное укоренение и вытягивание апикальных и боковых почек возобновления (рис. 9х).

Эксплантаты высаживали в июне на питательную среду Гельригеля. При изучении основных этапов морфогенеза ш. алатавского установлено, что в этот период апикальные почки представлены в виде недифференцированного конуса нарастания, листовые буторки только начинают закладываться, верхушечные почки по своему развитию не отличаются от боковых почек, разбросанных по всему телу клубнелуковицы (Нурмуханбетова, 1982 б).

Измерения, проведенные через 4 мес после посадки (октябрь), показали, что высота развивающихся из апикальных почек побегов 3,0 см, из боковых 2,3 см. Отмечалось образование корневого валика и рост корней, длиной 0,2–0,4 см. Спустя еще 1 мес высота побегов увеличилась до 3,5–3,8 см, длина корней – до 1,7 см. В дальнейшем пробирки с изолированными сегментами содержали при 5°C в течение 2 мес, затем вновь культивировали при комнатной температуре. Наблюдался активный рост корней и побегов. Максимальная длина корней 7 см, побегов 12 см, появлялись ассимилирующие листья.

Следовательно, длительное воздействие низкой температуры (5°C) оказывает сильное влияние на рост побегов и корней у эксплантатов. По мнению М. Codaccioni (1982), низкая температура (5°C) вызывает глубокие изменения метаболизма растений в культуре *in vitro*.

По окончании вегетации основания побегов утолщались за счет питательных веществ несущих их сегментов и развивались в замещающие клубнелуковицы. Старые корни отмирали, а от базальной части вновь сформированных клубнелуковичек отходили образования типа контрактильных корней, имеющие форму толстых, суживающихся к концу стержней.

У клубнелуковиц шафрана ярко выражено апикальное доминирование. 1–2 верхние почки обычно бывают крупнее остальных, из них развиваются цветущие побеги возобновления, дающие по окончании цветения новые клубнелукови-

цы-детки. Из почек, расположенных ниже верхушечных, при благоприятных условиях (а также в случае гибели апикальных почек) также могут развиваться листья, цветки и детки (Артюшенко, 1965).

В наших опытах в случае культивирования частей тела клубнелуковицы, лишенных апикальной почки возобновления, боковые и нижние почки занимали господствующее положение и начинали активно вытягиваться.

Интересные моменты можно отметить при изучении регенерационной способности частей клубнелуковицы, образованных путем горизонтальных делений. У таких сегментов также наблюдался рост почек возобновления за счет питательных веществ несущих их частей клубнелуковицы; так как корневая меристема у этих сегментов отсутствовала (верхняя и средняя части клубнелуковицы), то образование корней обычным путем было исключено. Однако отмечено активное формирование корнеподобных выростов, отходящих от края верхней трети клубнелуковицы чуть выше места среза и образование типа контрактильного корня, отходящего от побега, развившегося от боковой почки средней части клубнелуковицы.

Таким образом, эти особенности клубнелуковицы шафрана можно использовать для увеличения коэффициента вегетативного размножения, разрезая клубнелуковицу на несколько частей и выращивая эксплантаты на питательных средах. Растения, полученные таким способом, могут продолжить свое развитие в открытом грунте (Нурмуханбетова, 1982).

Отдельная серия экспериментов поставлена для изучения процесса регенерации растений непосредственно из интактных тканей эксплантата (Нурмуханбетова, 1983). Этот процесс может быть вызван пробуждением уже существующих спящих почек или новообразованием зачаточных почек на основе тотипотентности растительной клетки. Далее увеличения числа инициалей на один эксплантат можно добиться путем изолирования образовавшихся адвентивных побегов и переноса их на новую питательную среду.

В этих целях мы культивировали сегменты покоящихся

клубнелуковиц шафрана на питательной среде МС с добавлением ауксинов и цитокининов в различных концентрациях. В вариантах опытов при культивировании на среде с 5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП сегментов (1/3 часть клубнелуковицы) наблюдали образование многочисленных адвентивных побегов по краям раневой поверхности (рис. 8^х). Новообразование побегов происходит по типу реституции, т.е. идет восстановление органов на раневой поверхности (Кренке, 1950).

В дальнейшем образовавшиеся адвентивные побеги начинали расти и спустя 2 мес культивирования достигали 30 мм высоты. Пересадка сегментов с адвентивными побегами на среду с 0,1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП приводила к образованию каллуса и миниатюрных "луковичек" у основания побегов (рис. 10^х). Еще через 2 мес сформированные побеги изолировали и переносили на среды для укоренения. Корни образовывались при добавлении в среду 0,01–0,05 мг/л НУК.

Для последующего развития такие растения-регенеранты пересаживали на свежую питательную среду с половинной концентрацией солей и витаминов по МС без регуляторов роста. Содержание сахарозы снижали до 15 г/л. Через месяц растения пересаживали в кюветы со смесью вермикулита и торфа и переносили в климатическую камеру (температура 25^оС, освещенность 8000 лк, 16-часовой фотопериод). При этих условиях побеги интенсивно росли и зеленели. Далее растения выдерживали в условиях пониженной температуры (+5^оС) в течение 3 нед и культивировали в теплице 3–4 мес. Постепенно растения старели, формировали мелкие клубнелуковицы. В последующем такие клубнелуковицы хорошо переносили пересадку в открытый грунт. Весь цикл формирования и развития растений-регенерантов длится около 8–10 мес. В результате изолирования и культивирования адвентивных побегов нами получено 30 растений-регенерантов из одного эксплантата размером 10х10 мм (Нурмуханбетова, Рахимбаев, 1983а).

Апикальное доминирование – одно из ярких проявлений межорганных коррелятивных взаимоотношений в растительном организме (Штернберг, 1963; Champagnat, 1965).

Торможение верхушечной почкой роста пазушных почек можно снять, удаляя верхушку стебля. Это приводит к пробуждению большого числа пазушных почек и последующему усиленному ветвлению. Как показали Т. Sachs, К. Thimann (1967), цитокинины снимают апикальное доминирование и вызывают пазушное ветвление у двудольных растений. G. Hussey (1976 а, 1977) сообщает о стимуляции ветвления под влиянием цитокининов у ряда однодольных растений в культуре *in vitro*. Виды из сем. Iridaceae более чувствительны к действию цитокининов по сравнению с представителями сем. Liliaceae, Amaryllidaceae. Н.В. Кагаева (1981) также указывает на важную роль цитокининов в подавлении апикальной доминантности в экспериментах по микроразмножению фрезии в культуре тканей. Обработка клубнелуковиц шафрана посевного гиббереллином приводит к образованию дополнительных цветочных почек из недифференцированных меристематических бугорков (Азизбекова и др., 1978).

В естественных условиях шафраны имеют низкий коэффициент вегетативного размножения (1:1), что связано с сильно выраженным апикальным доминированием у клубнелуковиц. Рост пазушных почек полностью подавлен. Боковые почки в количестве 6–10 шт. и размером менее 1 мм, скрытые в пазухах несущих листьев, остаются на ювенильной стадии развития и погибают вместе с истощенной материнской клубнелуковицей по окончании периода вегетации растений.

В связи со своеобразной жизненной формой клубнелуковичных геофитов большой интерес представляет изучение апикального доминирования клубнелуковиц шафрана и путей его преодоления для индуцирования побегообразования. Латеральные побеги можно отделить и культивировать на специальных питательных средах для дальнейшего роста, развития и повышения коэффициента вегетативного размножения шафранов.

Для решения данного вопроса покоящиеся клубнелуковицы высаживали на различные варианты питательной среды МС с регуляторами роста. На среде без гормонов не отме-

чены какие-либо изменения в поведении клубнелуковиц. В вариантах опыта с добавлением ауксинов и цитокининов показано, что 2,4-Д (2 мг/л) в сочетании с кинетином (0,4 мг/л) вызывает рост апикального побега и корней, не обычных нитевидных, характерных для интактного растения, а толстых и коротких. Длина побега через 2 мес культивирования составляла 40 мм, корней 20 мм. В дальнейшем наблюдали процесс дифференциации клубнелуковиц и превращения их в каллусную массу. Рост корней приостанавливался, происходило их разрастание и образование неорганизованной каллусной ткани, которая обладала высокими морфогенетическими потенциями и в последующих опытах служила исходным материалом для индукции соматического эмбриогенеза и органогенеза.

Высокий уровень ауксинов в среде (5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП) влияет на ход отрастания целых клубнелуковиц. Через 2-3 мес после посадки отмечается рост побегов, развивающихся из почек возобновления. При этом вытягиваются побеги, формирующиеся не только из апикальной почки, но и из пазушных боковых и нижних почек (побеги 1-го порядка). Рост побегов незначителен, длина не превышает 8-10 мм (рис. 11^х). Через месяц основания побегов несколько утолщались и происходило формирование замещающих клубнелуковиц-деток, на которых закладывались спящие почки. Пазушные почки также росли и давали начало побегам 2-го порядка.

Следующий этап работы состоял в изолировании побегов 2-го порядка и пересадке их на питательные среды для индукции ризогенеза, последующего роста и развития. Побеги отделяли и пересаживали на среды, содержащие только НУК или 2,4-Д либо комбинации этих регуляторов роста с БАП или кинетином. Оптимальная концентрация гормонов для индукции и роста корней — это культивирование эксплантатов в течение 2 мес на среде с 1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП. Последующее исключение регуляторов роста из среды и выдерживание пробирочных культур в течение 3 нед при +5⁰С стимулировали интенсивный рост корней, максимальная длина которых достигала 30-

40 мм. Высота побегов здесь 60-70 мм. Затем растения-регенеранты высаживали в кюветы со смесью вермикулита и торфа и переносили в климатическую камеру, где шел дальнейший рост побегов и корней. По окончании вегетации основания побегов утолщались за счет питательных веществ ассимилирующих листьев и превращались в замещающие клубнелуковицы высотой 3 и длиной 4 мм. В результате пазушного ветвления из исходной клубнелуковицы через 6 мес можно получить около 100 растений-регенерантов.

В экспериментах по культивированию *in vitro* некоторых луковичных и клубнелуковичных растений G.Hussey (1976 а, 1977) и Н.В.Катаева (1981) получили ветвящиеся побеги. В опытах Н.В.Катаевой пазушное ветвление наблюдалось только у побегов, происходящих из генеративных органов (эксплантаты цветоложа, каллус пыльников) на питательной среде МС с добавлением БАП (0,5-6 мг/л). В экспериментах G.Hussey при образовании многочисленных побегов трудно различить, являются они пазушными или адвентивными. Нам удалось добиться развития побегов из пазушных почек среднего и нижнего ярусов клубнелуковиц шафрана при культивировании целых клубнелуковиц на питательной среде МС с 5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП.

Таким образом, основная особенность, отличающая клубнелуковичные геофиты от других растений, — индукция побегообразования у пазушных почек целой клубнелуковицы шафрана при добавлении в среду ауксинов и цитокининов. Данный метод состоит в индукции, изолировании и пересадке пазушных побегов на питательные среды для укоренения и формирования из них полноценных растений-регенерантов.

Мы исследовали процесс регенерации растений из изолированных апикальных и пазушных почек клубнелуковицы ш.алатавского и ш.Королькова. Нами поставлена серия экспериментов по изучению влияния широкого диапазона концентраций ауксинов и цитокининов на рост почек возобновления покоящихся клубнелуковиц. В качестве эксплантатов использовали непосредственно клубнелуковички высотой 0,5-1 мм с захватом небольшого участка прилегающей ткани клубнелуковицы размером 5х5 мм. Из пазушных почек отрастают

побеги на основной среде МС, содержащей разные концентрации цитокининов (0,1–20 мг/л). Почки быстро набухают, вытягиваются, зеленеют и за 3 мес дают побеги длиной до 20 мм. Еще через месяц длина побегов увеличивается в два раза (40–45 мм), разворачиваются ассимилирующие листья. Скорость роста побегов тем выше, чем больше концентрация цитокининов в питательной среде. При уровне кинетина в среде от 0,1 до 5 мг/л от эксплантата отходят единичные корешки длиной 4–18 мм.

Из апикальных почек возобновления отрастают и побеги на среде с цитокининами (0,1–1 мг/л). Однако рост их в два раза меньше по сравнению с ростом побегов, развивающихся из пазушных почек. Начиная с концентрации цитокининов 5 мг/л и выше, рост побегов из апикальной почки не наблюдается. На среде с 0,5 мг/л БАП у апикальных почек ш.Королькова основание побега расширяется, образуется замещающая клубнелуковица. Молочно-белые колпачки, окружающие клубнелуковицу, высыхают и превращаются в наружные защитные чешуи золотистого цвета.

Высокие концентрации цитокининов (10–20 мг/л) вызывают у апикальных и пазушных почек параллельно с ростом побега образование каллуса, формирование контрактильного корня и многочисленных адвентивных побегов (рис. 12^а). Высокий уровень цитокининов в питательной среде ингибирует образование обычных нитевидных корней, характерных для шафрана. Тем не менее такие условия не препятствуют формированию контрактильного корня у основания растущего побега. Зачаток контрактильного корня возникает вблизи сосудистых пучков прилегающих тканей клубнелуковицы. На начальных этапах процесс состоит в дедифференциации специализированных клеток, возобновлении митотической активности и последующей редифференциации определенной группы клеток в зачаток корня. В дальнейшем происходит активное деление и растяжение клеток, что приводит к росту зачатка и формированию контрактильного корня.

Следовательно, цитокинины активируют рост изолированных апикальных и пазушных почек. Обнаружено также множественное действие кинетина на морфогенетическую реак-

цию различных тканей клубнелуковицы (Нурмуханбетова, 1983 а). Так, в зависимости от специализации тканей и ее полярности наряду с ростом побега происходит образование каллуса (из паренхимных клеток базальной части эксплантата), адвентивных побегов (из клеток эпидермиса и паренхимных клеток верхней части эксплантата), формирование и рост контрактильного корня (из клеток, прилегающих к сосудистым тканям).

В вариантах опыта с добавлением в среду ауксина (НУК 0,1–20 мг/л) у эксплантатов проявлялась видовая специфичность в ответной реакции. Так, у эксплантатов ш.Королькова нет изменений, а клубнечки ш.алатавского более отзывчивы к действию НУК. У этих эксплантатов происходит слабый рост почек (длина 5 мм) на среде с низкой концентрацией НУК (0,1 мг/л) и образование каллусной ткани у основания побегов на среде с высокой концентрацией НУК (1–10 мг/л).

Мы изучали также совместное действие ауксинов и цитокининов на поведение изолированных апикальных и пазушных почек в культуре *in vitro*. На фоне 1 концентрации кинетина (1 мг/л) испытывали различные концентрации НУК (1–10 мг/л). Такое сочетание гормонов приводит первоначально к росту почек, высота побегов достигает 16–20 мм. Далее рост побегов задерживается, у их основания образуется каллус. Рост каллусной ткани тем интенсивнее, чем выше концентрация НУК в среде.

Особо следует отметить эксперименты по культивированию апикальных и пазушных почек шафрана на основной среде, куда добавляли низкие дозы кинетина и НУК (по 0,1–1 мг/л). В вариантах опыта с 0,1 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК наблюдали рост побегов, длина которых через 3 мес культивирования достигала 40–50 мм. От основания побегов отходили корни длиной 8–10 мм. При обратном соотношении регуляторов роста (1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л НУК) процесс выражен ярче. В этом случае происходит активный рост побегов и развитие мощной корневой системы, разворачиваются ассимилирующие листья. Высота побегов через 3 мес культивирования 70–80 мм, длина корней

65–70 мм. Именно это сочетание гормонов (1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л НУК) является самым эффективным для роста побегов, корней и развития нормальных растений-регенерантов.

В дальнейшем пробирочные культуры выдерживали в течение 3 нед при 5°C. Затем растения высаживали в кюветы со смесью вермикулита и торфа. При этом растения достигали высоты 100–115 мм, максимальной длины корней 120 мм (рис. 13^х). В дальнейшем растения продолжали свое нормальное развитие.

В опытах по культивированию эксплантатов из различных органов унгернии и иксиолириона в ряде случаев наблюдалась регенерация, минуя процессы каллусогенеза и соматического эмбриогенеза. Так, на эксплантате из базальной части клубнелуковицы иксиолириона, помещенного на основную среду МС без регулятора роста, через 4 нед культивирования появилась новая клубнелуковичка, но не на месте среза, а на поверхности эксплантата. Далее рост молодой клубнелуковицы стал интенсивнее. Сама клубнелуковица вытянулась в длину, сформировалось донце. После погружения донца в агаризованную среду появились небольшие утолщенные корни. Еще через 3 нед началось активное побегообразование. Для усиления ризогенеза культуру пересадили на среду с высоким содержанием ауксинов (1 мг/л БАП + 2 мг/л НУК) (рис. 14^х).

Регенерация растений из эксплантатов, полученных из различных органов унгернии, происходила по пути реституции, т.е. луковички формировались на поверхности среза. Образование новой луковички на месте среза отмечено на эксплантатах из зачаточных листьев унгернии на среде МС без добавления регуляторов роста. Новую луковичку отделили от маточного эксплантата листа и пересадили на среду с добавлением 2 мг/л НУК. Через 2 нед культивирования появились короткие и утолщенные корни, усилился рост листьев (рис. 15^х).

Высокую способность к регенерации проявили и эксплантаты из базальной части запасающей чешуи унгернии. Новые луковички образовались на месте среза первичных

эксплантатов на всех вариантах сред с добавлением: 0,1–0,5 мг/л НУК; 0,1–0,5 мг/л БАП; 0,2 мг/л НУК + 1 мг/л БАП; 0,1 мг/л БАП + 1 мг/л НУК. Вначале размеры эксплантата увеличились до 2–3 см, затем на месте среза образовались адвентивные почки, из которых впоследствии формировались луковички. Восстановление целой луковички начинается быстро, через 2–3 нед культивирования. Интенсивность освещения на начальных этапах культивирования изолированных эксплантатов играла значительную роль в протекании регенерации *in vitro*. Освещение в климатической камере с фотопериодом 14 ч. в течение первых 2 нед ускорило образование новых луковичек, тогда как при культивировании в темноте этих же эксплантатов регенерации не происходило.

На эксплантатах из апикальной почки унгернии образуется большое число адвентивных побегов. Так, на эксплантате из апикальной почки первоначально отмечены 3–5 побегов, а на эксплантате из базальной части запасающей чешуи – 1, в редких случаях – 2 побега одновременно. Регуляторы роста, вносимые в питательную среду, оказывают индуцирующее воздействие на процессы регенерации у эксплантатов, изолированных на определенных этапах морфогенеза амариллисовых.

Гормональная зависимость индукции адвентивных почек выявлена при изолировании эксплантатов в весеннее время в фазу активного роста растений. Так, на эксплантатах из базальной части запасающей чешуи унгернии, помещенных на основную среду МС без регуляторов роста и при добавлении 0,1–0,5 мг/л БАП, адвентивные побеги не образовывались. Лишь при совместном внесении в среду МС по 1 мг/л БАП и НУК на первичных эксплантатах из запасающей чешуи формировались почки, из которых впоследствии развивались молодые луковички унгернии. Формирование адвентивных побегов на первичных эксплантатах из апикальной почки унгернии, изолированных в период выхода растений из покоя, происходит без влияния гормональных факторов.

Интенсивность регенерационных процессов эксплантатов

зависит от фазы развития монокарпических побегов амариллисовых. Наиболее высокой регенерационной способностью обладают эксплантаты, изолированные в период осеннего выхода растений из покоя (сентябрь). Коэффициент вегетативного размножения наиболее высок именно в это время (Джумашева, 1983; Джумашева, Рахимбаев, 1983). Из эксплантата базальной части апикальной почки на месте среза одновременно формировались 3–5 адвентивных побегов, из которых развивались луковички. Через месяц, когда луковички-регенеранты достигли значительных размеров (2–3 см), образовав характерные для унгернии коричневые покровные чешуи, на месте среза вновь начали появляться новые адвентивные побеги. Так, в течение 3 мес культивирования из 1 эксплантата основания листа унгернии размером 1х1 см получили 7–8 растений-регенерантов. Далее молодые луковички отделяли от материнского эксплантата и помещали каждую в отдельности на питательную среду, содержащую ауксин (2 мг/л НУК), для усиления процесса ризогенеза. Эксплантаты, изолированные в более поздние сроки (январь, февраль), обладали меньшей регенерационной способностью. В весеннее время (март, апрель) способность к прямой регенерации проявляли лишь эксплантаты из базальной части клубнелуковицы иксиолириона и апикальной почки унгернии. Во время летнего покоя растений (июль, июнь) регенерация не отмечена ни на одном из эксплантатов, полученных из различных органов иксиолириона и унгернии.

Таким образом, при изучении процесса регенерации в культуре изолированных органов и тканей амариллисовых нами обнаружено, что собственно регенерация может идти двояким путем: восстановлением организма на месте среза (процесс реституции) и новообразованием на неповрежденной поверхности эксплантата адвентивных почек (репродукция).

Для эксплантатов унгернии характерен реституционный тип регенерации, когда адвентивные побеги образуются на месте среза, а у иксиолириона формирование новых побегов происходит на неповрежденной части эксплантата.

Различные органы унгернии и иксиолириона проявляют неодинаковую способность к прямой регенерации. Наиболее высокой обладают эксплантаты из базальной части клубнелуковицы иксиолириона и апикальной части унгернии. Регенерация в культуре изолированных органов зависит от фазы развития растений. В период выхода из покоя усиливается регенерационная способность амариллисовых, повышается коэффициент вегетативного размножения растений.

Экзогенные регуляторы, вносимые в питательную среду, оказывают индуцирующее воздействие на формирование адвентивных почек лишь при изолировании эксплантатов на определенных фазах онтогенеза унгернии и иксиолириона. В период выхода из покоя собственно регенерация растений из эксплантатов осуществляется без воздействия регуляторов роста, а индукция адвентивных побегов в весеннее время – с участием гормональных факторов. Эксплантаты из различных органов иксиолириона и унгернии, изолированные в период летнего покоя растений, не обладали регенерационной способностью.

Глава 3

ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И МОРФОГЕНЕЗ

Ранее мы исследовали особенности гормональной регуляции унгернии и иксиолириона в интактном растении и в культуре изолированных органов и тканей на разных этапах онтогенеза (Джумашева, Рахимбаев, 1981; 1981 а). Эндогенные фитогормоны принимают активное участие в процессах роста и развития на уровне целостного организма. При культивировании изолированных эксплантатов растений нарушаются нормальные интеграционные механизмы и коррелятивные взаимодействия между различными органами и тканями. Здесь одним из важнейших факторов в регуляции и направлении морфогенетических процессов становятся экзогенные регуляторы роста, добавляемые в питательную среду. Эксплантаты, изолированные из различных органов на разных этапах онтогенеза, испытывают неодинаковую потребность к экзогенным регуляторам в питательной среде. Мы попытались выяснить причины этих явлений, сопоставив уровень эндогенных фитогормонов и ингибиторов с концентрацией и соотношением экзогенных регуляторов, добавляемых в питательную среду, с одной стороны, и протеканием морфогенетических процессов — с другой.

Исследование каллусообразующей способности эксплантатов из различных органов унгернии и иксиолириона выявило, что пролиферирующая активность клеток зависит от сроков их изолирования. Причем ткани, изолированные из различных органов, проявляют неодинаковую отзывчивость

к регуляторам роста, добавляемым в питательную среду. Иногда каллусогенез осуществлялся на средах без регуляторов роста (при изолировании эксплантатов в период выхода растений из покоя). Сопоставив эндогенный уровень регуляторов роста в интактных органах растений унгернии и иксиолириона на разных этапах морфогенеза монокарпических побегов, а также данные о каллусообразующей способности эксплантатов, мы обнаружили, что между ними существует определенная зависимость.

В период летнего покоя в тканях клубнелуковицы иксиолириона отсутствуют свободные цитокинины, а уровень связанных неактивных форм высок (Джумашева и др., 1983 а). Эксплантаты, изолированные в данный период, обладают низкой каллусообразующей способностью. На среде без регуляторов роста и при добавлении низких концентраций экзогенных цитокининов (0,1 мг/л БАП) пролиферации клеток нет. Индукторы каллусогенеза — высокие концентрации цитокинина (5 мг/л БАП). По-видимому, отсутствие активных свободных цитокининов сказалось на очень низкой каллусообразующей способности эксплантатов, а связанные, неактивные формы цитокининоподобных соединений не играют индукторной роли в образовании каллуса.

В период выхода растений из покоя в тканях накапливается значительное количество свободных цитокининов. Эксплантаты, изолированные в этот период, обладают высокой каллусообразующей способностью на основной среде МС без регуляторов роста (рис. 16). Возможно, в пролиферации клеток приняли участие эндогенные цитокинины и для индукции каллусогенеза не было необходимости во введении экзогенных цитокининов в питательную среду МС.

Теперь рассмотрим, как влияет эндогенный уровень ауксинов и ингибиторов на каллусогенез в изолированных тканях клубнелуковицы иксиолириона на различных этапах морфогенеза растений. Отсутствие ауксинов в период летнего покоя также коррелирует с низкой каллусообразующей способностью эксплантатов на среде без регуляторов роста (рис. 17). Добавление 5 мг/л НУК только незначительно повышает каллусогенез. Вероятно, высокий уровень эндо-

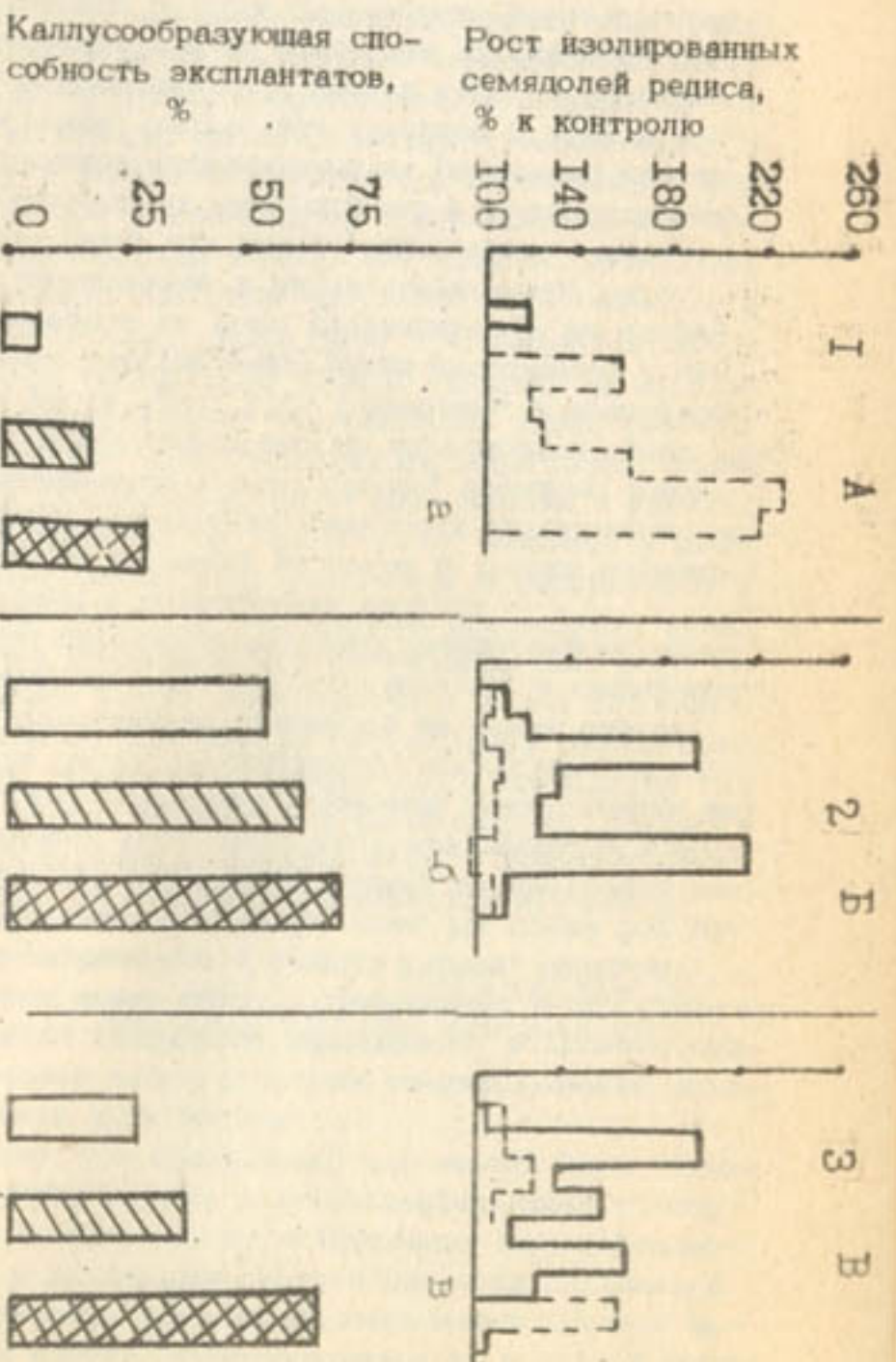


Рис. 16. Зависимость каллусообразования эксплантатов клубнелуковичи аксилипрона от уровня эндогенных питокинов на разных этапах онтогенеза растений: 1 - летний покой, 2 - выход из покоя, 3 - период вегетации; А, Б, В - биологическая активность эндогенных питокинов, биотест: рост изолированных семядолей редиса; а, б, в - каллусообразующая способность эксплантатов (% от общего числа эксплантатов); □ - контроль, ▨ - 0,1 мг/л кинетина, ▩ - 5 мг/л кинетина

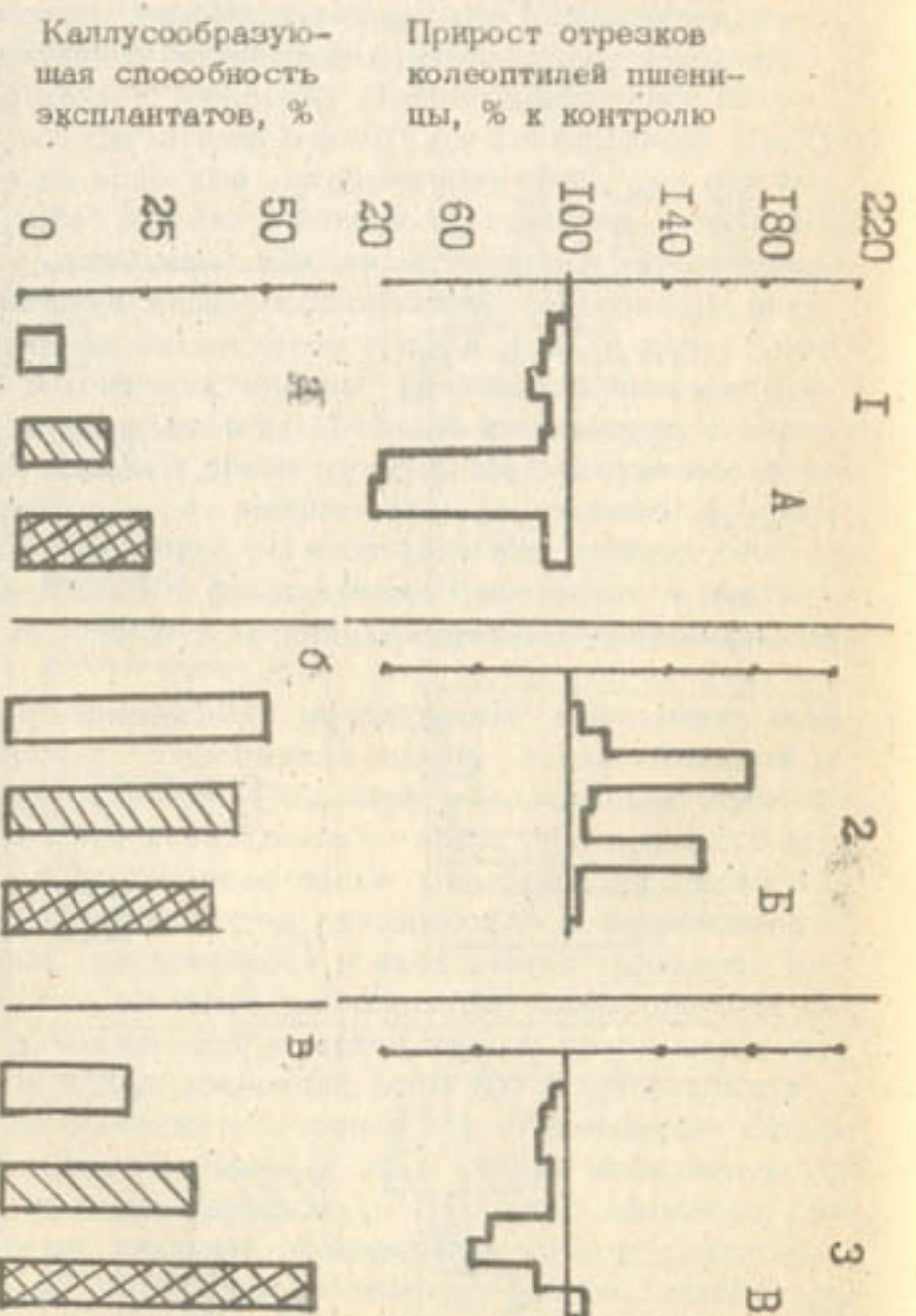


Рис. 17. Зависимость каллусообразования эксплантатов клубнелуковичи аксилипрона от уровня эндогенных ауксинов и ингибиторов на разных этапах онтогенеза растений: 1 - летний покой, 2 - выход из покоя, 3 - период вегетации; А, Б, В - биологическая активность эндогенных ауксинов и ингибиторов, биотест: прирост отрезков колеоптилей пшеницы; а, б, в - каллусообразующая способность эксплантатов (% от общего числа эксплантатов); □ - контроль, ▨ - 0,1 мг/л НУК, ▩ - 5 мг/л НУК

генных ингибиторов в эксплантатах оказал основное тормозящее действие на пролиферацию клеток *in vitro*.

Выход растений из покоя сопровождается появлением ауксинов и значительным усилением каллусообразования эксплантатов. Так, на основной среде МС без регуляторов роста наблюдается активная пролиферация клеток. Внесение в питательную среду 0,1–5 мг/л НУК даже несколько снижает каллусогенез. Видимо, в этом случае эндогенный уровень ауксинов в тканях достаточен для пролиферации клеток.

Весной в период вегетации растений клубнелуковица иксиолириона истощается, отдавая запасы питательных веществ наземным органам. Эксплантаты, изолированные из клубнелуковиц иксиолириона в этот период, обладают невысокой каллусообразующей способностью и на основной среде МС без регуляторов роста. Каллусогенез усиливается при добавлении в питательную среду 0,1 и 5 мг/л НУК. Исследование эндогенных ауксинов и ингибиторов показывает, что в тканях содержится низкий уровень ауксинов и накапливаются ингибиторы, по-видимому, тормозящие деление клеток.

Подобная зависимость каллусообразующей способности от уровня эндогенных фитогормонов характерна и для эксплантатов из различных органов унгернии. Низкая каллусообразующая способность эксплантатов из апикальной почки унгернии на основной среде МС без регуляторов роста коррелирует с незначительным уровнем цитокининов в интактных тканях покоящихся луковиц. Введение в питательную среду экзогенных цитокининов (0,1 и 5 мг/л БАП) лишь немного повышает каллусообразующую способность эксплантатов. Между тем, эти же эксплантаты, изолированные в сентябре, в период выхода растений из покоя, и помещенные на основную питательную среду МС без регуляторов, хорошо пролиферируют. На гистограмме (рис. 18) можно отметить высокий уровень эндогенных цитокининов в активной форме в интактных тканях растений. Видимо, наличие свободных эндогенных цитокининов достаточно для активной пролиферации без добавления в среду экзогенных регуляторов цитокининовой природы.

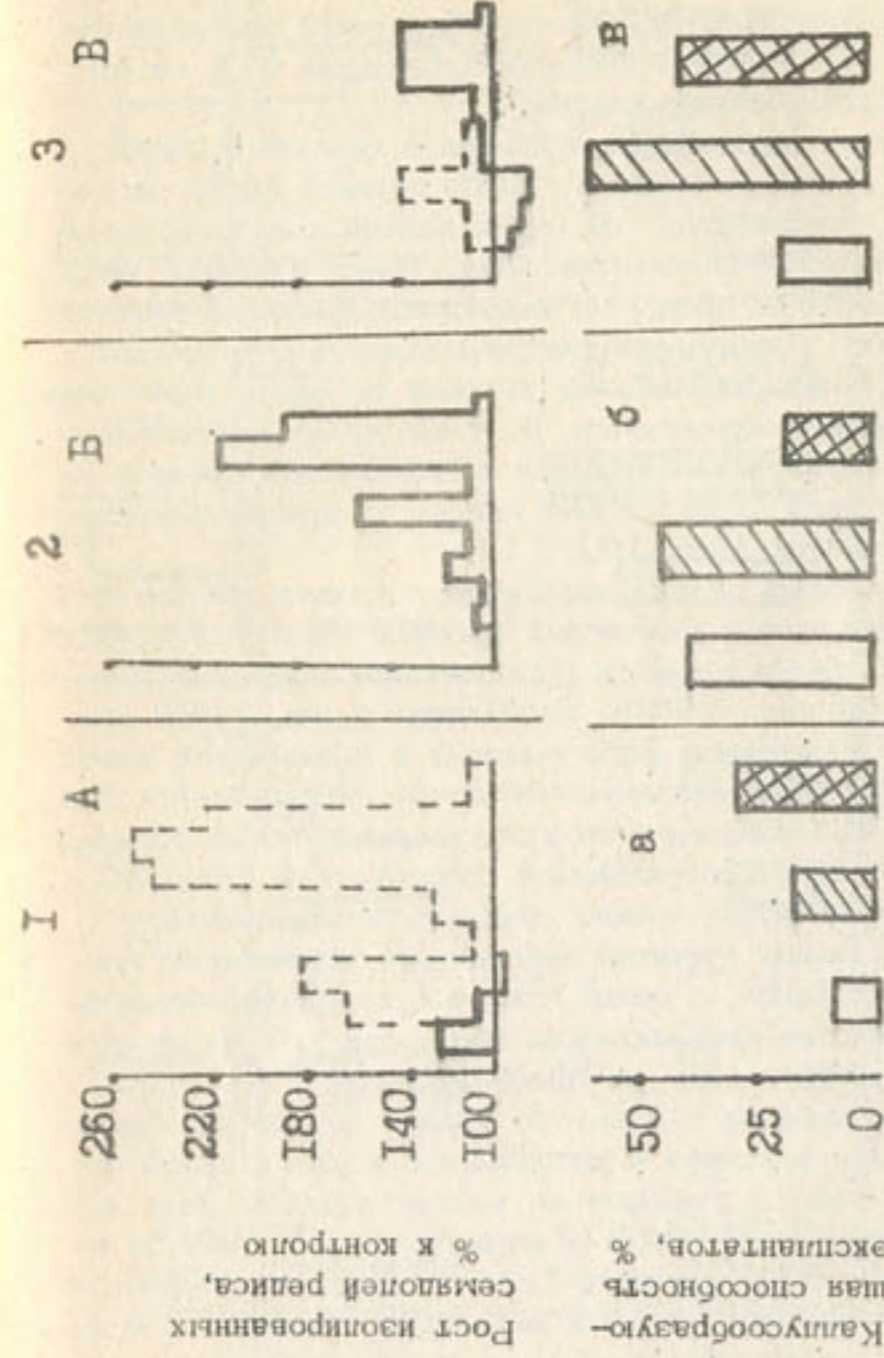


Рис. 18. Зависимость каллусообразования эксплантатов апикальной почки унгернии от уровня эндогенных цитокининов на разных этапах онтогенеза растений: 1-летний покой, 2-выход из покоя, 3-период вегетации; А, Б, В-биологическая активность эндогенных цитокининов, биоген: рост изолированных семяночек редиса; а, б, в - каллусообразующая способность эксплантатов (% от общего числа эксплантатов); □ - контроль, ▨ - 0,1 мг/л, ▩ - 5 мг/л кинетина

В период весеннего истощения луковиц снижается уровень свободных форм цитокининов в тканях апикальной почки унгернии. Эксплантаты, изолированные из этих луковиц, характеризуются более низкой каллусообразующей способностью. Введение в питательную среду МС кинетина (0,1 мг/л) усиливает пролиферацию клеток.

Отсутствие эндогенных ауксинов в интактной ткани апикальной почки унгернии в период легкого покоя растений также сказывается на очень низкой каллусообразующей способности эксплантатов. Экзогенные ауксины, введенные в питательную среду, не оказывают должного индуктивного действия. Лишь с накоплением эндогенного уровня ауксинов в тканях при выходе луковиц из покоя резко повышается и каллусообразование. В то же время постепенное накопление в тканях эндогенных ингибиторов в течение вегетации растений отрицательно влияет на пролиферирующую активность клеток (рис. 19).

Сравнительный анализ эндогенного уровня регуляторов роста показал, что в различных органах происходит неодинаковое накопление веществ гормональной природы (Джумашева, Сырганова, 1980; Джумашева и др., 1983 а). Содержание эндогенных фитогормонов в запасающей чешуе унгернии ниже, чем в апикальной почке. Эксплантаты, изолированные из запасающей чешуи унгернии, также обладали более низкой каллусообразующей способностью (рис. 20, 21). И в этом случае можно обнаружить определенную зависимость между уровнем эндогенного содержания ауксинов и цитокининов, с одной стороны, и каллусообразующей способностью эксплантатов, изолированных на различных этапах морфогенеза растений — с другой.

Тип органогенеза в культуре тканей во многом зависит от баланса ауксинов и цитокининов в питательной среде. В наших опытах превышение концентраций в среде ауксинов приводило в основном к формированию корней, в то время как при более высоких концентрациях цитокинина образовывались почки. Однако в некоторых случаях не выявлена такая закономерность. Так, инициация почек на каллусной ткани, возникшей из эксплантатов запасающей чешуи

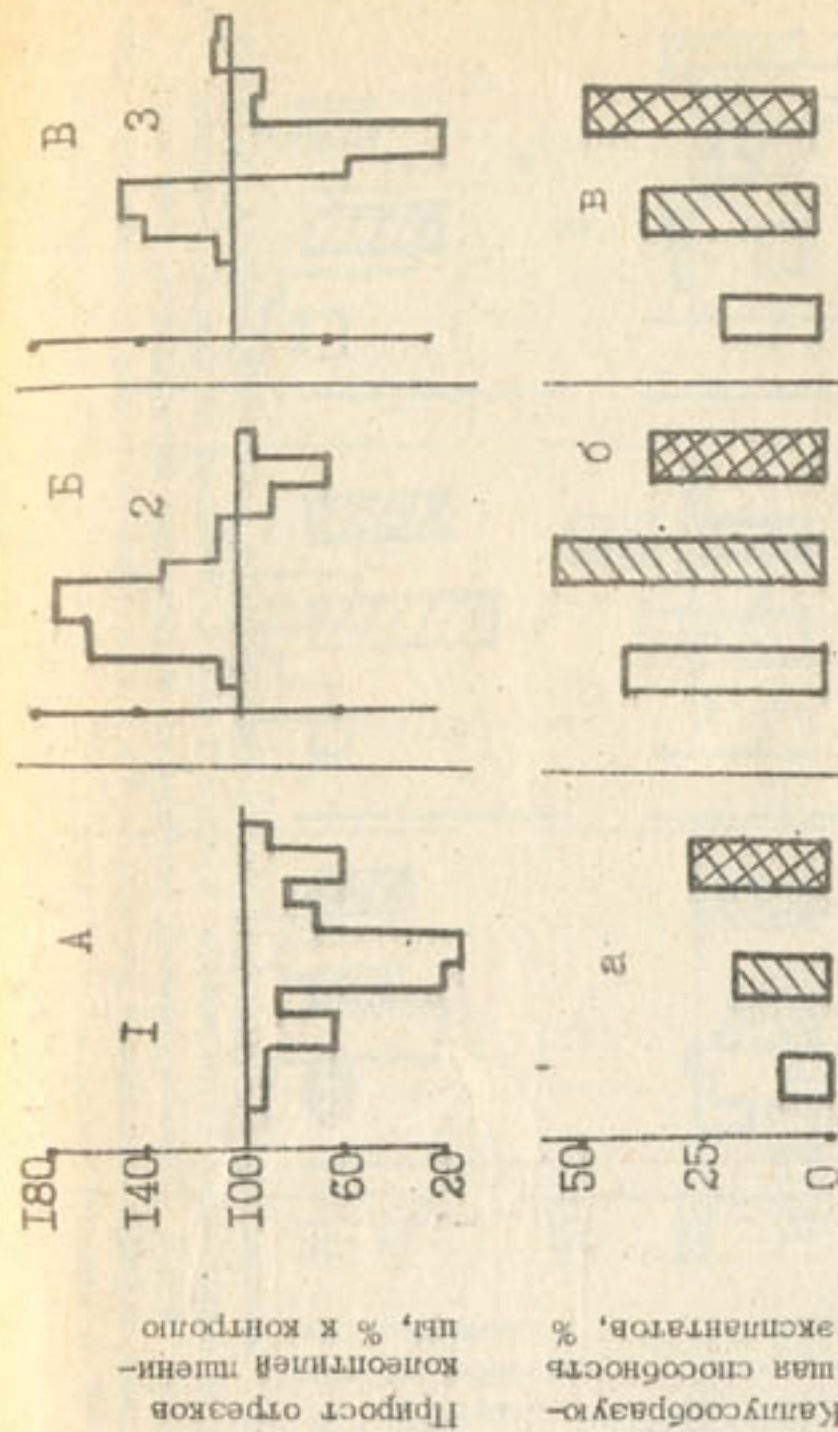
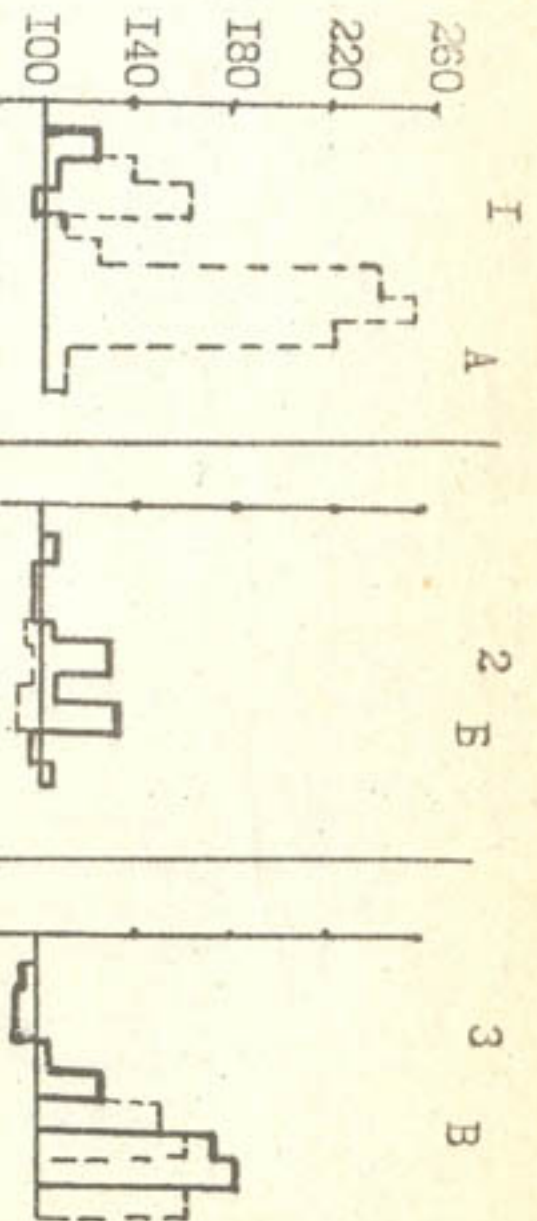


Рис. 19. Зависимость каллусообразования эксплантатов апикальной почки унгернии от уровня эндогенных ауксинов и ингибиторов на разных этапах онтогенеза растений: 1-летний покой, 2-выход из покоя, 3-период вегетации; А, Б, В — биологическая активность эндогенных ауксинов и ингибиторов, биогест: прирост отрезков coleoptилей пшеницы; а, б, в — каллусообразующая способность эксплантатов; □ — контроль, ▨ — 0,1 мг/л НУК, ▩ — 5 мг/л НУК

Рост изолированных
семядолей редиса,
% к контролю



Каллусообразую-
щая способность
эксплантатов, %

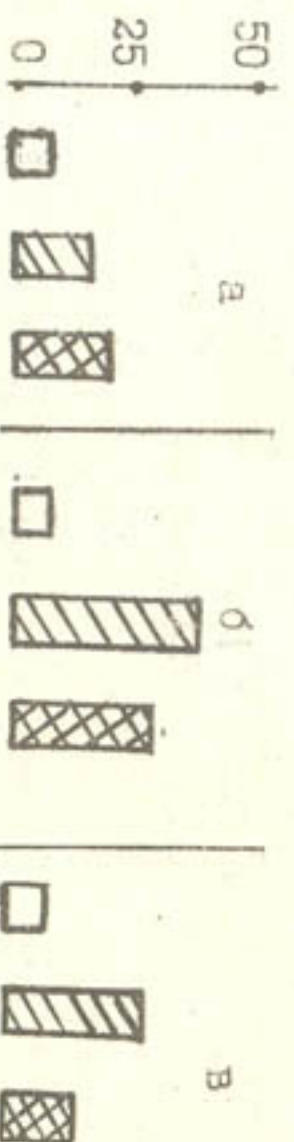
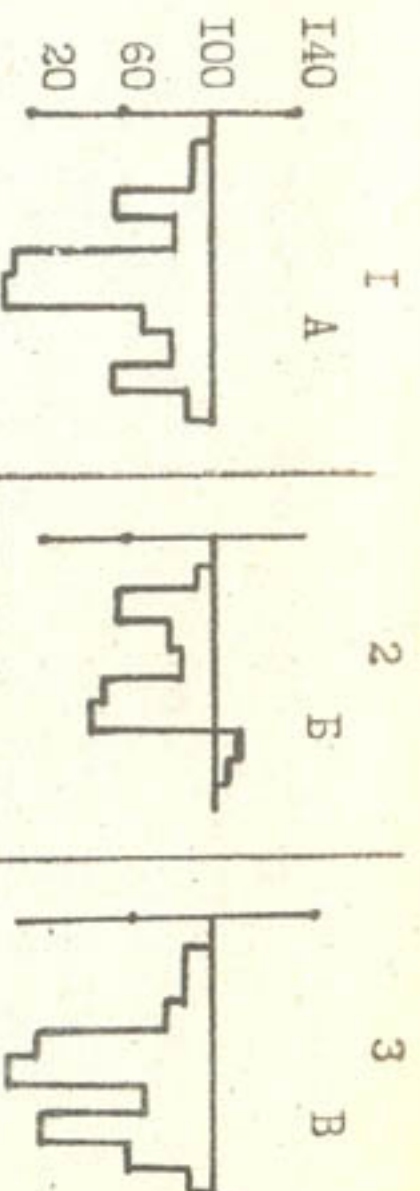


Рис. 20. Зависимость каллусообразования эксплантатов запасавшей чешуи унтернии от уровня эндогенных цитокининов: 1-летний покой, 2-выход из покоя, 3-период вегетации; А,Б,В - биологическая активность эндогенных цитокининов, биотест: рост изолированных семядолей редиса; а,б,в - каллусообразующая способность эксплантатов (% от общего числа эксплантатов); □ - контроль, ▨ - 0,1 мг/л кинетина, ▩ - 5 мг/л кинетина

Прирост отрезков
колеоптилей пшени-
цы, % к контролю



Каллусообразую-
щая способность
эксплантатов,
%

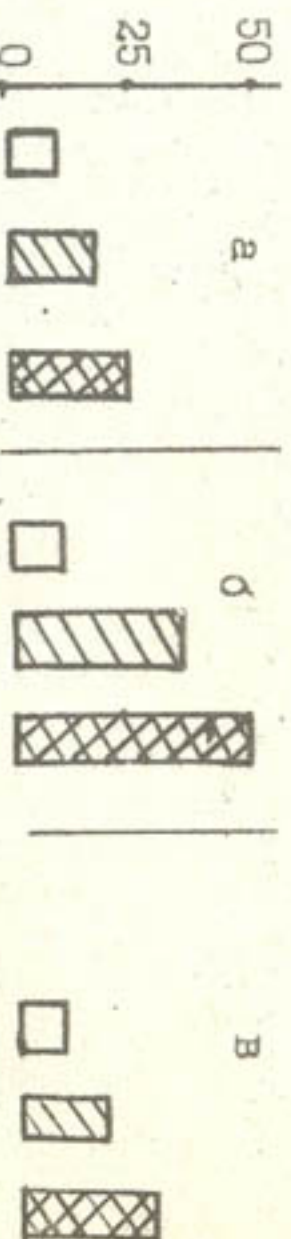


Рис. 21. Зависимость каллусообразования эксплантатов запасавшей чешуи унтернии от уровня эндогенных ауксинов и ингибиторов роста: 1-летний покой, 2 - выход из покоя, 3-период вегетации; А,Б,В - биологическая активность эндогенных ауксинов и ингибиторов, биотест: прирост отрезков колеоптилей пшеницы; а,б,в - каллусообразующая способность эксплантатов (% от общего числа эксплантатов); □ - контроль, ▨ - 0,1 мг/л НУК, ▩ - 5 мг/л НУК

унгернии, происходила на среде с 0,2 мг/л кинетина и 1 мг/л НУК. Казалось бы, здесь нарушается правило, согласно которому только при более высоких концентрациях цитокининов формируются почки. Но анализ эндогенного уровня ауксинов и ингибиторов запасавшей чешуи показывает, что в этих тканях накапливается очень мало ауксинов (Джумашева, Рахимбаев, 1981 а). Поэтому введение в питательную среду МС только более высоких концентраций ауксина благоприятно сказывается на формировании почек и образовании из них зачаточных листьев. В другом случае каллусная ткань сформировалась на эксплантате из клубнелуковицы иксиолириона, изолированного в период активного роста растений. Проллиферация интенсивно проходила на среде с 1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП. Пассаж каллусной ткани на индуктивную среду (0,1 мг/л НУК + 1 мг/л БАП) в целях формирования почек не дал желаемого результата. Одновременно на трансплантате ткани, помещенной на среду с обратным соотношением регуляторов роста (0,1 мг/л БАП + 1 мг/л НУК), через 3 нед начали формироваться почки, из которых впоследствии развились побеги.

Мы вновь анализировали эндогенные ауксины и цитокинины и обнаружили, что в интактных тканях клубнелуковицы иксиолириона в эндогенном балансе ауксин/цитокинин превалировало содержание цитокининов (Джумашева и др., 1983). Поэтому введение только повышенных концентраций ауксина, по всей вероятности, создавало нормальный фитогормональный баланс, необходимый для инициации стеблевых почек иксиолириона. Следовательно, индукция морфогенеза *in vitro* протекает при оптимальном соотношении баланса экзогенных и эндогенных фитогормонов.

Изучение регенерационной способности эксплантатов из различных органов унгернии и иксиолириона выявило определенные различия в их возможности к собственно регенерации с восстановлением утраченных органов или формированием новых растений-регенерантов. Причем сами эксплантаты проявляли сезонное различие по их регенерационной способности. Экзогенные регуляторы роста лишь в определенных случаях влияли на формирование адвентив-

ных побегов у растений. Наиболее высокой регенерационной способностью обладали эксплантаты при их изолировании во время выхода растений из покоя. Накопление в большом количестве эндогенных фитогормонов характерно именно на данном этапе развития.

Мы полагаем, что усиленное формирование в это время адвентивных почек происходит под индуктивным влиянием имеющегося эндогенного баланса ауксин-цитокинин. Экзогенные регуляторы роста, вносимые в питательную среду, не оказали существенного влияния на инициацию формирования почек. Становится понятным, почему формирование адвентивных побегов идет в одинаковой степени на основной среде МС и на вариантах сред с регуляторами роста. Высокий уровень эндогенных ауксинов и цитокининов в интактных тканях апикальной почки унгернии и растущих клубнелуковицах иксиолириона при изолировании эксплантатов во время выхода растений из покоя способствует усиленной инициации адвентивных побегов. Именно тогда образуется максимальное число адвентивных побегов (7-8) на эксплантатах из апикальной почки унгернии, базальной части клубнелуковицы (2-3), помещенных на основную среду МС и на варианты сред с добавлением 0,1-0,5 мг/л НУК; 0,1 - 0,5 мг/л БАП; 1 мг/л НУК + 1 мг/л БАП.

Возможное участие экзогенных регуляторов роста в индукции процессов собственно регенерации *in vitro* проявляется при изолировании эксплантатов весной, в период активного роста растений. Так, формирование адвентивных побегов на эксплантатах из базальной части запасавшей чешуи унгернии происходит на вариантах сред с добавлением 0,1-0,5 мг/л НУК и при совместном внесении 1 мг/л и 1 мг/л БАП. Инициация побегов на эксплантатах из апикальной почки унгернии не зависит от гормонального состава среды, но число образующихся побегов (3-4) ниже, чем на эксплантатах, изолированных при выходе растений из покоя.

Формирование адвентивных побегов на эксплантатах из базальной части клубнелуковицы иксиолириона при их изолировании в период осеннего выхода растений из покоя проис-

Регенерационная способность эксплантатов унгернии и иксиолириона на разных этапах онтогенеза растений

Срок изолирования эксплантатов	Состав среды, мг/л	Число адвентивных побегов, сформированных за 1 мес на эксплантатах		
		Заласающая чешуя унгернии	Апикальная почка унгернии	Клубне-луковица
Выход из покоя (сентябрь-октябрь)	Основная среда МС	1-2	7-8	2-3
	0,1 БАП	1-2	7-8	2-3
	0,1 НУК	1-2	7-8	2-3
	1 НУК 1 БАП	1-2	7-8	2-3
Летний покой (июнь-июль)	Основная среда МС	-	-	-
	0,1 БАП	-	-	-
	0,1 НУК	-	-	-
	1 НУК 1 БАП	-	-	-
Период вегетации (март-апрель)	Основная среда МС	-	3-4	1-2
	0,1 БАП	-	3-4	1-2
	0,1 НУК	1-2	2-4	3-4
	1 НУК 1 БАП	1-2	2-4	3-4

ходит без воздействия экзогенных регуляторов роста. На всех вариантах сред образуется одинаковое число инициалей (2-3). При изолировании эксплантатов весной на основной среде МС без регуляторов роста и на вариантах сред с 0,1-0,5 мг/л БАП формируются 1-2 почки, тогда как при добавлении в среду 0,1-0,5 мг/л НУК и 1 мг/л НУК + 1 мг/л БАП увеличивается число инициалей до 3-4 (см. таблицу). Такое изменение чувствительности эксплантатов к гормональному составу среды, по-видимому, зависит от эндогенного баланса фитогормонов в интактной ткани на данной фазе развития растений. В этот период в тканях не обнаружены эндогенные ауксины. Следовательно, эксплантаты чувствительны к экзогенным регуляторам роста данного типа. Индукция адвентивных побегов, вероятно, осуществляется путем совместного действия эндогенных и экзогенных регуляторов роста.

Итак, существует коррелятивная зависимость между каллусообразующей способностью эксплантатов, изолированных из различных органов унгернии и иксиолириона, и уровнем эндогенного содержания ауксинов и ингибиторов в интактных тканях растений (Джумашева, 1983 а). При высоком содержании эндогенных ауксинов и цитокининов соответственно повышается и каллусообразующая способность эксплантатов. Накопление в тканях связанных, неактивных форм фитогормонов и веществ ингибиторной природы снижает интенсивность каллусообразования. Высокой каллусообразующей способностью различные эксплантаты обладали при их изолировании осенью, в период всхода растений из покоя. В это время ткани характеризуются наибольшим содержанием эндогенных ауксинов и цитокининов. При уменьшении уровня эндогенных фитогормонов в интактных тканях каллусообразующая способность эксплантатов снижается. Индукторами каллусогенеза в это время в основном являются эндогенные регуляторы роста. Эксплантаты, изолированные во время летнего покоя растений, обладают низкой каллусообразующей способностью, что связано с отсутствием эндогенных ауксинов и цитокининов, а также наличием высоких концентраций ингибиторов роста. Наличие высокого уровня ингибирующих

соединений в тканях, по-видимому, тормозит ростовые процессы, поэтому у эксплантатов, изолированных в период покоя растений, не наблюдалось активной пролиферации клеток *in vitro*.

Индукция процессов органогенеза в каллусных тканях унгернии и иксиолириона осуществляется при оптимальном соотношении экзогенных и эндогенных регуляторов роста.

Процессы собственно регенерации эксплантатов из различных органов амариллисовых с образованием адвентивных побегов проходят при наличии высокого содержания эндогенных ауксинов, цитокининов и без влияния экзогенных регуляторов роста. Снижение уровня эндогенных фитогормонов в тканях обуславливает повышенную чувствительность эксплантатов к экзогенным регуляторам роста в питательной среде и способность формировать адвентивные почки под их индуктивным влиянием.

Таким образом, вероятно, процессы каллусогенеза, органогенеза, собственно регенерации *in vitro* проходят с определенным участием эндогенных фитогормонов в интактных тканях унгернии, иксиолириона и экзогенных регуляторов роста, входящих в состав питательной среды.

Приемы вегетативного микроразмножения луковичных растений

Гиацинт. Способ быстрого вегетативного размножения гиацинта предлагают R.Pierik, A.Post (1975). Изолированные сегменты чешуй длиной 3-4 см и шириной 0,5 см помещали в питательную среду, содержащую половинную концентрацию макроэлементов на Кноп, микроэлементы по Хеллеру (за исключением хлорного железа), $\text{NaFe} - \text{EDTA}$ 25 мг/л, глюкозу 2%, агар 0,6%. Необходимым условием для регенерации бульбочек было наличие базальной части чешуи. Через 12 нед от 1 исходной луковицы получено 240-300 луковичек.

Для клонального микроразмножения гиацинта Y.Kim (1981) использовал также культуру цветочных почек. Луковички высаживали в смесь горфа, перлита и почвы (2:2:1) для ускорения развития. Далее цветочные почки дли-

ной 4-5 мм разделяли на 2 половинки, которые культивировали на среде МС с добавлением 10 мг/л инозитола, 2 мг/л глицина, витамины (0,5 мг/л РР, 0,5 мг/л B_6 , 0,4 мг/л B_1), 30 г/л сахарозы и 8 г/л агара. Кроме того, в среду добавляли НУК и БАП. Образование луковичек происходит на поверхности среза цветочных почек через 6 нед на среде, содержащей 0,3 мг/л НУК и 0,3 мг/л БАП. Для стимуляции корнеобразования в среду вносили 0,1 мг/л НУК. В этих условиях растения развивались успешно, в результате чего 90-100% пригодны для посадки в почву. Такой способ позволяет получить до 1 тыс. растений от 1 соцветия.

Лилия. Из луковицы, состоящей из 100 чешуй, можно получить более 8000 деток через 6 нед (Stimart, Ascher, 1978). Для этого срезы чешуй толщиной 1 мм культивируют на среде Линсмайера-Скуга с добавлением 0,03 мг/л НУК. В темновой культуре при 25°C увеличивается количество и размер луковичек за счет уменьшения числа и размеров листьев. Культура с 16-часовым периодом освещения и 8-часовым темновым периодом подавляет развитие луковицы, но стимулирует листообразование, увеличивает массу корней.

Возможность регенерации растений лилии из сегментов чешуй и завязи показали F.Novak, E.Petru (1981). Луковички выкапывали в октябре и хранили до марта при 5-10°C, затем разрезали на чешуи, а в июне (за 15 сут до цветения) у растения извлекали завязи. В качестве эксплантатов служили сегменты чешуй и завязи толщиной 1-2 см и 2-3 мм соответственно. Эксплантаты помещали в пробирки со средой Линсмайера-Скуга. Начало образования почек наблюдали уже через 10-14 сут. Максимальное количество деток отмечали при введении в среду 10 мкМ НУК (16,8 шт. эксплантат). Отделенные от эксплантатов детки формировали корни на среде, не содержащей гормоны, или при добавлении 1-5 мкМ НУК.

Схему массового размножения лилии *in vitro* предлагают S.Takayama, M.Misawa (1983 a). Чешуи луковиц культивировали на среде МС с 0,1 мг/л НУК, 10 мг/л кинетина при постоянном освещении и температуре 25°C. Че-

рез 60 сут формировались адвентивные чешуи. Выдерживание лукович перед введением в изолированную культуру при 5 °С значительно увеличивало частоту образования адвентивных чешуй. Далее чешуи переносили в жидкую среду без цитокининов, где формировались луковички. Время удвоения сухой массы составляет 15-20 сут. Образовавшиеся *in vitro* луковички требовали холодной обработки перед переносом в почву. Теоретически от 1 луковички среднего размера через 45 сут можно получить 2000 лукович.

Гладиолус. Размножение гладиолуса *in vitro* с помощью быстрого формирования пазушных побегов предлагает G. Hussey (1977). У лукович изолировали пазушные почки и культивировали при 20 °С, освещенности 8000 лк на среде, содержащей половинные концентрации солей по МС, 50 мг/л инозитола, 0,5 мг/л тиамина и 2% сахарозы. Побег из пазушных почек лучше всего развивался при добавлении в среду 0,12-0,5 мг/л БАП. Растения, не пересаживаемые на свежие питательные среды, постепенно попадали в покой и образовывали маленькие луковичы. В результате пазушного ветвления до 500 растений можно получить от каждой пазушной клубнелуковички через 12 мес и более 30000 - через 18 мес. Учитывая, что в среднем на клубнелуковичке гладиолуса имеется по 3 пазушные почки, цифры возрастают соответственно до 15000 и 90000.

Гиппеаструм. Размножение луковичных растений методом парных чешуй предлагает Г.И. Выхристова (1981). 3-летние луковичы гиппеаструма с удаленными наружными чешуями и отмершими участками донца стерилизовали. У обработанных лукович удаляли верхнюю треть и в дальнейшем ее не использовали. Оставшуюся часть в зависимости от размера посадочного материала нарезали продольно на 8 или более секторов, которые потом делили на парные чешуи с кусочком донца (из 1 луковичы получают 35-60 парных чешуй). Эксплантаты помещали в пробирки со средой МС с добавлением 10 мг/л БАП или 1 мг/л НУК. Пробирки в течение 1 мес находились при 17 °С, освещенности 300 лк. Затем интенсивность увеличивали до 600-700 лк, а температуру - до 23 °С. Первые проростки по-

являлись через 1, последние - через 4 мес. По мере их развития переносили для укоренения в 200-миллиметровые стерильные сосуды на среду, содержащую половинное от исходной нормы количество солей, без добавления регуляторов роста. Спустя 1 мес, когда образовались маленькие луковичы с корешками, их пересаживали на стерильный субстрат и помещали во влажную камеру. Через 2-3 нед окрепшие растения переносили в теплицу.

Аналогично гиппеаструму можно размножить и другие луковичные растения - нерине, мускари.

При размножении гиппеаструма в культуре *in vitro* используют и модифицированную среду Кнудсона (Jana, 1981). Подготовленные луковичы разрезают на части, содержащие кусочки чешуи и донца, и культивируют при температуре 22-25 °С и освещенности 4 тыс. лк. Образование побегов начинается через 20-25 сут. Луковича диаметра 6 см дает до 150-200 растений, зацветающих через 2-2,5 года.

Нарцисс. J. Seabrook с соавт. (1976) сообщают о новой методике быстрого размножения нарцисса, основанной на индукции апексов побегов и корней из маленьких кусочков ткани оснований листа, перевернутых сегментов цветоноса и завязи в культуре *in vitro*. Использовали среду, содержащую неорганические соли по T. Murashige, F. Skoog (1962), органическую часть по M. Ziv с соавт. (1970). Проллиферацию апексов побегов индуцировали на среде, содержащей 10 мг/л БАП и 1 мг/л НУК. Растения хорошо росли при переносе на среду с 2 мг/л БАП и 2 мг/л НУК. Для индукции корней требуется половинное количество солей и сахарозы, а также исключение из среды регуляторов роста. В течение 5 мес из 2 эксплантатов оснований листа получили 2620 растений-регенерантов.

Размножение нарцисса *in vitro* с помощью формирования адвентивных побегов осуществил G. Hussey (1982). Эксплантаты листьев, чешуй и стеблей из базального участка донца лукович культивировали на среде МС с 2-16 мг/л БАП и 0,25-4 мг/л НУК. Полученные адвентивные побеги в свою очередь разделяли для получения новых побегов.

Постепенно побеги снижали темп роста, старели и формировали покоящиеся луковицы. В течение 18 мес из 1 луковицы таким методом можно получить 500-2000 луковиц.

Лук. М. Laroche, M. Verhoeyen (1980) разработали метод быстрого размножения *in vitro* *Allium aescalonicum*. Эксплантаты, содержащие ткани донца, чешуйки и точку роста, помещали на питательную среду В₅. Луковицы формировались на среде, дополненной 0,1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП и 4% сахарозы. После 2 мес развития в пробирке культуры переносили в почву. Описанным способом из 1 луковицы в результате 1 цикла размножения получили 500 растений-регенерантов.

Шафран. В естественных местообитаниях размножается с помощью клубнелуковиц, однако коэффициент вегетативного размножения невысок. Между тем для ускорения интродукции и сохранения генофонда возникает необходимость в разработке эффективных приемов искусственного вегетативного размножения шафрана.

Результаты наших исследований по изучению регенерационной способности эксплантатов из различных частей клубнелуковицы редких видов шафрана *in vitro* позволили разработать приемы клонального микроразмножения этих растений.

Активация роста пазушных почек и их культивирование. Для подавления апикального доминирования верхушечных почек и активации роста пазушных почек стерилизованные клубнелуковицы помещают в пробирки на среду МС с 5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП.

Через 2 мес после посадки отмечается рост побегов. При этом вытягивается не только побег, развивающийся из апикальной почки, но и побеги из пазушных почек (1-го порядка). Рост побегов незначителен, длина не превышает 8-10 мм. Еще через 1 мес основания побегов несколько утолщаются, формируются клубнелуковички-детки, на которых закладываются новые почки, в свою очередь дающие начало побегам 2-го порядка.

Далее побеги 2-го порядка изолируют и пересаживают на питательную среду для индукции ризогенеза, последую-

щего роста и развития. Оптимальная концентрация гормонов для индукции и роста корней – культивирование эксплантатов в течение 2 мес на среде с 1 мг/л 2,4-Д и 0,1 мг/л БАП. Исключение результатов роста из среды и выпаривание пробирочных культур в течение 3 нед при низкой температуре (+5°C) стимулируют интенсивный рост корней. Затем сформированные растения-регенеранты высаживают в кюветы со смесью вермикулита и торфа и переносят в теплицу, где происходит дальнейший рост побегов и корней. По окончании вегетации основания побегов утолщаются за счет питательных веществ ассимилирующих листьев и превращаются в замещающие клубнелуковицы. В результате культивирования новообразованных пазушных почек из одной исходной клубнелуковицы через 6 мес можно получить около 100 растений-регенерантов.

Вегетативное размножение путем деления клубнелуковицы на части. В условиях стерильного бокса клубнелуковицы делят на несколько частей так, чтобы на каждом сегменте было по одной почке (апикальной и пазушной). Эксплантаты высаживают в пробирки, содержащие стерилизованный песок и питательную среду Гельригеля.

Через 4 мес, когда высота побегов достигает 3,5-4 см, длина корней – 1,5-2 см, пробирки с изолированными сегментами помещают в условия низкой температуры (+5°C) на 2 мес, а затем опять культивируют при комнатной температуре. Наблюдается активный рост корней и побегов, появляются ассимилирующие листья. По окончании вегетации основания побегов утолщаются за счет питательных веществ сегментов и развиваются в замещающие клубнелуковицы. Старые корни отмирают, от базальной части вновь сформированных клубнелуковиц отрастают контрактильные корни, имеющие форму толстых, суживающихся к концу стержней. После завершения вегетации растений и перехода сформированных клубнелуковиц в покоящееся состояние их пересаживают в открытый грунт. Из 1 клубнелуковицы за 7 мес можно получить по 10 растений-регенерантов.

Формирование придаточных почек и их культивирование. При посадке сегментов клубнелуковицы на питательную сре-

ду МС с 5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП через 2 нед по краям раневой поверхности образуются многочисленные адвентивные побеги. В дальнейшем побеги переходят к росту и спустя 2 мес культивирования достигают 3 см высоты. Пересадка сегментов с адвентивными побегами на среду с 0,1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП приводит к образованию миниатюрных клубнелуковичек у основания побегов. Еще через 2 мес сформированные побеги изолируют и переносят на среду с 0,01–0,05 мг/л НУК для ускорения. После образования корней для последующего развития такие растения-регенеранты пересаживают на свежую питательную среду с половинной концентрацией солей по Мурасиге-Скуга без регуляторов роста, содержание сахарозы снижают до 15 г/л. Через 1 мес растения пересаживают в кюветы со смесью вермикулита, торфа и переносят в теплицу. При этих условиях побеги интенсивно растут и зеленеют.

Далее растения 3 нед выдерживают в условиях пониженной температуры (+5°C), затем 3 мес культивируют в теплице. Постепенно растения стареют, формируют клубнелуковицы. В последующем такие покоящиеся клубнелуковицы высаживают в почву. Весь цикл формирования и развития растений-регенерантов длится около 8 мес. В результате изолирования и культивирования адвентивных побегов из 1 эксплантата размером 10x10 мм можно получить до 30, а из 1 клубнелуковицы – до 90 растений-регенерантов.

Культивирование изолированных почек. В качестве эксплантатов используются непосредственно сами клубнелуковички высотой 0,5–1 мм с захватом небольшого участка прилегающей ткани клубнелуковицы размером 5x5 мм. На среде МС с 1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л НУК происходит активный рост побегов и развитие мощной корневой системы, разворачиваются ассимилирующие листья. В дальнейшем пробирочные культуры закалывают, выдерживая их в течение 3 нед при 5°C, после чего пересаживают в кюветы со смесью вермикулита и торфа и переносят в теплицу. Растения развиваются до формирования замещающих клубнелуковиц. В результате культивирования изолированных почек из 1 исходной клубнелуковицы можно получить через 6 мес до 10 растений-регенерантов.

Унгерния Северцова и иксиолирион татарский в природных условиях размножаются вегетативно с помощью подземных запасных органов: луковиц и клубнелуковиц. В связи с существующей реальной угрозой исчезновения этих редких растений, представляющих исключительный интерес в медицине, декоративном садоводстве, а также для сохранения генофонда, целесообразна разработка приемов их ускоренного размножения. Одним из эффективных способов разрешения этой задачи – метод клонального микроразмножения.

В результате работ по культивированию *in vitro* изолированных органов и тканей амариллисовых нами разработаны три способа их клонального микроразмножения.

1. Культура изолированных почек. Индукцией адвентивных почек на эксплантатах базальной части апикальной почки унгернии возможно получение целых растений-регенерантов. Эксплантаты размером 10x10 мм культивируют на питательной среде МС.

Формирование адвентивных почек происходит на месте среза эксплантатов. Вначале эксплантаты увеличиваются в размере до 2–3 см, через 2 нед происходит инициация почек, из которых впоследствии образуются новые луковицы. Наиболее интенсивно регенерационные процессы проходят при изолировании эксплантатов в период выхода растений из покоя (сентябрь–октябрь). В это время индукция адвентивных почек на эксплантатах осуществляется и без внесения регуляторов роста в основную питательную среду МС. На эксплантате базальной части апикальной почки унгернии на месте среза одновременно формируются 3–5 адвентивных почек, из которых образуются луковички. Через 2 мес, когда луковички-регенеранты достигают значительных размеров (2–3 см), образовав характерные для унгернии коричневые покровные чешуи, на месте среза вновь начинают формироваться новые адвентивные почки. Так, в течение 3 мес культивирования из 1 эксплантата апикальной почки унгернии размером 10x10 мм можно получить 7–8 растений-регенерантов. Далее, вновь сформированные молодые луковички отделяют от материнского эксплантата и помещают каждую в отдельности на разбавленную в 2 раза питательную среду МС (1/2) с

добавлением 2 мг/л НУК для усиления процесса ризогенеза. Закаливание растений-регенерантов перед высадкой в грунт осуществляется путем хранения в холодильнике при 3-5°C в течение 2 мес. Затем луковички-регенеранты высаживают в кюветы со смесью вермикулит, торф; переносят в теплое помещение и в течение 2 нед прикрывают полиэтиленовой пленкой. Данным способом при культивировании изолированных почек из 1 луковицы унгернии за 6 мес можно получить до 80-100 растений-регенерантов.

2. Культура изолированных чешуй. Луковицу унгернии разделяют на чешуй. В качестве эксплантатов берут базальные части сегментов запасящих чешуй унгернии. Индукция адвентивных почек на эксплантатах базальной части чешуй унгернии осуществляется под воздействием экзогенных регуляторов роста, добавляемых в питательную среду МС.

Процессы регенерации на эксплантатах проходят интенсивно при добавлении в питательную среду по 1 мг/л НУК и БАП. На раневой поверхности эксплантата вначале образуются 1-2 адвентивные почки, через 1 мес. - еще 1-2; их также отделяют от материнского эксплантата и пересаживают по отдельности на питательную среду с половинным содержанием всех компонентов по МС. Дальнейшие операции проводятся как и при методе 1. Луковицы унгернии имеют в среднем 8-10 запасящих чешуй. Для культивирования изолированных чешуй используют лишь сегменты базальной части чешуй размером 10x10 мм. Из чешуй 1 луковицы унгернии в течение 6 мес культивирования можно получить до 150-200 растений-регенерантов.

3. Микроразмножение путем деления клубнелуковицы на части. Базальную часть клубнелуковицы иксиолириона делят на 4 части с захватом ткани донца. Эксплантаты помещают на основную среду МС без регуляторов роста и культивируют. Адвентивные почки на неповрежденной поверхности эксплантата образуются через 4 нед культивирования. Из них в свою очередь образуются молодые клубнелуковички иксиолириона. Рост молодых клубнелуковичек становится более интенсивным, появляются небольшие утолщенные корни. Еще через 3 нед начинается активное побегообразование, длина побегов достигает 5-7 см. Для усиления ризогенеза

клубнелуковички пересаживают на среду МС с добавлением 1 мг/л БАП и 2 мг/л НУК. Сформированные растения-регенеранты держат в холодильнике 1-1,5 мес при температуре 3-5°C, затем переносят в теплое помещение, высаживают в кюветы со смесью вермикулит, торф. Первые 2 нед растения накрывают полиэтиленовой пленкой. Из 1 клубнелуковицы иксиолириона путем деления клубнелуковицы на части при индукции адвентивных почек за 5-6 мес можно получить до 20-30 растений-регенерантов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методы культуры тканей успешно применяются для размножения ценных, редких и медленно размножающихся растений. В основе получения целых растений из изолированных тканей и органов лежит процесс регенерации.

У высших растений регенерация органов происходит преимущественно по типу репродукции, т.е. путем новообразования не с поверхности среза, а где-либо в другом участке тела растения, хотя бы и близко к месту ранения. Реституция — тип регенерации, когда новообразование происходит непосредственно с поверхности среза, встречается гораздо реже (Кренке, 1950).

Фитогормоны (цитокнины и ауксин) оказывают значительное влияние на процессы регенерации. По-видимому, это обусловлено тем, что цитокнины обладают полифункциональным характером действия (Кулаева, 1973). Биологическая активность цитокнинов многообразна и проявляется при регуляции роста, органообразования, процесса старения, стимуляции клеточных делений, развития боковых корней, закладке регенеративных органов и ускорения цветения, активации прорастания покоящихся семян, клубней и луковиц (Рахимбаев, Соколомина, 1980). Цитокнинам присущи аттрагирующие свойства, т.е. способность удерживать и притягивать метаболиты и питательные вещества к местам своей локализации (Engelbrecht, Mothes, 1960). Физиологическое действие цитокнинов проявляется в тесном взаимодействии с ауксинами, которые стимулируют деление, растяжение клеток, участвуют в регуляции процессов роста и морфогенеза (Кефели, 1974; Кулаева, 1979).

Все это свидетельствует о разнообразных физиологических

эффектах цитокнинов на уровне целого растительного организма и в культуре изолированных органов и тканей, позволяющих сформулировать идею о полифункциональности действия цитокнинов (Кулаева, 1973). Однако каждый из различающихся по своему проявлению эффектов установлен при действии цитокнинов на разные модельные системы. В связи с этим интересно было исследовать возможность проявления полифункциональности цитокнинов на одной и той же биологической модели — культуре изолированных почек шафрана.

Мы изучали влияние регуляторов роста на поведение изолированных апикальных и пазушных почек в культуре *in vitro*. Из почек отрастали побеги на среде МС, содержащей цитокнины (0,1–20 мг/л). Чем больше уровень цитокнинов в питательной среде, тем выше скорость роста побегов. Концентрация кинетина в среде 0,1–5 мг/л индуцирует заложение зачатков корней и их рост. Высокие дозы цитокнинов вызывают у апикальных и пазушных почек наряду с ростом побега образование каллуса, формирование контрактильного корня, а также многочисленных адвентивных побегов. При этом формирование адвентивных побегов происходит из клеток эпидермиса и клеток паренхимной ткани верхней части эксплантата клубнелуковицы, прилегающей к клубнепочке. Из клеток, расположенных вблизи сосудистой ткани, развиваются корни, а из паренхимных клеток базальной части эксплантата образуется каллус.

Таким образом, нами выявлен множественный эффект цитокнинов на процессы роста: дифференцировки и морфогенеза в культуре изолированных почек шафрана (рис. 22). Тип морфогенеза (рост побега, образование каллуса, ризогенез и формирование адвентивных побегов) зависит от концентрации цитокнинов и структурно-функционального состояния интактных тканей эксплантата, вызывая ту или иную морфогенетическую реакцию (либо их комбинацию) в культуре изолированных почек клубнелуковицы шафрана.

Ауксин, не оказывая существенного влияния на морфогенетическую реакцию эксплантатов, усиливает эффект цитокнинов при совместном их действии, т.е. проявляется синер-

гизм. Оптимальным требованием для формирования растений-регенерантов с хорошо развитой корневой системой является культивирование изолированных апикальных и пазушных почек клубнелуковицы на питательной среде МС с 1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л НУК.

Мы рассмотрели один путь микроразмножения *in vitro*, основанный на культуре меристемы. Источник меристемы — апикальные и пазушные почки покоящихся клубнелуковиц. Растения, получаемые таким способом, морфологически и генетически не отличаются от растений, выращиваемых *in vivo*. Методы, основанные на естественных механизмах формирования пазушных и адвентивных побегов, должны способствовать достижению этой цели.

Культура каллуса представляет собой другой путь: индукция и рост каллусной ткани, дифференциацию органов, что должно привести к образованию вполне развитого растения.

Клетки каллусных тканей являются основным типом клеток при культивировании растительных тканей *in vitro*. Каллусообразование — естественная реакция на поражение растения.

Генетическая стабильность клеток каллуса невысока. На многих субкультурах наблюдаются возрастающие отклонения в числе хромосом (полиплоидия, анеуплоидия) и другие генетические изменения. Поэтому регенерировавшие из каллуса растения часто отличаются от своих родителей числом хромосом. Генетически идентичное воспроизведение генотипов через дифференциацию в культуре каллуса в настоящее время можно осуществить только у некоторых видов при определенных условиях (использование первичного каллуса при малых субкультурах). Таким путем J. Simmonds, B. Cumming (1976) получили в большом количестве луковицы из каллуса луковичной чешуи гибридов лилии в целях повышения коэффициента размножения.

Однако для селекции большую ценность могут представлять также регенерированные из каллуса, генетически легко изменяемые растения, так как за их счет обеспечивается увеличение генетической изменчивости (Fridborg, 1971).

Следовательно, исследование морфогенетических потенций каллусных тканей способствует расширению генетического базиса, что обеспечивает эффективность селекции растений, позволяет сохранить и размножить ценные и уникальные генотипы.

Различные органы и ткани шафрана (апикальные и боковые почки, корни, листья, кусочки тела клубнелуковицы, цветонос, завязь, тычинки, пестик) обладают каллусообразующей способностью на среде МС, дополненной 2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л аденина и 0,4 мг/л кинетина в темноте и при 16-часовом световом периоде. Эксплантаты, происходящие из вегетативных органов, образовывали каллус более интенсивно по сравнению с тканями генеративных органов. С другой стороны, с изменением баланса гормонов в питательной среде меняется и скорость образования каллуса. Например, при культивировании эксплантатов с низкой каллусообразующей способностью (цветонос, завязь) на среде с 1 мг/л НУК и 0,1 мг/л БАП каллусогенез резко усиливается. При этом образование каллуса на отрезках цветоноса интенсивнее у перевернутых эксплантатов с обращенной полярностью. По мнению J. Seabrook и соавт. (1976), такое явление может быть связано с полярным транспортом ауксина, способствующего образованию каллусной ткани. Следовательно, происхождение эксплантата, его полярность, а также состав и концентрация регуляторов роста в питательной среде оказывают существенное влияние на каллусообразующую способность различных тканей шафрана.

Образование каллуса у апикальных почек возобновления в значительной степени зависит от температурного режима культивирования. Так, предварительная обработка низкой температурой (5°C) в течение 3 нед стимулировала увеличение объема почек одновременно с образованием каллуса в базальной части эксплантата. Иногда такие почки развивались в настоящие клубнелуковички-детки, тогда как на контрольных вариантах отмечалось только каллусообразование.

Стадия развития, на которой происходило изолирование эксплантатов, также влияет на каллусообразующую способность органов и тканей шафрана. Увеличение в 20 раз объ-

ма каллусной ткани у почек, изолированных в конце августа, отмечалось через 6 нед культивирования, а у почек, находящихся на более ранней стадии развития (май-июнь) — только через 10–11 нед. Для культивирования тканей листьев, корней и органов цветка наиболее благоприятным материалом были эксплантаты, изолированные в осенние месяцы, в период выхода клубнелуковиц из состояния покоя.

В процессе дифференциации неорганизованно растущих каллусных тканей формируются морфологические структуры — "соматические эмбриониды", из которых впоследствии могут образоваться почки, корни, побеги и целые растения.

Индукцированный соматический эмбриогенез наблюдали при культивировании каллусных тканей (4–5 субкультур) апикальных почек возобновления, базальных частей листьев и кусочков клубнелуковицы на питательной среде МС, содержащей по 0,1 мг/л цитокинина и 1 мг/л ауксина.

В опытах по индуцированному соматическому эмбриогенезу в культуре тканей шафрана отмечено, что в большинстве случаев культивирование изолированных эмбрионидов приводило к формированию либо побегов, либо корней. По мнению S.Narayanaswamy, V.Prabudesai (1979), такие эмбриогенные структуры относятся по своей природе к псевдозародышам. При этом существует разделение по времени действия гормонов на индукцию и последующую дифференцировку органогенных структур. Например, если для индукции корней необходимо определенное соотношение гормонов в среде, их дальнейший рост отмечается только при пассировании каллусной ткани шафрана на среду без регуляторов роста. Формирование зачатков побегов имеет место при концентрации гормонов в среде 5 мг/л НУК и 2 мг/л БАП, а их последующий рост — при снижении концентрации регуляторов роста в среде в 2 раза.

Формирование до 40 эмбрионидов на 1 эксплантате происходит также при культивировании первичного каллуса, образованного в результате дедифференциации клубнелуковицы на питательной среде с 5 мг/л НУК и 0,1 мг/л БАП. Индукция соматического эмбриогенеза наблюдалась только при создании высокого уровня НУК в питательной среде.

Этот факт указывает на важную роль ауксинов в процессе дифференциации клеток каллусной ткани, что приводит к формированию соматических эмбрионидов. Пассирование изолированных эмбрионидов на питательные среды, содержащие по 1 мг/л ауксина и 0,1 мг/л цитокинина, в 30% случаев приводит к одновременному образованию зачатков побегов и корней. Такой процесс характеризуется нестабильностью, его зависимость от условий культивирования выявить трудно. Последующее снижение концентрации макросолей и витаминов в 2 раза, а также исключение регуляторов роста из состава среды вызывают стимуляцию роста побегов и корней, формирование растений-регенерантов.

Проведенные эксперименты по регенерации целых растений в культуре каллусной ткани представляют определенный интерес в отношении создания биологической модели эксплантат — каллусная ткань — растение-регенерант, удобный для исследования закономерностей процессов роста и морфогенеза *in vitro*.

Органогенез в каллусной ткани шафрана можно вызвать, изменяя относительное содержание ауксинов и цитокининов в питательной среде. При этом тип морфогенеза зависит от концентрации регуляторов роста в среде и возраста каллусной ткани. Так, в первичном каллусе образование почек происходит при повышении уровня цитокининов (2 мг/л кинетина) по сравнению с ауксинами (0,5 мг/л 2,4-Д). Для формирования корней требуется относительно высокое содержание ауксинов (2 мг/л 2,4-Д) по сравнению с цитокининами (0,5 мг/л кинетина). У тканей 3-го пассажа образование корней индуцируется при добавлении в среду 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина. При концентрации БАП 1 и 2,4-Д 0,1 мг/л активизируется только рост каллусной ткани.

J.Seabrook с соавт. (1976) в работе по микроразмножению нарцисса отмечают, что основным критерием дифференциации и органогенеза является соотношение ауксинов и цитокининов. Корни могут индуцироваться, когда молярное соотношение цитокинина к ауксину составляет 1:1 или несколько меньше; побеги — при молярном отношении цитокининов к ауксину 10:1 и больше. Как показали И.Москов с соавт. (1980),

исследование физиологически активных веществ на регенерационную способность некоторых луковичных растений не однозначно и зависит от продолжительности культивирования каллусной ткани. Характер действия гормональных факторов в значительной степени зависит и от таксономической принадлежности растений.

Гормональная концепция регуляции дифференциации и морфогенеза *in vitro* не может рассматриваться как универсальная (Дмитриева, 1981). Морфогенетический потенциал культивируемых клеток зависит от генотипа, от предшествующей дифференцировки всех клеточных элементов, составляющих исходный эксплантат. В процессе длительного культивирования формируются популяции клеток с перестройками ядра, которые также ставят "запреты" для вторичной дифференцировки и морфогенеза.

Вместе с тем нельзя и преуменьшать значение фитогормонов в регуляции процессов роста и морфогенеза *in vitro*. В пользу гормональной концепции свидетельствуют данные многочисленных исследователей и результаты нашей работы. Именно путем создания оптимальных концентраций ауксинов и цитокининов в питательной среде удалось добиться индукции каллусообразования, формирования соматических эмбрионидов и регенерация целых растений в культуре изолированных органов и тканей шафрана. Изменяя относительное содержание гормонов в среде, можно направить морфогенез по тому или иному пути. Полученные результаты можно обобщить в виде схемы, иллюстрирующей морфогенетические потенции изолированных органов и тканей шафрана *in vitro* при действии ауксинов и цитокининов.

Серьезного внимания заслуживает исследование влияния эндогенного уровня фитогормонов и ингибиторов роста на регенерационные процессы *in vitro*. D.Fosket (1979), Н.Н.Дмитриева (1981) высказали мнение о необходимости учета гормонального статуса в тканях интактных растений. Действительно, уровень эндогенных фитогормонов и ингибиторов в интактных тканях оказывает существенное влияние на процессы каллусогенеза, эмбриогенеза, органогенеза и регенерации *in vitro*. Так, обнаружена зависимость

между каллусообразующей способностью эксплантатов, изолированных из различных органов унгернии, иксиолириона и уровнем биологической активности эндогенных регуляторов роста. При высоком содержании эндогенных ауксинов и цитокининов в тканях соответственно повышается и каллусообразующая способность эксплантатов. Наиболее активная пролиферация клеток наблюдалась при изолировании эксплантатов в период выхода растений из покоя, когда в интактных тканях содержался высокий уровень фитогормонов. При снижении уровня ауксинов и цитокининов в интактных тканях уменьшается и каллусообразующая способность эксплантатов. При этом четко проявляется индуктивная роль вносимых в питательную среду регуляторов, ускоряющих процесс каллусогенеза. Замедление или даже полное отсутствие пролиферации клеток у эксплантатов, изолированных в период летнего покоя, связано преимущественно с накоплением большого количества эндогенных ингибиторов, тормозящих процессы деления клеток.

Тип морфогенеза в культуре тканей амариллисовых определяется взаимодействием эндогенных и экзогенных регуляторов роста. "Правило" F.Skoog, C.Miller (1957), гласящее, что превышение концентрации ауксина над цитокинином приводит к ризогенезу, а цитокинина над ауксином — к индукции почек, в полной мере "работает", если учитывать гормональный статус в интактных тканях и концентрации, вводимых в питательную среду экзогенных регуляторов роста.

Уровень биологической активности эндогенных регуляторов роста в интактных тканях имеет существенное значение и в процессе инициации адвентивных побегов на эксплантах из различных органов амариллисовых в случае собственной регенерации *in vitro*. Высокий уровень эндогенных ауксинов и цитокининов в тканях при их изолировании в период выхода растений из покоя достаточен для оказания индукции в инициации адвентивных побегов на эксплантах.

В случае снижения уровня биологической активности этих фитогормонов в тканях при их изолировании в весеннее время экзогенные регуляторы роста, добавляемые в питатель-

ную среду МС, выполняют существенную роль в инициации адвентивных побегов на эксплантатах апикальной почки, за-
пасающей чешуи унгернии и клубнелуковицы иксиолириона. Значительное накопление в интактных тканях природных ин-
гибиторов в период летнего покоя растений становится ли-
митирующим фактором, ограничивающим регенерационный
процесс.

Различия в проявлении морфогенетических потенций
эксплантатов из разных органов унгернии и иксиолириона
зависят от эпигенетических характеристик исходных рас-
тительных тканей. Из тканей донца унгернии и иксиолирио-
на, обладающих высокой детерминированностью, интенсивнее
образуются соматические эмбриониды, а на каллусных тканях
базальной части клубнелуковицы иксиолириона и апикальной
почки унгернии – почки.

Гормональный статус в интактной ткани играет значи-
тельную роль в определении дальнейшего морфогенетическо-
го пути *in vitro*. Тип морфогенеза и процессы регенера-
ции зависят от эндогенной гормональной системы в интакт-
ных тканях и содержания экзогенных регуляторов в питатель-
ной среде, используемой для культивирования изолированных
органов и тканей растений.

ЛИТЕРАТУРА

Азизбекова Н.Ш., Милыева Э.Л., Лобова Н.В., Чайла-
хан М.Х. Влияние гиббереллина и кинетина на формирование
цветочных органов шафрана. – Физиология растений, 1978,
т.25, вып. 3, с.603-609.

Артюшенко З.Т. Развитие луковичных и клубнелукович-
ных растений и их место в общей системе жизненных форм. –
В кн.: Общие закономерности роста и развития растений.
Вильнюс, 1965, с.35-41.

Ахвердов А.А. Биология некоторых декоративных геофи-
тов флоры Армении. – Бюл. бот. сада АН АрмССР, 1955,
№ 15, с.5-132.

Борукаева М.Р., Смирнова Н.С. Влияние света на куль-
туру ткани гвоздики и луковичных. – В кн.: Тезисы докла-
дов 6 Всесоюзной конференции по фотоэнергетике растений.
Львов, 1980, с.82.

Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиоло-
гия морфогенеза растений. М., 1964. 272 с.

Бутенко Р.Г. Культура клеток и тканей растений в прак-
тической генетике и селекции. – Докл. ВАСХНИЛ, 1982,
№ 7, с. 5-7.

Бутенко Р.Г. Клеточные технологии – состояние и нерешенные проблемы. – В кн.: Культура клеток растений и биотехнология. Кишинев, 1983, с.5.

Вилцане Л.Ф., Земите М.Э. Влияние сорта на размноже-
ние фрезии *in vitro*. – В кн.: Культура клеток растений и
биотехнология. Кишинев, 1983, с. 128-129.

Ворошилов В.Н. Ритм развития у растений. М., 1960.
136 с.

Выхристова Г.И. Перспективы культуры изолированных зародышей в селекции цветочных растений. - В кн.: Промышленное цветоводство на юге СССР: Луковичные культуры. Сочи, 1979, вып. 25, с.110-115.

Выхристова Г.И. Ускоренное размножение луковичных парными чешуями. - Цветоводство, 1981, № 2, с.16-17.

Выхристова Г.И. Генотипические особенности морфогенетических потенций эксплантатов нарциссов. - В кн.: Культура клеток растений и биотехнология. Кишинев, 1983, с.125-126.

Гавел Л., Новак Ф.И. Использование культуры тканей в селекции лука (*Allium* сера L.). - В кн.: Культура клеток растений и биотехнология. Кишинев, 1983, с.141.

Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений. Киев, 1982, 104 с.

Демкив О.Т. Общие аспекты морфогенеза и его специфика у растений различной сложности. - В кн.: Рост растений и дифференцировка. М., 1981, с.206-225.

Джумашева Д.К., Сыртанова Г.А. Природный ингибитор в луковичах унгернии Северцова. - Вестн. АН КазССР, 1980, № 3, с.69-72.

Джумашева Д.К., Рахимбаев И.Р. Фитогормоны и ингибиторы унгернии Северцова. - В кн.: Тезисы докладов 1 Всесоюзной конференции по регуляторам роста и развития растений. М., 1981, с.106-107.

Джумашева Д.К., Рахимбаев И.Р. Обнаружение эндогенного ингибитора роста амариллисовых. - В кн.: Тезисы докладов 3 конференции биохимиков республик Средней Азии и Казахстана. Душанбе, 1981 а, с.177.

Джумашева Д.К. Сохранение генофонда унгернии Северцова. - В кн.: Тезисы докладов Всесоюзной конференции по теоретическим основам интродукции растений. М., 1983, с. 321.

Джумашева Д.К. Влияние гормонального статуса на процессы морфогенеза амариллисовых в культуре тканей. - В кн.: Научные основы декоративного садоводства. Шевченко, 1983 а, с.120.

Джумашева Д.К., Рахимбаев И.Р. Вегетативное размножение дикорастущих амариллисовых Казахстана. - В кн.: Научные основы декоративного садоводства. Шевченко, 1983, с.118-119.

Джумашева Д.К., Рахимбаев И.Р., Сыртанова Г.А. Гормональная регуляция роста иксиолириона. - Бюл. ГБС, 1983, вып. 127, с.49-52.

Дмитриева Н.Н. Проблема регуляции морфогенеза и дифференциации в культуре клеток и тканей растений. - В кн.: Культура клеток растений. М., 1981, с.113-123.

Дубровицкая Н.И. Регенерация и возрастная изменчивость растений. М., 1961. 232 с.

Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980. 488 с.

Каменецкая И.И. Регенерация растений из изолированных почек луков. - Изв. АН КазССР. Сер.биол., 1982, № 4, с.12-16.

Каменецкая И.И., Рахимбаев И.Р. Органогенез в культуре изолированных тканей луков. - Вестн. АН КазССР, 1982, № 9, с.43-47.

Катаева Н.В. Культура тканей и органов фрезии. - Физиология растений, 1981, т.28, вып. 5, с.1062-1064.

Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение растений в культуре тканей. - В кн.: Культура клеток растений. М., 1981, с.137-149.

Катаева Н.В., Голикова Т.Н. Оптимизация укоренения побегов фрезии в культуре тканей. - В кн.: Культура клеток растений и биотехнология. Кишинев, 1983, с.129-130.

Кефели В.И. Природные ингибиторы роста и фитогормоны. М., 1974. 253 с.

Коровин Е.П. Эфемерная растительность пустынь Средней Азии как производительная сила природы. - В кн.: Освоение пустынь Средней Азии и Казахстана. М.; Ташкент, 1934, с.48-61.

Кренке Н. П. Регенерация растений. М.; Л. 1950. 676 с.

Крылова И.Л. Об эволюции морфологической структуры и ритмов развития эфемероидов. - В кн.: Материалы 5 Московского совещания по физиологии растений. М., 1976, с.83-84.

Кулаева О.Н. Цитокинины, их структура и функция. М., 1973, 264 с.

Кулаева О.Н. Цитокинины. - В кн.: Регуляторы роста растений. М., 1979, с.86-117.

Культура клеток растений / Под ред. Бутенко Р.Г. М., 1981, 168 с.

Лейке Г., Лабес Р., Эртель К., Петерсдорф М. Использование культуры тканей и органов в селекции растений и производстве посадочного материала. М., 1980, 77 с.

Лулева Л.С. Размножение ирисов (Iridaceae) методом культуры апикальных меристем *in vitro*. - Бот. журн., 1977, т.62, № 3, с.416-421.

Мауриня Х.А., Штраусе С.З., Жола И.Я. Размножение гиацинтов *in vitro* на разных этапах периода покоя луковиц. - В кн.: Культура клеток растений и биотехнология. Кишинев, 1983, с.127.

Москов И., Савова И., Бошнякова П. и др. Индукция *in vitro* на органогенеза и каллус при некои луковички растения. Зюмбюл (*Hyacinthus orientalis* L.) кокиче (*Galanthus nivalis* L.) и дале (*Tulipa shrenkii* L.). - Физиология на растенията (София), 1980, т.6, № 1, с.67-75.

Нурмуханбетова Г.А. Вегетативное размножение шафрана алауавского путем деления клубнелуковицы на части. - Изв. АН КазССР, 1982, № 5, с.9-14.

Нурмуханбетова Г.А., Рахимбаев И.Р. Каллусообразующая и регенерационная способность тканей шафрана алауавского. - Изв. АН КазССР, 1982а, № 6, с.20-24.

Нурмуханбетова Г.А. Годовой цикл развития шафрана алауавского. Алма-Ата, 1982 б. 13 с. Рукопись деп. в ВИНТИ 12.11.82, № 5587-82 Деп.

Нурмуханбетова Г.А., Рахимбаев И.Р. Дифференциация клеток в процессе соматического эмбриогенеза в культуре ткани шафрана. - В кн.: Тезисы докладов Всесоюзной конференции по теоретическим основам интродукции растений. Москва, 1983, с.342.

Нурмуханбетова Г.А. Формирование побегов в культуре ткани шафрана алауавского. - Вестн. АН КазССР, 1983, № 7, с. 73-75.

Нурмуханбетова Г.А., Рахимбаев И.Р. Вегетативное микроразмножение шафранов в культуре органов и тканей. - В кн.: Научные основы декоративного садоводства. Шевченко, 1983 а, с.121-122.

Нурмуханбетова Г.А. О проявлении полифункциональности цитокининов в культуре изолированных почек шафрана. - В кн.: Научные основы декоративного садоводства. Шевченко, 1983 а, с. 123.

Нурмуханбетова Г.А., Мухитдинова З.Р., Рахимбаев И.Р. Соматический эмбриогенез и органогенез в культуре ткани шафрана алауавского. - Изв. АН КазССР, 1983, № 4, с.11-15.

Попов М.Г. Основы флорогенетики. М., 1963, 135 с.

Попов Ю.Г., Черкасов О.А. Клональное размножение растений семейства Амариллисовых. - В кн.: Культура клеток растений и биотехнология. Кишинев, 1983, с.125.

Понтович В.Э. Тканевые и гормональные взаимодействия при раннем эмбриогенезе *in vitro*. - В кн.: Тканевые и клеточные культуры в селекции растений, М., 1979, с. 104-114.

Рахимбаев И.Р., Соломина В.Ф. Природные цитокинины растений: распространение и физиологические функции. - В кн.: Фитогормоны - регуляторы роста растений. М., 1980, с.10-23.

Рахимбаев И.Р., Сырганова Г.А., Джумашева Д.К. и др. Клональное микроразмножение и сохранение генофонда редких и исчезающих видов луковичных растений. - В кн.: Культура клеток растений и биотехнология. Кишинев, 1983, с.128.

Серебряков И.Г. Морфология вегетативных органов высших растений. М., 1952, 392 с.

Синнот Э. Морфогенез растений. М., 1963, 603 с.

Скрипчинский В.В. Эволюция онтогенеза растений. М., 1977, 86 с.

Скрипчинский В.В., Скрипчинский Вл.В. Влияние пониженной температуры на рост и развитие весенне-цветущих растений Северного Кавказа и вопрос об их происхождении. - Бот. журн., 1961, т.46, № 7, с.949-958.

Сравнительная каллусообразующая способность эксплан-

готов из различных органов унгернии и иксиолириона / Джумашева Д.К. Алма-Ата, 1982. 11 с. Рукопись деп. в ВИНТИ 12.11.82, № 5586-82 Деп.

Тахтаджян А.Л. Система и филогения цветковых растений. М.; Л., 1966. 611 с.

Токин Б.П. Регенерация и соматический эмбриогенез. Л., 1959. 264 с.

Турецкая Р.Х., Поликарпова Ф.Я. Вегетативное размножение растений с применением регуляторов роста. М., 1968. 94 с.

Уайт Ф.Р. Культура растительных тканей. М., 1949. 150 с.

Федоров А.А., Кирпичников М.Э., Артюшенко З.Т. Атлас по описательной морфологии высших растений. М.; Л., 1962. 352 с.

Фурманова М., Олендзак Г. Клональное размножение *Zephyranthes robusta* в культуре. - В кн.: Культура клеток растений. Абовян, 1979, с.154-155.

Хохряков А.П. Соматическая эволюция однодольных. М., 1975. 196 с.

Штернберг М.Б. Коррелятивное торможение роста растений. - Бот. журн., 1963, т.48, № 2, с.273-286.

Юсуфов А.Г., Бумагина С.И., Агаева Г.Н. Роль специализации структур в реализации потенций в каллусообразовании у растений. - Онтогенез, 1981, т.12, № 5, с. 537-540.

Юсуфов А.Г. Механизмы регенерации растений. Ростов-на-Дону, 1982. 176 с.

Юсуфов А.Г. Специализация структур и тотипотентность клеток у растений. - В кн.: Культура клеток растений и биотехнология. Кишинев, 1983, с.107.

Aartrijk J., Blom-Barnhoorn G. - Acta Hort., 1979, v.91, p.269-280.

Aartrijk J., Blom-Barnhoorn G. - Sci. Hortic., 1981, v.14, N 3, p.261-268.

Bajaj I., Pierik R. - Neth.J.Agr.Sci., 1974, v.22, p.153-159.

Bajaj I. - Sci. Hortic., 1983, v.18, N 18, p.269-275.

Bancilhon L. - C.R.Acad. Sci.Ser.D., 1974, v.279, p.983-986.

Baruch Rh., Quak F. - Neth.J.Plant Pathology, 1966, v.72, p.270-273.

Beauchesne G. - C.R.Acad.Agr., 1980, v.66, N 8, p.638-649.

Bonga J. - In: Appl. and Fundam. Aspects Plant Cell, Tissue and Organ Cult. Berlin, 1977, p.93-108.

Burns W. - Trans. Proc. Bot. Soc. Edinb., 1946, v.34, p.316-347.

Buvat R. - Ann. Sci. Nat. Biol. Veg., 1944, v.5, p.1-130.

Champangnat P. - In: Handbuch der Pflanzenphysiologie, 1965, Bd.15, N 15, v.1, p. 1106-1171.

Codaccioni M. - Rev.Cytol. et biol.veg.Bot., 1982, v.5, N 2, p.199-212.

Davies D., Griffiths P. - Ann.Rep.John Innes Inst., 1971, v.62, p.45.

Davies D., Helsop P. - Ann.Rep.John Innes Inst., 1972, v.63, p.64.

Debergh P., Maene L. - Sci. Hortic., 1981, v.14, N 4, p.335-345.

Doss R., Christian J. - Physiol. Plantarum, 1979, v.45, N 2, p.215-218.

Dunstan D., Short K. - Physiol. Plant., 1977, v.41, N 1, p.70-72.

Engelbrecht L., Mothes K. - Berl. Dtsch. bot. Ges., 1960, v.73, p.246-254.

Fosket D. - In: Plant Growth Substances, Berlin, 1979, p.362-369.

Fridborg G. - Physiol.plant., 1971, v.25, p.436-440.

Gautheret R. La culture des tissues vegetaux: Techniques et realisations. Paris, 1959.836 p.

Ginzburg C., Ziv M. - Ann.Bot., 1973, v.37, p.219-224.

- Goring H., Radke G. - *Biol.Rdsch.*, 1980, v.18, N 4, p.233-234.
- Haberlandt G. - *Sitzungsber. Acad.Wiss., Wien Math.Naturwiss.*, 1902, v.111, p.69-92.
- Hicks G. - *Bot.rev.*, 1980, v.46, N1, p.1-23.
- Holden D. - *Flower Garden*, 1978, v.22, N 12, p.28-30.
- Holdgate D. - In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Berlin, 1977, p.18-43.
- Hollings M. - *Grower*, 1974, v.81, p.722-724.
- Homes J. - *Bull. Soc. Bot. France Actual. bot.*, 1980, v.127, N 3-4, p.79-85.
- Hosoki T., Asahira T. - *Hort Science*, 1980, v.15, N 11, p.602-603.
- Hunault G. - *Rev. cytol.et biol.veg.Bot.*, 1979, v.2, N 3, p.259-287.
- Hussey G. - *J.Exp.Bot.*, 1975, v.26, p.253-262.
- Hussey G. - *Ann.Bot.*, 1976a, v.40, p.1323.
- Hussey G. - *Sci.Hortic.*, 1976b, v.4, p.163-165.
- Hussey G. - *Sci.Hortic.*, 1977, v.6, N 4, p.287-296.
- Hussey G. - *Sci.Hortic.*, 1978, v.9, N 3, p.227-236.
- Hussey G. - *Ann.Bot.*, 1982, v.49, N 5, p.707-719.
- Hussey G., Wyvill C. - *Ann. Rep. John Innes Inst.*, 1972, v.63, p.64-66.
- Jana B. - *Indian Hortic.*, 1981, v.25, N 4, p. 11-13.
- Kim Y. - *Hortscience*, 1981, v.16, N 5, p. 645-647.
- Kubitz K. - *Arch. Gartenbau*, 1979, v.27, N 2, p.61-71.
- Kunimitsu F. e.a. - *J.Fac.Agr.Kyushu Univ.*, 1977, v.22, N 1-2, p.89-98.
- Lachary W. - *Biol.Conserv.*, 1981, v.20, N 2, p.83-89.

- Laroche M., Verhoyen M. - *Meded. Fac.land-bouwweteuch. Rijksuniv.Gent.*, 1980, v.45, N 12, p.323-333.
- Lee S. e.a. - *Hort. Sci.*, 1977, v.12, N 3, p. 264.
- Le Nard M., Cohat J. - *Ann.Amelior. Plant.*, 1968, v.18, N 2, p.181-215.
- Le Nard M. - *Ann.Amelior. Plant.*, 1972, v.22, N 1, p.39-52.
- Lindsay H., Northcote D. - *J.Exp. Bot.*, 1976, v.27, N 100, p.1031-1049.
- Marrou M. - *C.R.Acad. agr. France*, 1980, v.66, N 8, p.650-656.
- Mill M. e.a. - *J.Hort. Sci.*, 1974, v.49, p.241-244.
- Minier R. - *C.R.Acad.agr.France*, 1980, v.66, N 8, p.670-678.
- Morel G., Martin C. - *Rept. 14th Inst. Hortic. Congr. Netherlands*, 1955. 310 p.
- Murashige T., Skoog F. - *Physiol. Plant.*, 1962, v.15, N 3, p.473-497.
- Murashige T. - *Hort. Sci.*, 1977, v.12, N 2, p.127-130.
- Murashige T. - In: *Plant Growth Substances*. Berlin, 1980, p.426-434.
- Narayanaswamy S., Prabudesai V.R. - *Indian J.Exp.Biol.*, 1979, v.17, N 9, p.873-875.
- Nel D. - *Agroplantae*, 1981, v.13, N 3, p.83-84.
- Nishiuchi Y., Myodo H. - *J.Japan Soc.Hort. Sci.*, 1976, v.45, N 1, p.59-64.
- Novak F., Petru E. - *Sci. Hortic.*, 1981, v.14, N 2, p.191-199.
- Oertel C. - *Arch. Phytopatology Pflanzenschutz*, 1980, v.16, N 3, p.159-164.
- Oudin Y. - *C.R.Acad.agr. France*, 1980, v.66, N 8, p.709-716.
- Paek J., Kee Y. - *Plant Tissue Cult.*, 1982, p.713-714.

- Pierik R., Post A. - *Sci. Hortic.*, 1975, v.3, N 3, p.293-297.
- Pierik R., Ruibing M. - *Neth. J. Agr.Sci.*, 1973, v.21, p. 129-138.
- Pierik R., Steegmans H. - *Neth.J.agric. Sci.*, 1975, v.23, N 4, p.334-337.
- Pierik R., Steegmans H. - *Neth.J.agric. Sci.*, 1976, v.24, N 4, p.274-277.
- Pierik R., Woets J. - *Acta Hortic.*, 1971, v.23, p. 423-428.
- Reinert J. - *Berichte Deutsch. Bot.Gesell.*, 1965, v. 78, p.3-18.
- Riviere S., Muller J. - *Can.J.Bot.*, 1979, v.57, p.1986-1993.
- Robb S. - *J.Exp. Bot.*, 1957, v.8, p.348-352.
- Roberts L. - *Bot. Rev.*, 1969, v.35, N 3, p.201-250.
- Rudnicki R. - *Acta Hortic.*, 1979, v.91, p. 185-194.
- Sachs T., Thimann K. - *Amer.J.Bot.*, 1967, v.54, N 1, p. 136-144.
- Saniewski M. e.a. - *Plant Sci.Letters*, 1974, N 2, p.373-376.
- Schaeffer G. - *In vitro*, 1977, v. 13, N 3, p.194-195.
- Schmid J., Keller E. - *Rev.suisse agr.*, 1981, v.13, N 6, p.256-272.
- Seabrook J. e.a. - *Can.J.Bot.*, 1976, v.54, N 9, p.814-819.
- Seabrook J., Cumming B. - *Sci.Hortic.*, 1982, v.16, N 2, p.185-190.
- Simmonds J., Cumming B. - *Sci.Hortic.*, 1976, v.5, N 2, p. 161-170.
- Simonsen G., Hildebrandt A. - *Can.J.Bot.*, 1971, v.49, p.1817-1819.
- Skoog F., Miller C. - *In: Symp.Soc.Exp. Biol.*, 1957, v.11, p. 118-131.
- Steinitz B., Yahel H. - *Hort.Sci.*, 1982, v.17, N 3, p.333-334.

- Steward F. e.a. - *Amer.J.Bot.*, 1958, v.45, N 9, p.693-703.
- Stimart D., Ascher P. - *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 1978, v.103, N 2, p.182-184.
- Stimart D. e.a. - *Hort.Sci.*, 1980, v.15, N 3 (1), p.313-315.
- Stimart D. e.a. - *J.Amer.Soc.Hort.Sci.*, 1982, v.107, N 6, p.1004-1107.
- Takatori F. e.a., - *Hort.Sci.*, 1967, v.3, p.20-22.
- Takayama S., Misawa M. - *Physiol. plant.*, 1980, v.48, N 1, p. 121-124.
- Takayama S., Misawa M. - *Plant and Cell Physiol.*, 1982, v.23, N 1, p.67-74.
- Takayama S., Misawa M. - *Sci.Hortic.*, 1983a, v.18, p.353-362.
- Takayama S., Misawa M. - *Can.J.Bot.*, 1983b, v.61, N 1, p.224-228.
- Tamura S. - *J.Japan Soc.Hort.Sci.*, 1978, v.46, p.501-508.
- Thank V.K. - *Ann.Rev.Plant. Physiol.* 1981, v.32, p.291-311.
- Thorpe T., Biondi S. - *Adv.Cell.Cult.*, New-York, 1981, v.1, p.213-239.
- Tizio R. - *C.R.Acad.Sci.*, 1979, D.189, N 4, p.401-404.
- Tompsett A. - *In: Roy. Hortic.Soc. London*, 1973. 31 p.
- Torrey I. - *Adv.Morphogen.*, 1965, v. 5, p.39-91.
- Walker K. e.a. - *Plant Sci. Letters*, 1979, v.16, N 1, p.23-30.
- Wolfgang B., Brian E. - *Berl. Deutsch. bot. Ges.*, 1981, v.94, N 1-2, p.1-26.
- Yanagawa T., Sakanishi Y. - *J.Japan Soc. Hort. Sci.*, 1977, v.46, N 2, p.250-260.
- Zbell B. - *Bull.Soc.bot. France. Actual. bot.*, 1980, v.127, N 3-4, p.87-91.

Zimmer K. - Dt.Gartenbau, 1980, v.34, N 10,
p.462-463.

Ziv M. e.a. - Ann. Bot., 1970, v.34, p.671-
676.

ПРИЛОЖЕНИЕ

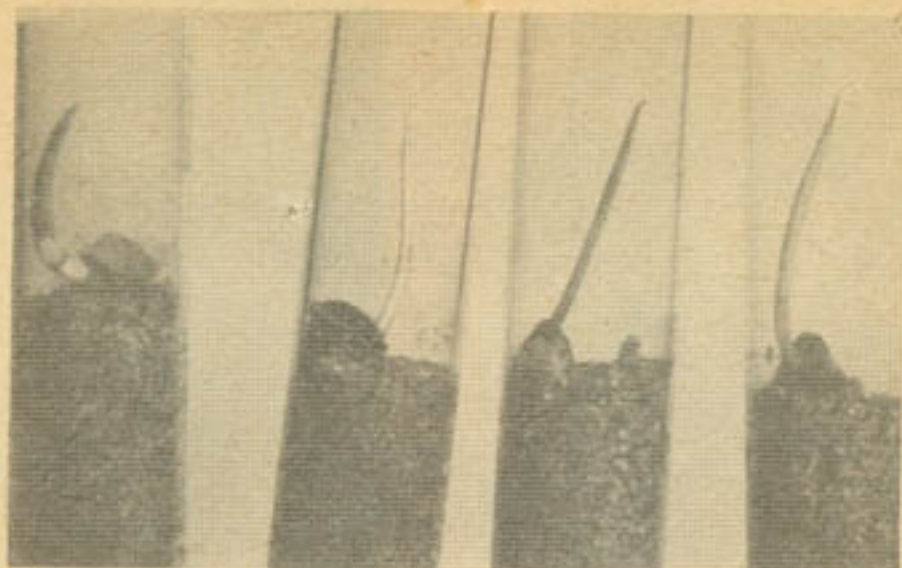


Рис. 9. Рост боковых почек возобновления шафрана алатавского на песчаном субстрате со средой Гельригеля при удалении апикальной почки: 1, 2-1, 4 части клубнелуковицы (а, б); 3, 4-1/8 части клубнелуковицы (в, г)



Рис. 10. Побегообразование и формирование миниатюрных луковичек в культуре каллусной ткани шафрана на среде Мурасиге-Скуга (0,1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП)



Рис. 11. Подавление апикального доминирования и рост почек возобновления с формированием замещающих клубнелуковичек на среде Мурасиге-Скуга (5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП)



Рис. 12. Зависимость морфогенетического эффекта цитокининов от специализации и полярности тканей исходного эксплантата при культивировании пазушных почек (10 мг/л)

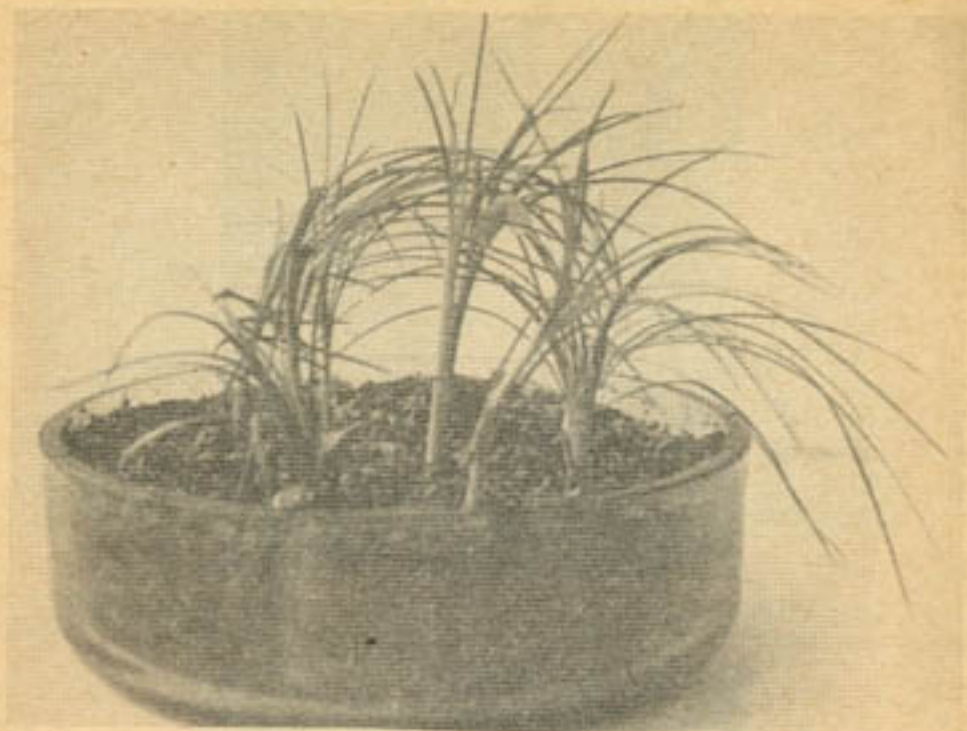


Рис. 13. Выращивание растений-регенерантов в кювете со смесью вермикулита и торфа



Рис. 14. Формирование клубнелуковицы иксиолириона регистуционным путем



Рис. 15. Луковица унгерии, образованная из адвентивного побега

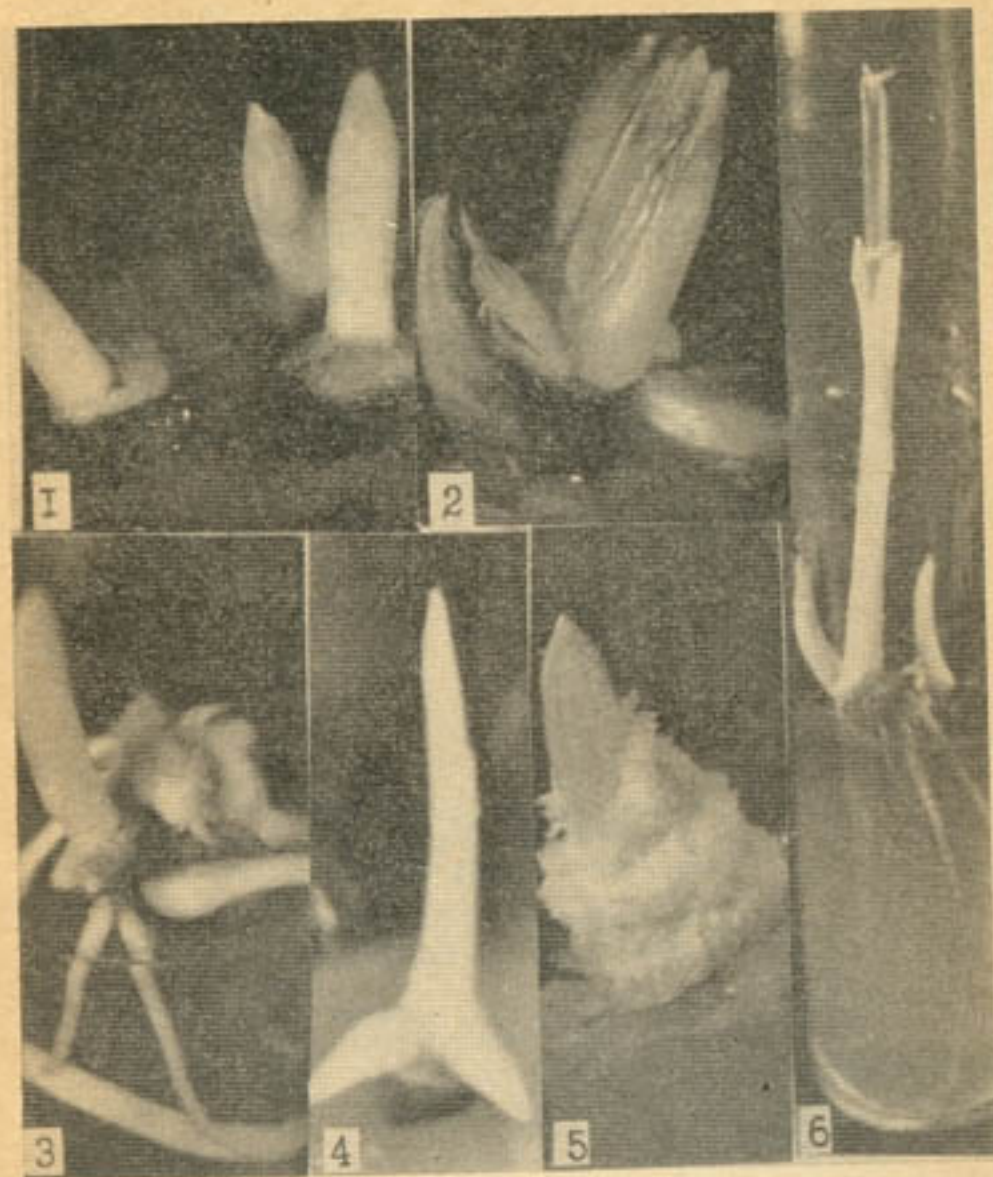


Рис. 22. Множественный эффект цитокининов в культуре изолированных почек шафрана: 1 — рост почек возобновления (0,1—10 мг/л кинетина); 2 — формирование адвентивных побегов (10—20); 3 — рост почки возобновления и ризогенез (0,1—5); 4 — рост почки возобновления и формирование контрактильных корней (10—20); 5 — образование каллуса у основания почки (1 мг/л кинетина и 1—10 мг/л НУК); 6 — формирование растения-регенеранта (1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л НУК)

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ЛУКОВИЧНЫХ РАСТЕНИЙ	5
Проблема гормональной регуляции регенерации луковичных растений <i>in vitro</i>	9
Глава 2. КАЛЛУСООБРАЗУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТАТОВ	32
Соматический эмбриогенез и органогенез в культуре изолированных тканей	38
Регенерация растений в культуре изолированных органов	47
Глава 3. ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА И МОРФОГЕНЕЗ	60
Приемы вегетативного микроразмножения луковичных растений	74
Заключение	84
Литература	93

Избасар Рахимбаевич Рахимбаев
Джанат Куштаевна Джумашева
Галия Ашимхалиевна Нурмуханбетова

ВЕГЕТАТИВНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЛУКОВИЧНЫХ РАСТЕНИЙ

*Утверждено к печати Ученым советом Главного ботанического сада
Академии наук Казахской ССР*

Зав. редакцией *Н. Л. Селиванова*
Редактор *А. А. Ветлиф*
Оформление художника *Е. С. Гилева*
Корректор *С. И. Осколкова*

ИБ № 2051

Подписано в печать 4.10.84. УГ16280. Формат 60×84^{1/16}. Бум. тип. № 2.
Офсетная печать. Усл. п. л. 6,5. Усл. п. кр.-отт. 6,5. Уч.-изд. л. 6. Тираж 500.
Заказ 221. Цена 95 коп.

Издательство «Наука» Казахской ССР.
480100, г. Алма-Ата, Пушкина, 111/113.
Типография издательства «Наука» Казахской ССР.
480021, г. Алма-Ата, Шевченко, 28.