

УДК 582.281-8(235.221-2)

Т.А. Сеницына  
Г.И. Пендинен

T.A. Sinitsyna  
G.I. Pendinen

## МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ НЕКОТОРЫХ КОРНЕВИЩНЫХ ВИДОВ РОДА *ALLIUM* L.

### MICROPROPAGATION OF SOME RHIZOMATOUS *ALLIUM* SPECIES

В статье представлены результаты введения в культуру *in vitro* видов секции *Rhizirideum* рода *Allium*. Был апробирован метод введения в культуру *in vitro* изолированных тканей семи видов (*A. nutans*, *A. senescens*, *A. angulosum*, *A. austrosibiricum*, *A. denudatum*, *A. lusitanicum*, *A. rubens*), их микроразмножение и среднесрочное сохранение. Образцы изученных видов неоднозначно реагируют на введение в культуру *in vitro*. В настоящее время в культуре *in vitro* на среднесрочном сохранении при температуре 4–5 °С в коллекции *in vitro* Всероссийского института растениеводства им. Н. И. Вавилова поддерживается 5 образцов пяти видов секции.

#### Введение

Поддержание и хранение коллекций вегетативно размножаемых видов в семенах невозможно, т. к. половое размножение разрушает генетическую структуру сортов, представленных высокогетерозиготными, полиплоидными генотипами. Поэтому такие культуры, в том числе и многие виды луков, могут стабильно воспроизводиться только при вегетативном размножении. Генофонд вегетативно размножаемых культур поддерживается и в виде полевых коллекций. Однако долговременное вегетативное размножение в поле приводит к накоплению в растениях вредителей, возбудителей грибных, вирусных и бактериальных заболеваний (Дунаева и др., 2001).

Использование методов культуры ткани является оптимальным решением задачи как для размножения видов с затрудненным размножением *in situ* и *ex situ*, так и при массовом производстве ценных генотипов растений из ботанических коллекций.

Объектами исследования стали 7 видов секции *Rhizirideum* G. Don f. ex W.D.J. Koch рода *Allium* L.: *A. angulosum* L., *A. austrosibiricum* N. Friesen, *A. denudatum* F. Delaroché, *A. lusitanicum* Lam., *A. nutans* L., *A. rubens* Schrad. ex Willd., *A. senescens* L. s. l. Виды секции характеризуются плоскими линейными или желобчатыми листьями, луковичками, одетыми в пленчатые оболочки и прикрепленными к горизонтальному корневищу.

*A. nutans* (лук-слизун) имеет семь пищевых сортов в России ('Симбир', 'Грин', 'Карлик', 'Лидер', 'Очарование' и др.) и в Украине ('Лилейный'); *A. senescens* s. l. (л. стареющий) имеет декоративные сорта в США ('Blue Twister', 'Blue Eddy') (Государственная..., 2009; Национальный..., 2009; Pacific..., 2009). Российские сорта лука-слизуна включены в «Госреестр по Российской Федерации для садово-огородных участков, приусадебных и мелких фермерских хозяйств» (Госреестр..., 2014). Остальные виды секции перспективны для использования как дикие родичи культурных растений (Сеницына, 2009; Черемушкина и др., 1992).

У луковичных растений существуют некоторые особенности, вызванные их сильно сжатым стеблем. Количество меристем, годных для препарирования, весьма низкое. Они расположены в основании луковички, что приводит к относительно сложной изоляции и высокому риску загрязнения (Keller, 1992) (рис. 1). Также возможно использовать меристемы, расположенные в основании соцветия растения луков.

У представителей р. *Allium* клональное микроразмножение впервые было описано Хуссей (Hussey, 1978). Ранее у некоторых из изучаемых нами видов (*A. nutans*, *A. senescens*, *A. angulosum*) развитие дополнительных побегов и образование каллусов наблюдалось при использовании стандартных сред в культуре фрагмента соцветия и семян (Keller, 1992; Шиша и др., 2008).

Целью нашего исследования было апробирование методов введения в культуру *in vitro* изолированных тканей представителей секции *Rhizirideum*, их микроразмножение и среднесрочное сохранение.

#### Материалы и методы

Работа проводилась в течение 2007–2009 гг. в отделе Биотехнологии Всероссийского института рас-

тениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР, г. Санкт-Петербург). Нами была использована методика культуры *in vitro*, применяемая в отделе для культурных видов луков (Дунаева и др., 2011).

Материал для исследования собирали в природе и с полей Майкопской опытной станции (ОС) ВИР.

В ходе работы луковицы, очищенные от внешних чешуй, стерилизовали 5 минут 70%-м раствором этилового спирта, затем 15 минут в 10%-м растворе перекиси водорода.

В качестве эксплантов использовали верхушечные почки, изолированные из побегов, вместе с частью донца, а также основание соцветия в фазе бутонизации. Использование генеративных органов в качестве эксплантов позволяет преодолеть проблемы загрязнения, возникающие при использовании в качестве эксплантов подземных органов, а также сохранить материнское растение (Keller, 1992; Новикова и др., 2008).

Для эксплантации почек использовали питательную среду P8 и безгормональную среду MS (Murashige, Skoog, 1962), для микроразмножения растений использовали среду MS. Среда P8 является модифицированной средой B5 (Gamborg, Eveleigh, 1968), ее модифицировали С.Ф. Лукьянюк и С.А. Игнатова (1983) для культуры гаплоидных зародышей ячменя. Для приготовления питательной среды для луков в среду MS добавляли также 3–4 мг/л 6-БАП (6-бензиламинопурин), 0,1–0,2 мг/л альфа-НУК (нафтилуксусная кислота). Концентрация сахарозы варьировала от 30 до 60 г/л. При бактериальном инфекционном заражении готовили среду MS с антибиотиками (MS с 60 г/л сахарозы, 3 мг/л 6-БАП, 70–100 мг/л ампициллина), при грибковой инфекции промывали раствором нистатина, затем сажали на среду MS с ампициллином (100 мг/л ампициллина, 1 таблетка нистатина на 1 стаканчик). При приготовлении сред с ампициллином и нистатином растворы антибиотиков фильтровали через стерильный фильтр Swimnex 25 mm 0,45 µm filter unit.

В качестве источника углеводов использовали сахарозу в концентрациях 30–60 г/л 6-БАП является веществом цитокининового типа действия, индуцирующим развитие многочисленных пазушных побегов. При добавлении его в питательную среду осуществлялась активация роста пазушных почек. В качестве стимулятора роста использовалась альфа-нафтилуксусная кислота. Образцы хранились в световом шкафу при температуре 22 °С. Экспланты образцов, рекомендованных к среднесрочному сохранению, хранятся при температуре 4–5 °С.

**Введение в культуру *in vitro*.** Верхушечную почку освобождали от листьев и вместе с частью стебля – донца помещали на питательную среду P8 (в 2007, 2009 гг.) или безгормональную среду MS (в 2008 г.); в пробирку помещали по одной почке размером 1–2 мм. В дальнейшем через 2 или 4 недели после отделения почки из меристемы развивалась листовидная структура. Далее в условиях *in vitro* формировалось целое растение с луковицей и корнями.

**Микроразмножение луков.** Пробирочное растение лука вынимали из пробирки, помещали его в стерильную чашку Петри и разрезали на части, каждая из которых представляла собой отдельный побег. Полученные побеги отделяли от первичного экспланта и вновь самостоятельно культивировали на свежеприготовленной питательной среде MS плюс 3–4 мг/л 6-БАП, 0,1–0,2 мг/л альфа-НУК и 50–60 г/л сахарозы. Экспланты пересаживали на свежеприготовленные среды примерно каждые 1–2 месяца.

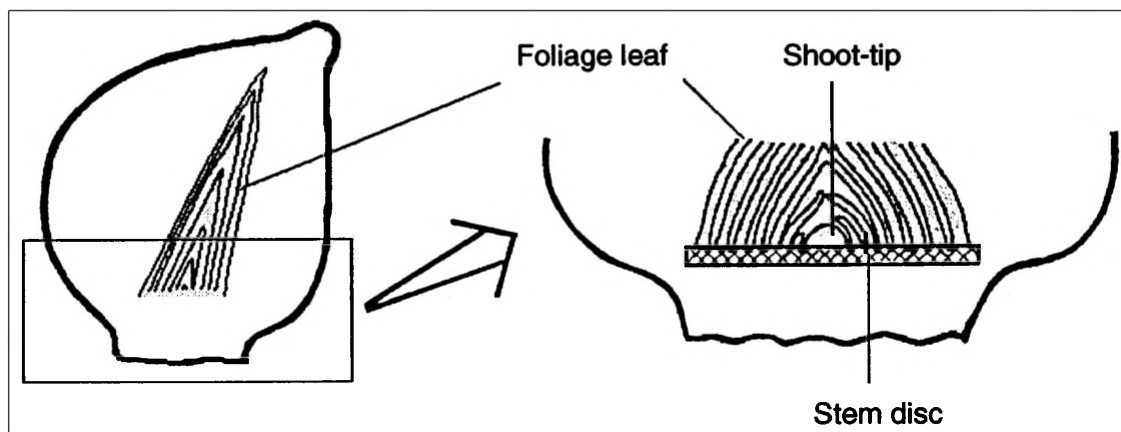


Рис. 1. Схематическое изображение ткани чеснока *Allium sativum* L., обозначенной как «стеблевой диск» (“stem disc”) – донце. Непосредственно под основаниями молодых листьев (foliage leaf) помещается почка возобновления (shoot-tip) (Ayabe, Sumi, 1998)

### Результаты и обсуждение

В 2007 г. в культуру *in vitro* было введено 11 образцов четырёх видов рода *Allium* (2 образца *A. austrosibiricum*, 2 образца *A. senescens*, 4 образца *A. nutans* – репродукции Майкопской ОС ВИР, 3 образца *A. denudatum*). В 2008 г. нами было введено 13 образцов *A. austrosibiricum*, *A. angulosum*, *A. lusitanicum*, *A. nutans*, *A. rubens*, *A. senescens* (все дикие). В 2009 г. в культуру *in vitro* было введено 13 образцов *A. austrosibiricum*, *A. angulosum*, *A. nutans*, *A. rubens*, *A. senescens*, из них 12 повторно. В ходе работы многие образцы выпали из эксперимента по разным причинам: поражение бактериальными и грибковыми инфекциями, ошибки введения. В частности, выпали все 19 эксплантов 6 образцов дикого вида *A. rubens* – их почки либо не прорастали, либо погибали после первых пассажей. Использование основания соцветия в качестве экспланта не дало положительных результатов – после прорастания эксплант *A. angulosum* погиб.

Большинство эксплантов хорошо себя чувствовали в условиях *in vitro*, формировалось целое растение с луковицей и корнями. Однако в течение первого года культивирования микроразмножения не наблюдалось.

У двух образцов *A. senescens*, *A. nutans* репродукции Майкопской ОС ВИР, посаженных в 2007 г., кушание началось через год после введения. Эти два образца дублируют образцы из живой коллекции ВИР.

Три экспланта образца *A. nutans* с Майкопской ОС ВИР хранились в течение месяца при температуре 4–5 °С, затем были пересажены на безгормональную среду MS для оценки влияния смены температурного режима на образование пазушных почек. Два из них были поражены бактериальной инфекцией и простерилизованы 10%-м раствором перекиси водорода. Один из эксплантов в следующем пассаже дал дочернее растение. В целом, можно сказать, что экспонирование растений в условиях низкой положительной температуры не повлияло на способность образца к активации роста пазушных почек.

Таблица 1

Образцы лука, стабильно размножающиеся в коллекции *in vitro*

№ п/п	Культура	Идентификационный номер	№ по каталогу ВИР	Происхождение	Год введения в культуру <i>in vitro</i>
1	<i>A. angulosum</i>	TS-08-10	–	Алтайский край	2008
2	<i>A. lusitanicum</i>	TS-08-12	–	Чехия	2008
3	<i>A. dentatum</i>	TS-08-21	–	Кабардино-Балкария	2008

Примеч.: Данные образцы включены в коллекцию, успешно прошли цикл хранения при +4 °С и слабом освещении в течение двух лет.

У одного из образцов *A. lusitanicum*, посаженного в 2008 г., пазушные почки образовались, начиная со второго пассажа. Образец интересен тем, что стабильно размножается, несмотря на внутреннюю грибковую инфекцию, которая сохранялась после нескольких пассажей на среде с ампициллином и одном пассаже на среде с ампициллином и нистатином. Так как инфекция не влияет на способность растения к микроразмножению, в дальнейшем экспланты этого образца культивировались на обычной среде MS. Этот образец рекомендован к среднесрочному сохранению.

Таблица 2

Образцы дикорастущих видов, поддерживаемые пересадкой *in vitro*, с низким (1–2) индексом размножения

№ п/п	Культура	Идентификационный номер	№ по каталогу ВИР	Происхождение	Год введения в культуру <i>in vitro</i>
1	<i>A. senescens</i>	TS-07-01	k-3060	ЦСБС (г. Новосибирск) (репрод. Майкопской ОС ВИР)	2007
2	<i>A. nutans</i>	TS-07-02	k-1811	Алтайский край (репрод. Майкопской ОС ВИР)	2007

В заключение можно отметить, что изученные образцы разных видов секции *Rhizirideum* неоднородно реагируют на введение в культуру *in vitro*. Так, образцы вида с желобчатыми листьями (*A. rubens*) не прижились в культуре *in vitro*, что может быть связано с особенностями развития почки возобновления. Образцы видов с плоскими линейными листьями (*A. nutans*, *A. senescens*, *A. angulosum* и др.) достаточно хорошо сохраняются в культуре *in vitro*. Для выяснения причин, по которым у некоторых представителей секции микроразмножение либо не наблюдается совсем, либо начинается через длительный промежуток времени, необходимо дальнейшее исследование. В целом, методы клонального микроразмножения и среднесрочного сохранения в культуре *in vitro* могут быть применимы для сохранения видов секции *Rhizirideum*.

В настоящее время в культуре *in vitro* на среднесрочном сохранении при температуре 4–5 °С в коллекции *in vitro* ВИР поддерживается 5 образцов пяти видов секции *Rhizirideum* рода *Allium* (табл. 1, 2). Работа выполнена при финансовой поддержке проекта НШ-1417.2014.4.

#### ЛИТЕРАТУРА

Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений [Электронный ресурс] Электрон. дан. М. 2009. Режим доступа: <http://www.gossort.com>, свободный. Загл. с экрана. Яз. рус., англ.

Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Сорты растений. – Т.1. – Москва, 2014. – 456 с.

**Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А.** Сохранение вегетативно размножаемых культур *in vitro* и криоколлекциях. Под.ред. Гавриленко Т.А. // Методические указания. – С.-Петербург, ГНУ ВИР Россельхозакадемии, 2011. – 64 с.

**Дунаева С.Е., Трускинов Э.В., Антонова О.Ю., Кудрякова Н.В., Гавриленко Т.А.** Стратегия сохранения генофонда вегетативно размножаемых растений *in vitro* из коллекции ВНИИР им. Н.И. Вавилова // Генетические ресурсы культурных растений: Тез. докл. Междунар. науч.-практ. конф. – СПб, 2001. – С. 31–32.

**Лукьянюк С.Ф., Игнатова С.А.** Получение гаплоидов ячменя с помощью гаплопродьюсеров. Методические указания. – Одесса: ВСГИ, 1983. – 21 с.

Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришка НАН Украины [Электронный ресурс] Электрон. дан. Киев, 2009. Режим доступа: [http://www.nbg.kiev.ua/ru/collections\\_expositions](http://www.nbg.kiev.ua/ru/collections_expositions), свободный. Загл. с экрана. Яз. рус., англ., укр.

**Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В.** Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального Сибирского ботанического сада // Вестник ВОГиС, 2008. – Т. 12, № 4. – С. 564–572.

**Синицына Т.А.** Обзор секции *Rhizirideum* G. Don f. ex W. D. J. Koch рода *Allium* L. в связи с сохранением хозяйственно-ценного генофонда на территории России // Вестник Алтайского гос. аграрного ун-та, 2009. – № 10 (60). – С. 83–86.

**Черемушкина В.А., Днепровский Ю.М., Гранкина В.П., Судобина В.П.** Корневищные луки Северной Азии: Биология, экология, интродукция. – Новосибирск: Наука, 1992. – 159 с.

**Шиша Е., Сикура И., Кучук Н.** Сохранение *in vitro* биоразнообразия видов рода *Allium* L. // Научный вестник Ужгородского университета. Серия Биология, 2008. – Вып. 24. – С. 244–254.

**Ayabe M., Sumi S.** Establishment of a novel tissue culture method, stem-disc culture, and its practical application to micropropagation of garlic (*Allium sativum* L.) // Plant Cell Reports., 1998. – Vol. 17. – P. 773–779.

**Gamborg O.L., Eveleigh D.E.** Culture methods and detection of glucanases in suspension culture of wheat and barley // Can. J. of Biochemistry, 1968. – Vol. 46, No. 5. – P.417–421.

**Hussey G.** *In vitro* propagation of the onion *Allium cepa* by axillary and adventitious shoot proliferation // Sci. Hortic, 1978. – Vol. 9. – P. 227–236.

**Keller J.** *In vitro* cultivation of *Allium* species – a method for application in plant breeding and germplasm conservation // The genus *Allium* – taxonomic problems and genetic resources (Proceedings of an International Symp. held at Gatersleben, Germany, June 11–13, 1991. Ed. P. Hanelt, K. Hammer, H. Knupffer). – 1992. – P. 137–152.

**Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // J. Physiol. Plant., 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

Pacific bulb society: Rhizomatous alliums [Электронный ресурс] Электрон. дан. 2009 Режим доступа: <http://www.pacificbulbsociety.org/pbswiki/index.php/RhizomatousAlliums#senescens>, свободный.

#### SUMMARY

There are results of *in vitro* culture introduction of 7 species of section *Rhizirideum* genus *Allium* in the article. Method of *in vitro* culture introduction of isolated tissues, micropropagation and medium-term conservation were approved on the section representatives. The species samples reacted to *in vitro* culture differently. In present, 5 samples of 5 section species are maintained in culture *in vitro* under medium-term conditions (4–5 °C) in Biotechnology department of WIR.