

**МОРФОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ОРГАНОВ ЦВЕТКА  
*FRITILLARIA MELEAGRIS* F. *ALBA* (LILIACEAE) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

**Д.С. Мурасева, Т.В. Железниченко, Т.И. Новикова**

Центральный сибирский ботанический сад СО РАН,  
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101, e-mail: dsmuraseva@csbg.nsc.ru

Впервые изучен морфогенный потенциал трех типов флоральных эксплантов *Fritillaria meleagris* – листочков околоцветника, тычинок, пестиков – с целью выявления наиболее компетентных органов для индукции культуры *in vitro*. Установлено, что регуляторы роста и их концентрации – наиболее значимые факторы, влияющие на процессы регенерации в тканях эксплантов. Оптимальной питательной средой для индукции морфогенеза в тканях изучаемых эксплантов являлась среда В<sub>5</sub>, дополненная 0.4 мкМ БАП, 3.2 мкМ НУК и 2.3 мкМ ИУК. Десятикратное увеличение содержания БАП в этой среде угнетало побегообразование. С помощью стереомикроскопии выявлено, что процессы морфогенеза локализованы в проксимальных частях листочков околоцветника и тычиночных нитей. В то время как в культуре пестиков регенерация протекает по всей поверхности завязей. Сравнительная оценка морфогенного потенциала позволила установить, что листочки околоцветников обладают более высокой регенерационной способностью среди исследуемых типов первичных эксплантов.

**Ключевые слова:** *Fritillaria meleagris* f. *alba*, культура ткани, морфогенез, регуляторы роста растений, первичный эксплант, регенерация, листочек околоцветника, тычинка, пестик.

**IN VITRO MORPHOGENIC POTENTIAL  
OF *FRITILLARIA MELEAGRIS* F. *ALBA* (LILIACEAE) FLORAL ORGANS**

**D.S. Muraseva, T.V. Zheleznichenko, T.I. Novikova**

Central Siberian Botanical Garden, SB RAS,  
630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya str., 101, e-mail: dsmuraseva@csbg.nsc.ru

For the first time, the morphogenic potential of three types of *Fritillaria meleagris* floral explants – tepals, stamens, pistils – was studied to identify the most competent organs for *in vitro* culture initiation. It has been established, that plant growth regulators and their concentrations were the most significant factors inducing the regeneration process in the explant tissues. В<sub>5</sub> nutrient medium supplemented with BA 0.4 μM, NAA 3.2 μM and IAA 2.3 μM was the most efficient for morphogenesis induction. A tenfold increase of BA content in this media inhibited shoot formation. Using a stereomicroscopy, it was observed that the morphogenesis processes localizes in the proximal parts of the tepals and filaments. Whereas in pistil culture regeneration process occurred across the ovary surface. A comparative assessment of the morphogenic potential revealed that tepals possessed the highest regenerative capacity among the studied types of primary explants.

**Key words:** *Fritillaria meleagris* f. *alba*, tissue culture, morphogenesis, plant growth regulators, primary explants, regeneration, tepals, stamen, pistil.

**ВВЕДЕНИЕ**

*Fritillaria meleagris* L. (рябчик шахматный) – вид, имеющий протяженный ареал и произрастающий в степях и лесах Европы, Средиземноморья, Средней Азии. На территории азиатской части России (Республика Алтай) проходит восточная граница его ареала. Декоративные свойства рябчика шахматного определили его распространение как садовой культуры с XVI в. (Баранова, 1999). Однако природные популяции этого вида находятся в уязвимом состоянии из-за хозяйственной деятельности человека, и рябчик шахматный занесен в Красную книгу Российской Федерации (Вар-

лыгина, 2008) в статусе 3в (редкий вид с дизъюнктивным ареалом), а также в ряд региональных Красных книг. Эти причины, а также низкая способность к воспроизведению традиционными методами определяют необходимость разработки эффективных технологий для размножения рябчика шахматного.

Использование методов культуры изолированных тканей и органов растений *in vitro* является универсальным подходом к сохранению и воспроизводству ценных генотипов. Считается, что тип первичного экспланта – один из ключевых

факторов, определяющих успех инициации культуры *in vitro* и последующую регенерацию. Как отмечает в своем обзоре Д.М. Бонга, изолирование эксплантов снимает ингибирующее действие окружающих тканей и приводит к реализации плюриили тотипотентности клеток (Bonga, 2017). При этом не только разрушаются симпластические связи, которые могут негативно влиять на регенерацию, но и сам процесс изоляция эксплантов оказывает стрессовое воздействие, стимулирующее морфогенез *in vitro*. На морфогенный потенциал экспланта, кроме того, влияют генотип растения, его возраст, транспорт эндогенных регуляторов роста, подготовка и способ размещения экспланта на питательной среде (Bhojwani, Dantu, 2013). Экспланты, содержащие меристемы (апексы побега или корня, пазушные почки), отличаются высоким морфогенным потенциалом и скоростью клеточных делений: для их развития достаточно наличие триггеров, которыми чаще всего выступают регуляторы роста растений (Akin-Idowu et al., 2009; Varshney, Anis, 2014). При работе с эксплантами, не имеющими меристем, сначала необходимо индуцировать дедифференциацию специализированных клеток и только после этого начинаются редифференциация и последующий морфогенез (Lombardi et al., 2007; Husain et al., 2010). Ключевым в этом процессе является приобретение клетками компетенции, т. е. способности реагировать на внеклеточные сигналы, источником которых служат регуляторы роста растений (Christianson, Warnick, 1983).

Флоральные органы рассматриваются как перспективный тип первичных эксплантов, особенно для сохранения и размножения редких и исчезающих видов, поскольку при их использовании удается избежать высокого уровня контаминации и сохранить материнские растения (Don Palmer,

Keller, 2011; Koo, 2014; Зайцева, Новикова, 2017). При этом во многих работах выявлено, что органы цветка обладают различным морфогенным потенциалом. Так, при сравнении морфогенного потенциала флоральных эксплантов пяти видов рода *Sedum* L. установлено, что наибольший потенциал характерен для лепестков, в культуре тычинок и пестиков этот показатель почти в два раза ниже (Wojciechowicz, 2007). При этом определяющее действие на частоту регенерации и число формирующихся адвентивных побегов оказывал тип экспланта, тогда как генотип растения и регуляторы роста влияли только на число формирующихся побегов. Сравнение флоральных эксплантов (лепестки, тычиночные нити, стаминодии, завязи, основание цветочной почки) *Theobroma cacao* L. показало, что только тычиночные нити и стаминодии обладали морфогенным потенциалом (Almanpo et al., 1996). Работа с цветочными бутонами *Hypericum perforatum* L. определила влияние стадии развития цветка на морфогенную активность экспланта (Don Palmer, Keller, 2011). Наибольший потенциал (100 %) характерен для лепестков нераскрытых цветочных почек, частично выступающих из-под чашелистиков, тогда как в культуре лепестков полностью раскрытых цветков морфогенный потенциал снижался (61–66 %). Несмотря на преимущества использования данного типа эксплантов у геофитов, исследования по анализу морфогенеза в культуре органов цветка рябчиков единичны и посвящены только культуре листочков околоцветника *F. imperialis* L. (Mohammadi-Dehcheshmeh et al., 2007, 2008).

Цель исследования – оценить морфогенный потенциал различных типов флоральных эксплантов *Fritillaria meleagris* f. *alba* для выявления наиболее компетентных органов на этапе индукции культуры *in vitro*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для оценки морфогенного потенциала различных типов первичных эксплантов использовали органы цветка (листочки околоцветника, тычинки, пестики), изолированные из нераскрытых цветочных бутонов у *F. meleagris* f. *alba*, произрастающих на интродукционном участке ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск) (рис. 1).

Для поверхностной стерилизации цветочных бутонов использовали 20%-й водный раствор “Domestos” (20 мин) с последующей трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой. В асептических условиях изолировали листочки околоцветника, тычинки, пестики и помещали в культуральные сосуды: в каждый отдельный сосуд по 3 листочка околоцветника (абаксиальной стороной на среду), 3 тычинки (горизонтально), 1 пестик (вертикально). Всего использовано 40 цветочных бутонов.

Для индукции морфогенеза применяли агаризованные питательные среды с минеральной основой по прописи В<sub>5</sub> (Gamborg, Eveleigh, 1968), дополненные регуляторами роста растений цитокининовой и ауксиновой природы: 6-бензиламинопурином (БАП), индолил-3-уксусной кислотой (ИУК), 1-нафтилуксусной кислотой (НУК) в концентрациях от 0.1 до 3.2 мкМ (табл. 1). Контролем выступали безгормональные среды. Культивирование флоральных органов проводили в условиях светокультуральной комнаты при 23 ± 2 °С, 16-часовом фотопериоде (интенсивность освещения 4.0–4.2 клк). Длительность пассажа в зависимости от типа экспланта составляла 35–50 сут.

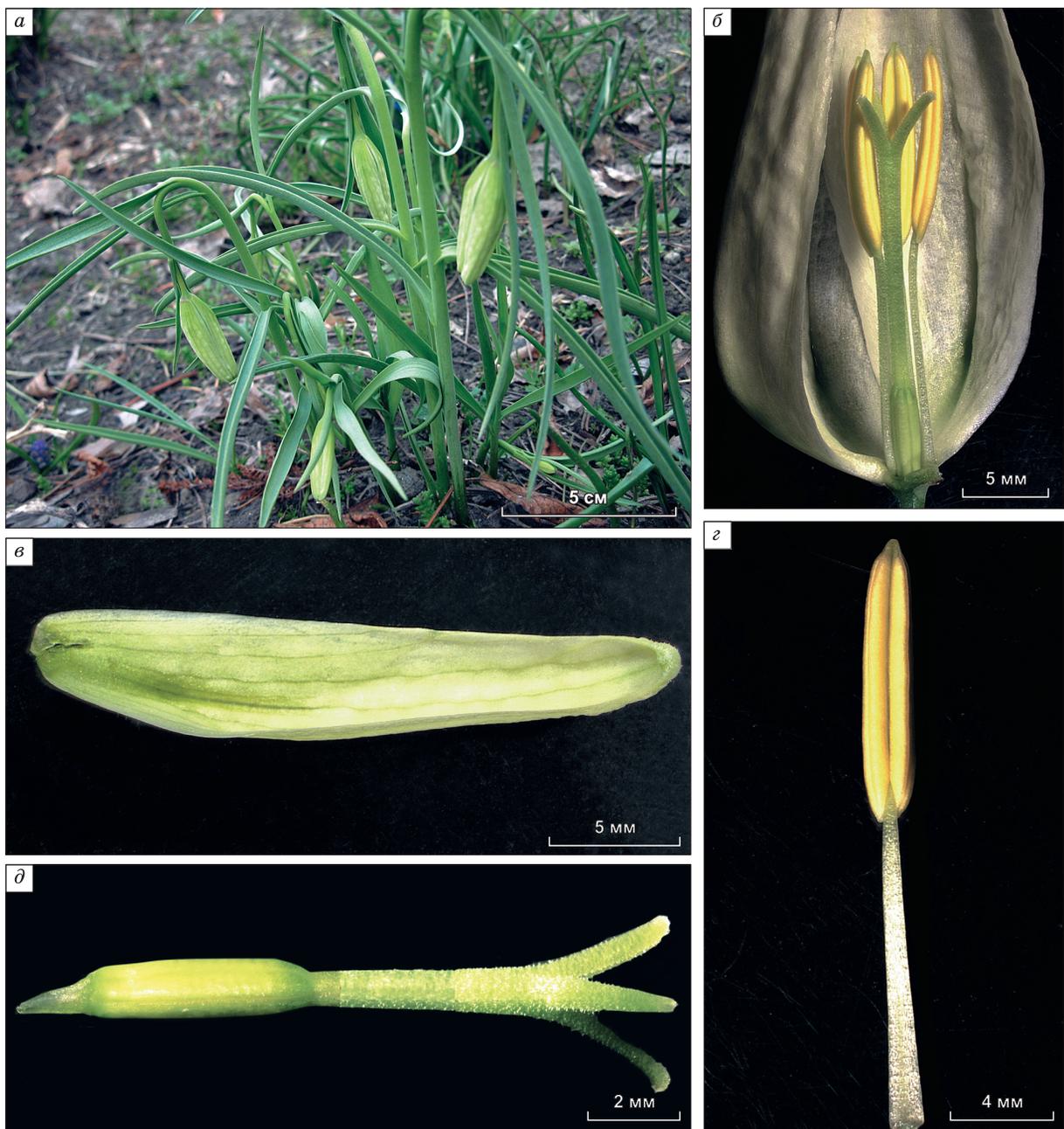


Рис. 1. Интактные растения *Fritillaria meleagris* f. *alba* (а), бутон с частично удаленным околоцветником (б), листочек околоцветника (в), тычинка (е), пестик (д).

Анализ динамики развития структур *de novo* осуществляли при помощи стереомикроскопа SteREO Discovery.V12 с камерой высокого разре-

шения AxioCam HRC и с программой AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Германия).

В ходе экспериментов в конце первого пассажа оценивали частоту регенерации (%) как число эксплантов, у которых сформировались структуры *de novo*, к общему числу эксплантов; число сформированных побегов на одном экспланте (шт./экспл.). Морфогенный потенциал рассчитывали по формуле

$$\text{Морфогенный потенциал} = \text{частота регенерации} \times \text{число сформированных побегов.}$$

Все эксперименты проводили минимум в трех повторностях. Результаты представлены в виде

Таблица 1

Варианты питательных сред, используемых на этапе индукции культуры *in vitro* *Fritillaria meleagris* f. *alba*, среда В<sub>5</sub>

Регулятор роста	Концентрация, мкМ				
	1	2	3	4	5
БАП	–	0.1	0.4	0.4	4.4
ИУК	–	–	–	2.3	2.3
НУК	–	–	–	3.2	3.2

средних значений и доверительных интервалов. Для выявления статистически значимых различий использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Тьюки (HSD). Двухфакторный дисперсионный анализ применяли для оценки влияния на активность

морфогенеза состава питательной среды и типа экспланта (флоральные органы). В работе обсуждаются различия, достоверные при 95%-м уровне значимости. Анализ данных проводили с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2007 и STATISTICA 10 (StatSoft. Inc.)

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для всех типов флоральных эксплантов выявлены общие закономерности развития в ответ на действие регуляторов роста. Согласно проведенному двухфакторному дисперсионному анализу, на число формирующихся адвентивных побегов в культуре флоральных органов оказывают влияние как тип экспланта и регуляторы роста, так и сочетание этих факторов (табл. 2). Наиболее значимым фактором являются регуляторы роста и их концентрации. Так, на контрольной среде регенерации побегов не наблюдали, некроз был характерен для всех типов эксплантов. При этом использование БАП без ауксинов в концентрациях 0.1 и 0.4 мкМ не стимулировало побегообразование – экспланты на данных средах погибали через 13–20 сут.

Внесение в среду, содержащую 0.4 мкМ БАП, дополнительно 3.2 мкМ НУК и 2.3 мкМ ИУК, стимулировало морфогенез в культуре *листочков околоцветника*: на данной среде регенерация достигала 56 %, и формировалось  $4.4 \pm 0.5$  побегов на эксплант. При этом на питательной среде с такой же концентрацией ауксинов, но увеличенной в 10 раз концентрацией цитокинина БАП (4.4 мкМ) регенерационный ответ был значительно ниже (16 %). Следовательно, можно предположить, что преобладание концентрации цитокининов над ауксинами угнетает побегообразование. Результаты проведенного исследования показывают, что для индукции морфогенеза из тканей листочков околоцветника необходимо присутствие как цитокининов (БАП), так и ауксинов (НУК и ИУК). Отмечен синергизм взаимодействия изучаемых концентраций регуляторов роста, приводящий к регенерации побегов *de novo* на поверхности эксплантов. При этом морфогенную активность отмечали исключительно в проксимальной части листочка, остальная часть экспланта отмирала. Формирования каллусной ткани в культуре листочков околоцветника не наблюдали. Первые изменения – разрастание ткани в проксимальной части листочка – зафиксировали через 5–8 сут после инокуляции на питательные среды, в течение последующих 15–17 сут развивались выпячивания, дающие начало почкам (рис. 2, а, б). Через 35–46 сут с начала культивирования отмечали образование адвентивных побегов, у которых в дальнейшем формировались 1–2 чешуйки с листьями. Выявлена асинхронность процессов регенерации:

одновременно наблюдали как формирование почек, так и развитие побегов высотой 4–6 мм.

Культура *тычинок и пестиков* отличалась меньшей морфогенной активностью по сравнению с культурой листочков околоцветника. Достоверно снижались частота регенерации и число формирующихся побегов (рис. 3). Оптимальной питательной средой, так же как и в опытах с листочками околоцветника, оказалась В<sub>5</sub>, дополненная 0.4 мкМ БАП, 3.2 мкМ НУК и 2.3 мкМ ИУК. При этом отмечено, что число образующихся побегов в культуре тычинок ( $2.5 \pm 0.3$  шт./экспл.) и пестиков ( $2.2 \pm 0.4$  шт./экспл.) было почти в два раза ниже, чем при использовании листочков околоцветника в качестве первичных эксплантов. Повышение содержания БАП в среде до 4.4 мкМ при сохранении концентрации ауксинов значительно угнетало процессы регенерации у всех типов эксплантов. В культуре тычинок процессы регенерации отмечали только в базальной части тычиночной нити. Разрастание ткани в зоне поранения происходило на 21–23 сут культивирования. Побегообразование протекало синхронно и через 35–42 сут после введения в культуру *in vitro* наблюдали оформленные побеги (см. рис. 2, в, г). Морфогенез в культуре пестиков происходил только в тканях завязи, столбик и рыльце отмирали. При сравнении с другими типами эксплантов формирование побегов в культуре пестиков протекало медленнее, и появление первых выпячиваний отмечали лишь через 36–45 сут после инокуляции на питательные среды (см. рис. 2, д, е).

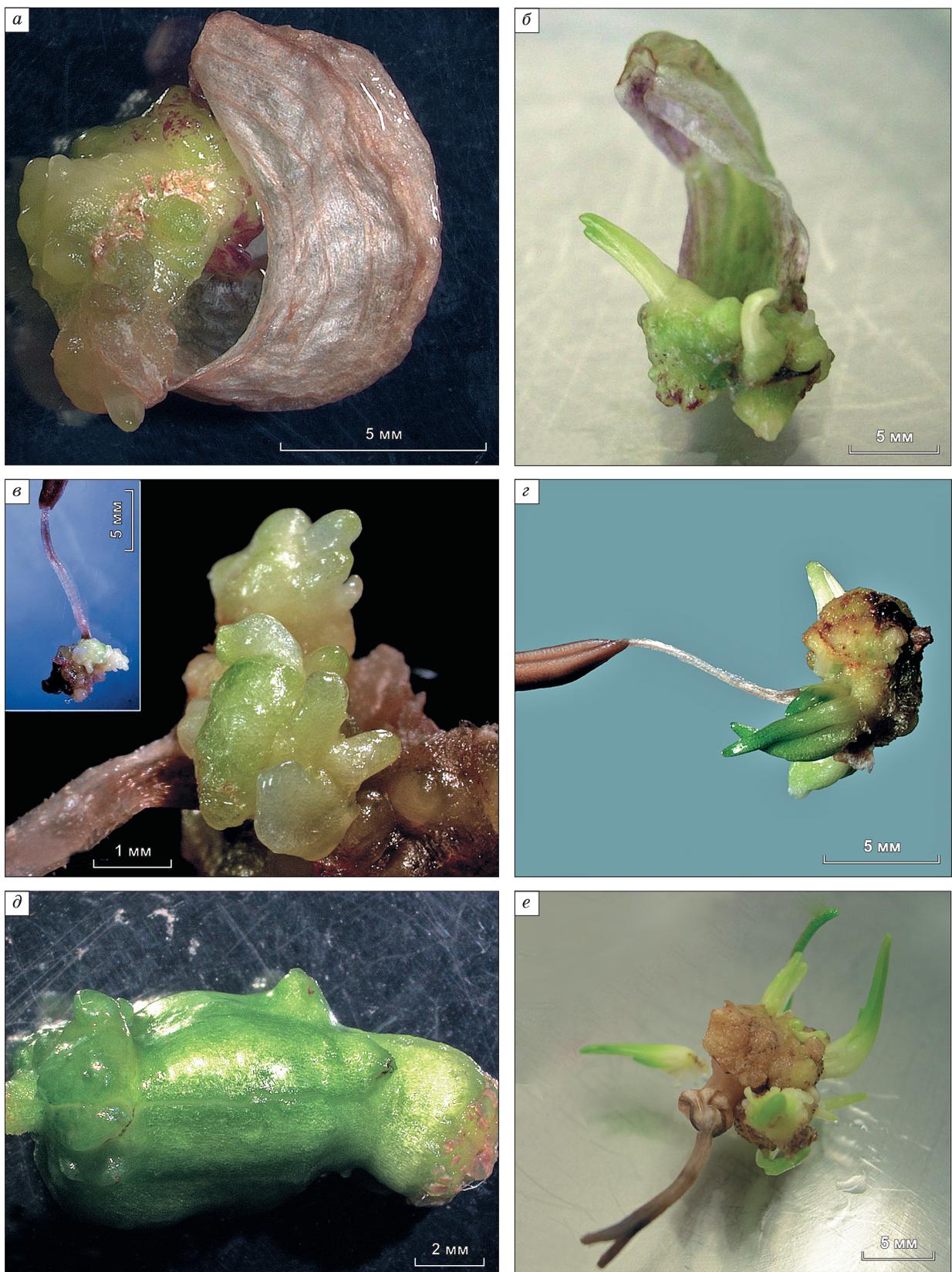
Итак, с помощью стереомикроскопии впервые выявлена локализация процессов регенерации в проксимальной части листочков околоцветника и тычинок рябчика шахматного. Высокий морфогенный потенциал проксимальных (базальных) частей эксплантов также наблюдался и в работах с

Таблица 2

### Влияние факторов культивирования на регенерацию адвентивных побегов *Fritillaria meleagris f. alba* из флоральных эксплантов

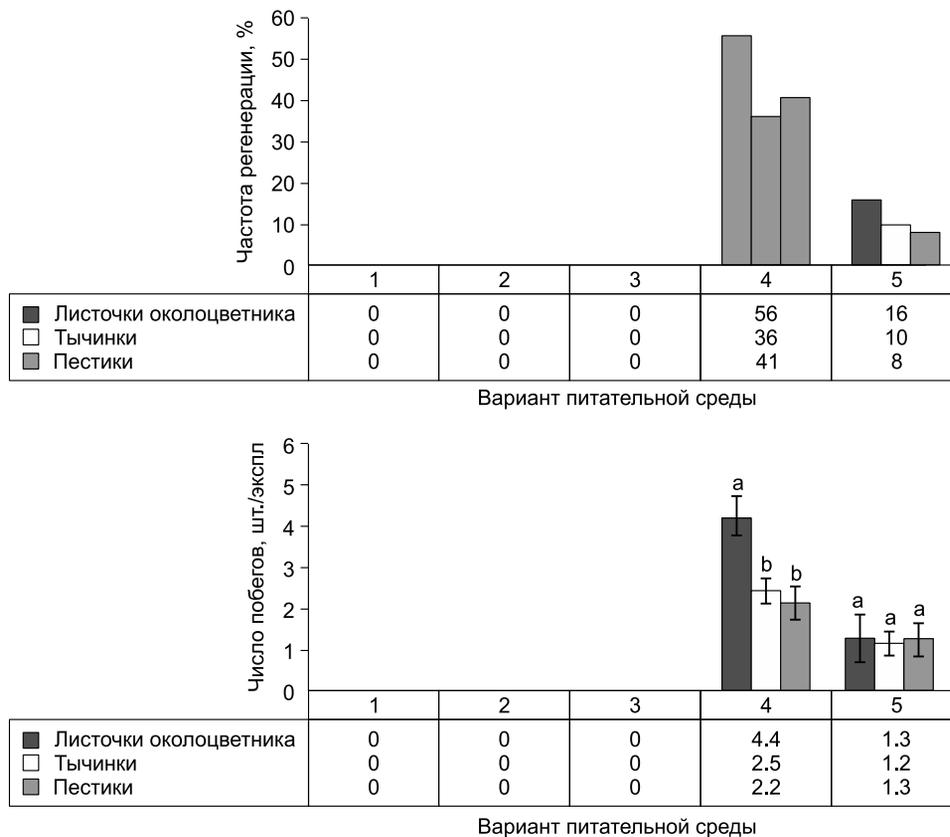
Фактор	F	P
Эксплант	4.3409	0.015674
Регуляторы роста	19.0851	0.000032
Эксплант × Регуляторы роста	3.5403	0.032849

Примечание.  $P \leq 0.05$ .



**Рис. 2.** Морфогенез в тканях первичных эксплантов *Fritillaria meleagris* f. *alba*, среда В<sub>5</sub> + 0.4 мкМ БАП + 3.2 мкМ НУК + 2.3 мкМ ИУК:

*a* – разрастание базальной части листочка, формирование выпячиваний, 25 сут; *б* – развитие адвентивных побегов в культуре листочка околоцветника, 34 сут; *в* – формирование почек в проксимальной части тычиночной нити, 33 сут; *г* – побеги, сформированные на разросшейся части основания тычиночной нити, 43 сут; *д* – закладка почек на стенке завязи, 38 сут; *е* – конгломерат побегов в культуре пестиков, 64 сут.



**Рис. 3.** Влияние регуляторов роста на регенерацию адвентивных побегов *Fritillaria meleagris* f. *alba* из флоральных эксплантов, среда В<sub>5</sub>:

1 – контроль; 2 – БАП 0.1 мкМ; 3 – БАП 0.4 мкМ; 4 – БАП 0.4 мкМ + НУК 3.2 мкМ + ИУК 2.3 мкМ; 5 – БАП 4.4 мкМ + НУК 3.2 мкМ + ИУК 2.3 мкМ.

Значения, за которыми следуют разные буквы в колонках (1–5), статистически значимо различаются ( $P \leq 0.05$ ) в соответствии с тестом Тьюки (HSD).

лепестками *Dianthus caryophyllus* L. (Nugent et al., 1991), флоральными эксплантами пяти видов рода *Sedum* (Wojciechowicz, 2007). Морфогенез в проксимальной части экспланта можно объяснить активностью интеркалярных меристем эксплантов, полученных из нераскрытых цветочных почек. Молодые паренхимные клетки эксплантов характеризуются высокой чувствительностью к действию регуляторов роста и легче подвергаются дедифференциации и последующей регенерации.

Кроме того, установлено, что для индукции морфогенеза *in vitro* из тканей флоральных органов *F. meleagris* f. *alba* необходимо использование комбинации цитокининов и ауксинов, оказывающих стимулирующий эффект на процессы побегообразования *de novo*. Подобный стимулирующий синергический эффект при индукции морфогенного ответа в культуре рябчиков ранее рассматривали во многих публикациях (Joshi et al., 2007; Wang et al., 2009). Для оценки активности процессов регенерации нами предложен параметр “морфогенный потенциал”, учитывающий частоту регенерации и число побегов в одном показателе. Согласно полученным результатам, морфогенный

потенциал используемых эксплантов *F. meleagris* возрастает в ряду: тычинка  $\leq$  пестик < листочек околоцветника (табл. 3).

Таким образом, нами впервые проведено исследование по изучению морфогенного потенциала трех типов первичных эксплантов флоральной природы *F. meleagris* f. *alba*. Сравнение регенерационной активности флоральных органов позволяет наиболее полно оценить перспективность использования различных типов эксплантов и существенно дополняет современные знания о культуре *in vitro* этого таксона.

Таблица 3

**Морфогенный потенциал первичных эксплантов *Fritillaria meleagris* f. *alba* на среде В<sub>5</sub>, дополненной БАП 0.4 мкМ, НУК 3.2 мкМ, ИУК 2.3 мкМ**

Эксплант	Частота регенерации, %	Число побегов, шт./экспл.	Морфогенный потенциал
Листочек околоцветника	56	4.4 ± 0.5	246.4
Тычинка	36	2.5 ± 0.3	90.0
Пестик	41	2.2 ± 0.4	90.2

В статье использовался материал Биоресурсной научной коллекции ЦСБС СО РАН, УНУ “Коллекции живых растений в открытом и закрытом грунте”, USU\_440534.

Морфологический анализ развития проводили на базе Центра коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов ЦСБС СО РАН (г. Новосибирск).

Работа выполнена в рамках государственного задания ЦСБС СО РАН по проекту “Оценка морфогенетического потенциала популяций растений Северной Азии экспериментальными методами”, № АААА- А17-117012610051-5 и при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-34-00164/18.

## ЛИТЕРАТУРА

- Баранова М.В.** Луковичные растения семейства Лилейных (география, биоморфологический анализ, выращивание) / М.В. Баранова. СПб., 1999. 229 с.
- Варлыгина Т.И.** *Fritillaria meleagris* L. // Красная книга Российской Федерации (растения и грибы). М., 2008. С. 322–324.
- Зайцева Ю.Г., Новикова Т.И.** Размножение в культуре *in vitro* некоторых морозостойчивых представителей рода *Rhododendron* // Раст. мир Азиатской России. 2017. № 4 (28). С. 66–72. DOI: 10.21782/RMAR1995-2449-2017-4(66-72)
- Akin-Idowu P.E., Ibitoye D.O., Ademoyegun O.T.** Tissue culture as a plant production technique for horticultural crops // Afr. J. Biotech. 2009. V. 8. P. 3782–3788.
- Almanno L., Berthouly M., Michaux-Ferriere N.** Histology of somatic embryogenesis from floral tissues of cocoa // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1996. V. 46. P. 187–194.
- Bhojwani S.S.** Plant tissue culture: An introductory text / S.S. Bhojwani, P.K. Dantu. New Delhi, 2013. 309 p.
- Bonga J.M.** Can explant choice help resolve recalcitrance problems in *in vitro* propagation, a problem still acute especially for adult conifers? // Trees. 2017. V. 31. P. 781–789. DOI: 10.1007/s00468-016-1509-z
- Christianson M.L., Warnick D.A.** Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis // Dev. Biol. 1983. V. 95 (2). P. 288–293.
- Don Palmer C., Keller W.A.** Plant regeneration from petal explants of *Hypericum perforatum* L. // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2011. V. 105. P. 129–134. DOI: 10.1007/s11240-010-9839-9
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E.** Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. 1968. V. 46, No. 5. P. 417–421.
- Husain M.K., Anis M., Shahzad A.** Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Pterocarpus marsupium* Roxb. // Trees. 2010. V. 24. P. 781–787.
- Joshi S.K., Dhar U., Andola H.C.** *In vitro* bulblet regeneration and evaluation of *Fritillaria roylei* Hook. – a high value medicinal herb of the Himalaya // Acta Hort. 2007. V. 756. P. 75–84.
- Koo J.C.** High-frequency plant regeneration from cultured flower bud receptacles of *Allium hookeri* L. // Kor. J. Hort. Sci. Technol. 2014. V. 32 (5). P. 694–701. DOI: <http://dx.doi.org/10.7235/hort.2014.14023>
- Lombardi S.P., Passos I.R.S., Nogueira M.C.S., Appezato-da Gloria B.** *In vitro* shoot regeneration from roots and leaf discs of *Passiflora cincinnata*. Mast. // Braz. Arch. Biol. Biotechnol. 2007. V. 50. P. 239–247.
- Mohammadi-Dehcheshmeh M., Khalighi A., Naderi R., Ebrahimie E., Sardari M.** Indirect somatic embryogenesis from petal explants of endangered wild population of *Fritillaria imperialis* // Pak. J. Biol. Sci. 2007. V. 10 (11). P. 1875–1879.
- Mohammadi-Dehcheshmeh M., Khalighi A., Naderi R., Sardari M., Ebrahimie E.** Petal: a reliable explant for direct bulblet regeneration of endangered wild populations of *Fritillaria imperialis* L. // Acta Physiol. Plant. 2008. V. 30. P. 395–399.
- Nugent G., Wardley-Richardson T., Lu C.Y.** Plant regeneration from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) // Plant Cell Rep. 1991. V. 10 (9). P. 477–480. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00233819>
- Varshney A.** Trees: Propagation and Conservation / A. Varshney, M. Anis. New Delhi, 2014. 116 p. DOI: 10.1007/978-81-322-1701-5\_2
- Wang H.P., An L., Chen Y., Hou Q., Huang R.** Regeneration induction of *Fritillaria przewalskii* bulbs with different phytohormones composition *in vitro* // J. Gansu Agriculture University. 2009. V. 44 (3). P. 50–52.
- Wojciechowicz M.K.** Comparison of regenerative potential of petals, stamens and pistils of five *Sedum* species *in vitro* // Biodiv. Res. Conserv. 2007. V. 5–8. P. 87–94.

Поступила в редакцию 23.05.2019 г.,  
после доработки – 08.07.2019 г.,  
принята к публикации 15.10.2019 г.