

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ЛУКОВИЧНЫХ ЧЕШУЯХ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ ЛИЛИЙ В УСЛОВИЯХ МАСС-КЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO*

О.А. Чурикова, В.А. Румынин, Р.П. Барыкина, А.Г. Слюсаренко

В настоящее время метод массового клонального размножения растений *in vitro* получил широкое развитие и применение в практике [1]. Используя его, можно тиражировать ценные и редкие сорта, получать огромное количество однородного и здорового посадочного материала, а также новые перспективные формы. Однако, как уже неоднократно указывалось в литературе, морфогенетические процессы, происходящие при культивировании клеток, тканей и органов растений *in vitro*, остаются недостаточно изученными. Приводимые сведения весьма фрагментарны и часто поверхностны. Необходимость же теоретических обоснований масс-клональной технологии с точки зрения фундаментальных областей ботанических дисциплин очевидна.

Ранее нами были начаты исследования морфогенеза в процессе масс-клонального размножения луковичных растений, отличающихся высокими декоративными качествами и представляющих, в некоторых случаях, определенную ценность как лекарственное и пищевое сырье. Более подробно процессы индукции морфогенеза и ранней дифференциации были изучены у *Lilium regale* Wils. и азиатского гибрида 'Bianca' [2]. В предлагаемом сообщении основное внимание уделено анализу результатов сравнительного морфолого-анатомического изучения процесса регенерации в тканях разных видов лилий, выявлению некоторых общих закономерностей и различий в ходе морфогенеза *in vitro*. Для индукции культуры использовали чешуи луковиц шести видов лилий – *L. longiflorum* Thunb., *L. formosanum* Wallace, *L. candidum* L., *L. martagon* L., *L. pardalinum* Kellogg, *L. speciosum* Thunb., относящихся соответственно к секциям *Regalia*, *Lilium*, *Martagon*, *Pseudomartagon*, *Archelirion* [3]. Методика постановки и проведения экспериментов, а также микроскопических исследований описана ранее [2, 4].

Наиболее ярко выраженными меристематическими потенциами у всех исследованных видов отличаются богатые питательными веществами активно фотосинтезирующие клетки одного-двух субэпидермальных слоев мезофилла преимущественно адаксиальной стороны экспланта. Первые периклиналильные деления отмечаются на 10–12-й день культивирования эксплантов (рис. 1, а–в). Обычно на стадии тетрад, образующихся в результате двух последовательных делений каждой инициальной клетки, ориентация клеточных перегородок изменяется. Они возникают в разных плоскостях, что приводит к образованию под общей оболочкой инициальной клетки группы мелких клеток с густым цитоплазматическим содержимым и четко различимыми ядрами [2]. Многие исследователи предпринимали попытки проследить ход развития эмбрионидов из инициальной соматической клетки и сопоставить его с эмбриогенезом *in vivo* [5–7]. Однако, как показывают многочисленные эксперименты, это два разных явления – эмбриоидогенез и эмбриогенез. Эмбриоид в отличие от зародыша имеет соматическое происхождение и развивается в иных морфофизиологических условиях [8]. При некотором морфологическом сходстве с зародышами эмбриоиды отличаются внутренней организацией и отсутствием четко выраженной полярности [9], что обусловлено специфическими условиями, создаваемыми *in vitro*.

Дальнейшая судьба клеточных агрегатов, образовавшихся в результате нескольких делений инициальных клеток, сохраняющих целостной общую оболочку ("сег-

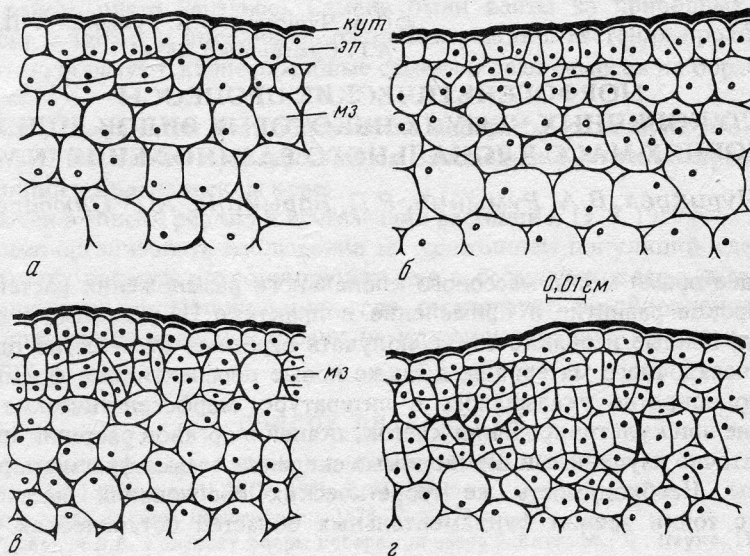


Рис. 1. Первые деления в субэпидермальных слоях мезофилла и формирование клеточных агрегатов в эксплантах луковичных чешуй *Lilium speciosum* (а, б) и *L. formosanum* (в, г)
кут — кутикула, эп — эпидерма, мз — мезофилл

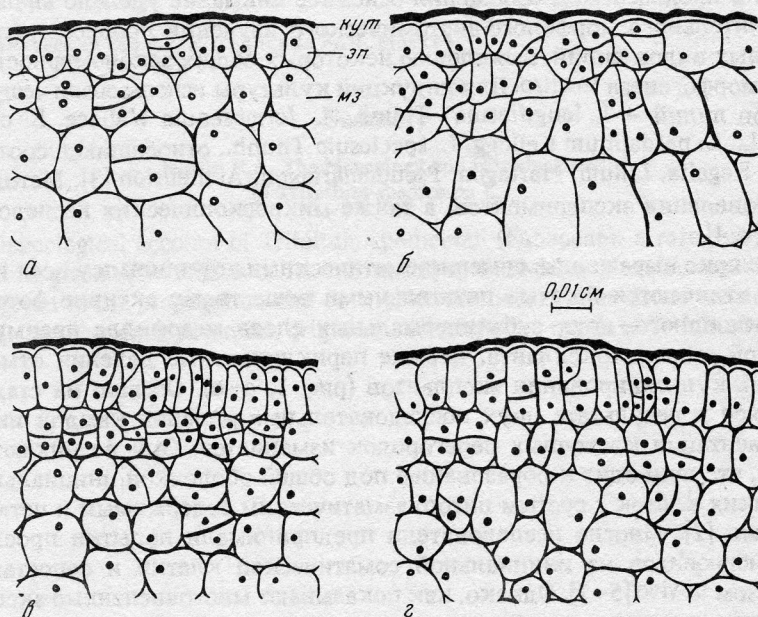


Рис. 2. Анти- и периклиальные деления в чешуях *L. longiflorum* (а, б) и *L. pardalinum* (в, г)
Условные обозначения см. рис. 1

ментированных" клеток) (рис. 1, а, з; 2, б, в) может быть различной: а) каждая из них целиком дифференцируется в побеговый конус; б) лишь часть "сегментированных" клеток участвует в формировании побегового апекса; в) разрушение и, видимо, лизис общих оболочек приводит к образованию единого массива меристематических клеток ("проэмбрионального" клеточного комплекса), из которого впоследствии локально дифференцируются побеги и корни. Активность клеточных делений у всех вышеуказанных видов ограничивается несколькими субэпидермальными слоями мезофилла, лишь у *L. regale*, по нашим наблюдениям, волна делений распространяется с периферии вглубь чешуи.

Эпидермальные клетки в образовании меристематических очагов у большинства из названных видов непосредственного участия не принимают. Они претерпевают под воздействием интенсивного увеличения в объеме клеток субэпидермальных слоев мезофилла растяжение в тангентальном направлении и антиклинальные деления. Исключение составляют *L. longiflorum* и *L. pardalinum*, клетки эпидермы луковичных чешуй которых проявляют относительно высокую меристематическую активность, делятся как анти-, так и периклинально (рис. 2, а-з; 3), непосредственно участвуя наряду с мезофиллом в формировании меристематического бугорка. В отдельных случаях можно было наблюдать образование небольших очагов меристемы эпидермального происхождения. Но они, как правило, оказываются нежизнеспособными, что, видимо, связано с недостатком необходимых для дальнейшего развития питательных веществ, а также с более ранней и более глубокой специализацией эпидермальных клеток по сравнению с клетками мезофилла. Анализ морфогенетических процессов, протекающих *in vitro* в луковичных чешуях *L. regale* показал, что регенерация происходит как с образованием раневой пробки, так и без нее. В соответствии с этим можно выделить пять вариантов регенерации; в первых трех случаях раневая поверхность экспланта затягивается пленкой из остатков разрушенных клеток и вытекающего из них клеточного сока, защищающей живые ткани от внешней инфекции, в двух других — образуется раневая пробка.

1. Первыми меристематизируются клетки субэпидермального слоя мезофилла (заметно увеличивается объем цитоплазматического содержимого, размер ядер, утончаются оболочки). Волна делений постепенно охватывает все более глубокие участки мезофилла. В центре сформировавшегося массива меристематических клеток дифференцируются гидроцитные узлы, снаружи от которых впоследствии развиваются побеговые апексы. От гидроцитного узла образование васкулярных элементов идет в двух противоположных направлениях — как акро, так и базипетальном, в результате чего устанавливается непрерывная связь проводящих систем развивающейся придаточной почки и чешуи (рис. 4, а; 5).

2. Деления локализуются в глуболежащих слоях мезофилла, оказавшихся вблизи поврежденной поверхности экспланта, в условиях достаточно хорошей аэрации. Как и в первом случае, дифференциации побеговых конусов из агрегатов клеток предшествует образование в их центре гидроцитных узлов, которые соединяются с проводящей системой материнской чешуи, тем самым обеспечивая формирующиеся побеги содержащимися в ней питательными веществами (рис. 4, б).

3. В первую очередь делятся клетки паренхимной обкладки проводящих пучков близ раневой поверхности (рис. 4, в). От них клеточные деления распространяются и на прилегающие участки мезофилла. Отсутствие раневой пробки облегчает появление зачатков побегов на поверхности экспланта.

4. Многочисленные гидроцитные узлы, дифференцирующиеся с обеих сторон экспланта вблизи пробки, становятся центрами меристематической активности мезофилла (рис. 4, г).

5. Наряду с делением клеток мезофилла, примыкающих к ранее заложившимся под пробкой гидроцитным узлам, отмечаются клеточные деления в субэпидермальном слое преимущественно адаксиальной стороны экспланта (рис. 4, д).

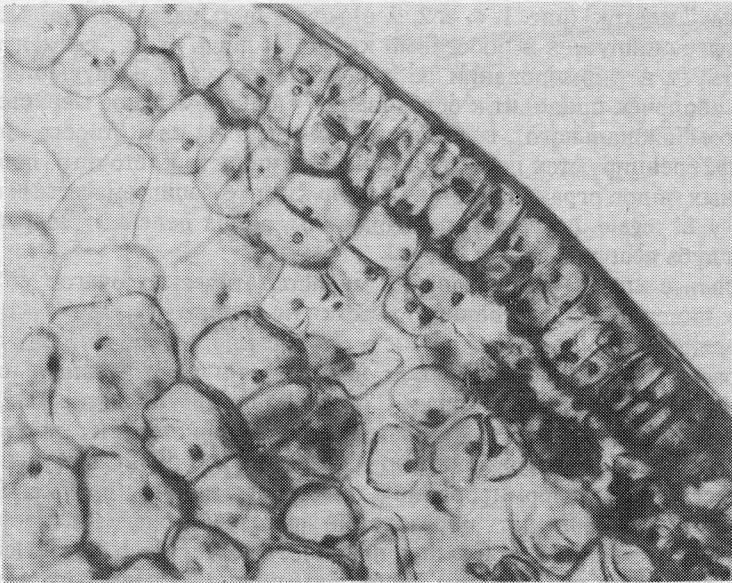


Рис. 3. Деления эпидермальных клеток в эксплантах луковичных чешуй *L. pardalinum*

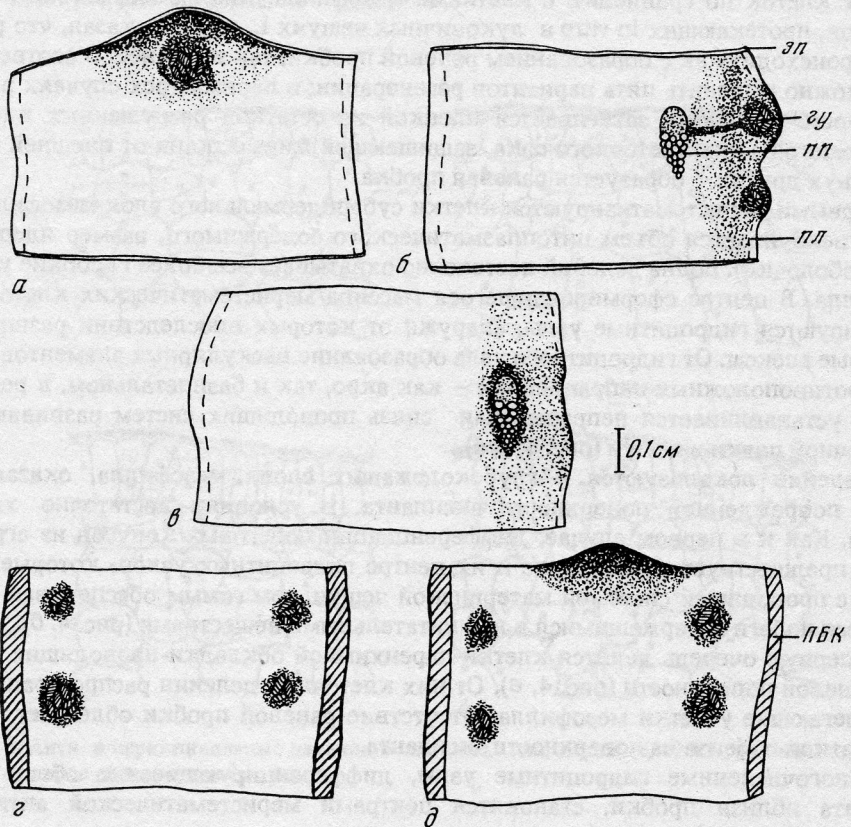


Рис. 4. Разные варианты регенерации в чешуях *L. regale* (а-д) (схема)
 эп — эпидерма, гу — гидроцитный узел, пп — проводящий пучок, пл — пленка,
 пбк — пробка

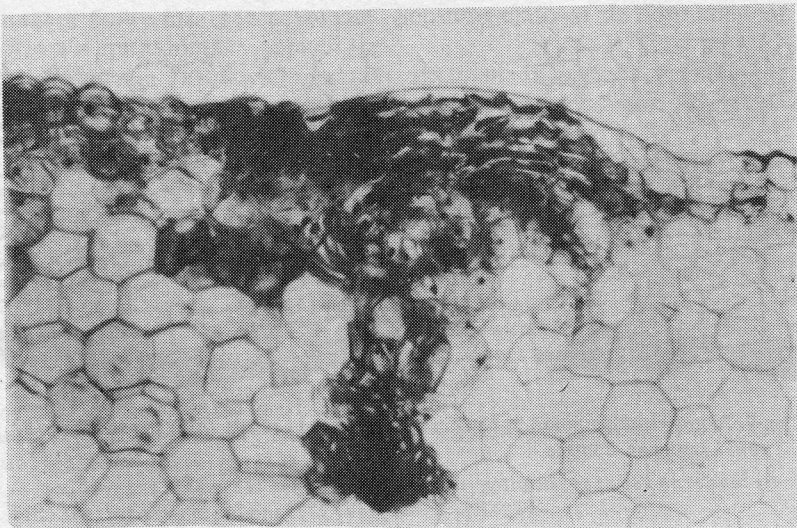


Рис. 5. Васкулярная связь зачатка почки и чешуи у *L. formosanum* ($\times 100$)

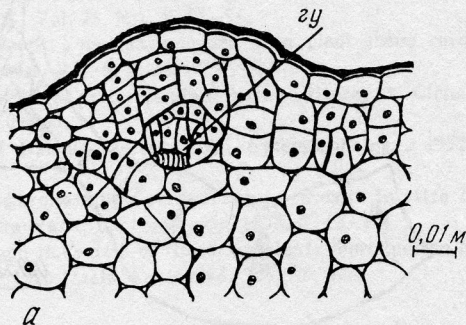


Рис. 6. Дифференциация гидроцитов в меристематическом очаге экспланта чешуи ($\times 160$)

Процессы индукции морфогенеза и ранней дифференциации в чешуях шести других исследованных видов лилий протекают сходным образом. В частности, при формировании *de novo* меристематических очагов, а впоследствии и побеговых конусов, посредством гидроцитов устанавливается связь их проводящей системы с таковой луковичной чешуи, в тканях которой содержится большой запас питательных веществ (см. рис. 5). Отмечены лишь некоторые различия. Так, у *L. longiflorum* и *L. pardalinum* в формировании меристематических зачатков, кроме субэпидермальных клеток мезофилла, непосредственно участвуют и эпидермальные, в результате чего они имеют смешанное происхождение. У *L. formosanum* и *L. pardalinum* установлена сравнительно ранняя дифференциация гидроцитов – на стадии агрегатов клеток (рис. 6). Раневая пробка была отмечена наряду с *L. regale* (рис. 7 а) и у *L. candidum* (рис. 7, б). При этом на срезах хорошо видна полоса периклинально делящихся клеток, пересекающая все ткани чешуи и несколько удаленная от края экспланта. Оболочки образующихся при этом клеток, отчленяющихся кнаружи от нее, суберинизируются, изолируя тем самым наружные претерпевающие некроз ткани. Функцию защиты живых тканей эксплантов от внешней инфекции у других видов выполняет ранее описанная пленка. Однако, не исключено, что процесс образования раневой пробки здесь лишь несколько замедлен или же он не успевает проявиться из-за высокой активности морфогенетических процессов.

При длительном культивировании эксплантов на среде для индукции морфогенеза на осевой части относительно хорошо развитых почек появляются как эндогенные образования зачатки придаточных корней (рис. 8, а, б). При своем развитии они

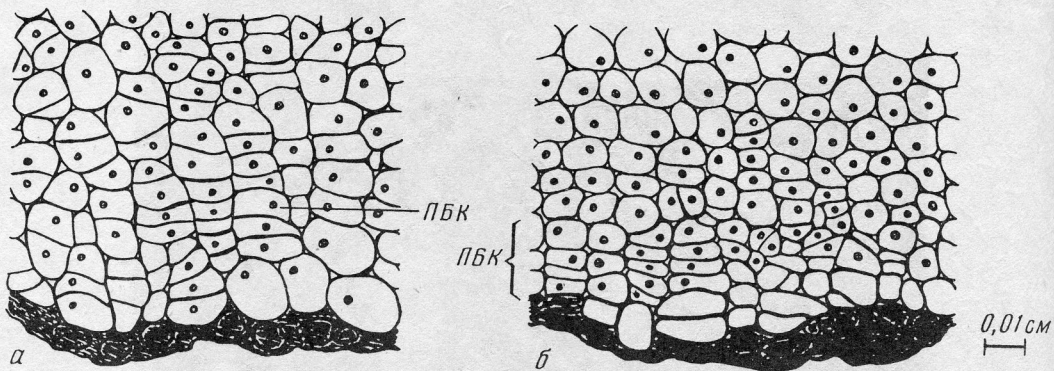


Рис. 7. Заложение раневой пробки в эксплантах *L. regale* (а) и *L. candidum* (б)
пбк — раневая пробка

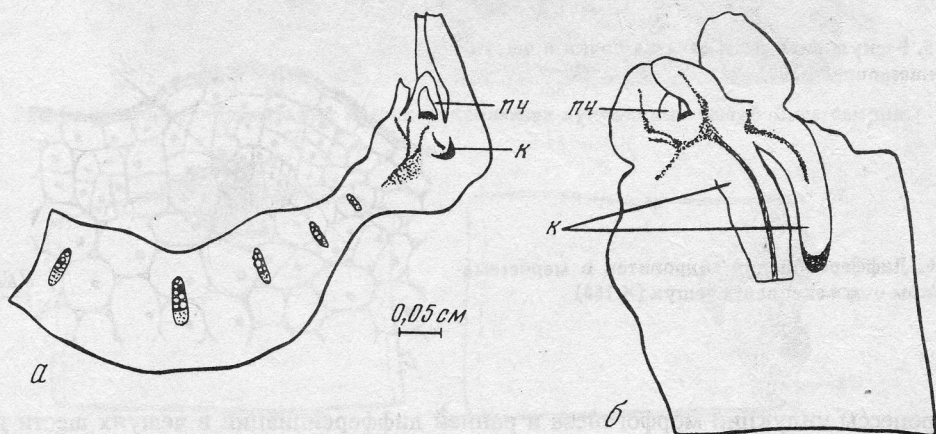


Рис. 8. Зачатки придаточных корней в луковичных чешуях *L. formosanum* (а) и *L. pardalinum* (б)
пч — почка, к — придаточный корень

прорастают через толщу луковичной чешуи. Как было отмечено ранее [2], изъятие из среды гормонов роста и добавление активированного угля способствует более интенсивному корнеобразованию.

Проведенный анализ сравнительного морфолого-анатомического исследования процесса регенерации *in vitro* в тканях семи исследованных видов лилий позволил сделать следующие выводы.

1. Процессы индукции морфогенеза и ранней дифференциации в чешуях лилий протекают, в целом, сходным образом. Наиболее высокими меристематическими потенциальными отличаются богатые питательными веществами клетки мезофилла. У *L. longiflorum* и *L. pardalinum* в формировании меристематических очагов могут принимать участие и эпидермальные клетки чешуй. Относительно низкая меристематическая активность последних, видимо, определяется их более глубокой специализацией.

2. Регенерация сопровождается образованием защитной пленки (у *L. longiflorum*, *L. formosanum*, *L. martagon*, *L. speciosum*) или раневой пробки (*L. regale*, *L. candidum*).

3. Относительно ранняя дифференциация в процессе морфогенеза гидроцитов, гидроцитных узлов и гидроцитных тяжей в эксплантах *L. formosanum* и *L. pardalinum*

обуславливает более быстрое развитие формирующихся de novo апексов побегов, а впоследствии и придаточных корней.

4. Регенерация при культивировании эксплантов чешуй исследованных видов лилий *in vitro* сопровождается формированием адвентивных новообразований по типу геммо- и гемморизогенеза [10, 11].

Авторы выражают искреннюю благодарность за предоставление луковиц *Lilium pardalinum* и *Lilium martagon* М.В. Барановой, О.В. Алексеевой и Е.В. Клюйкову.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pierik R.L.M.* In vitro culture of higher plants. Dordrecht: Nijhoff, 1987. 344 p.
2. *Чурикова О.А., Румынин В.А., Барыкина Р.П., Слюсаренко А.Г.* Некоторые особенности морфогенеза *in vitro* при масс-клональном размножении лилий // Бюл. Гл. ботан. сада. 1991. Вып. 159. С. 43–49.
3. *Баранова М.В.* Лилии. Л.: Агропромиздат, 1990. 384 с.
4. *Румынин В.А., Слюсаренко А.Г.* Масс-клональное размножение лилий // Бюл. Гл. ботан. сада. 1989. Вып. 153. С. 62–69.
5. *Haccius B.* Les premiers stades des embryons vegetaux zygotiques et somatiques sont-ils differents ou non? // Bull. Soc. bot. France. Mem. 1973. Vol. 120. P. 201–206
6. *Haccius B., Bhandari N.N.* Delayed histogen differentiation as a common primitive character in all types of non-zygotic embryos // Phytomorphology 1975. Vol. 25, N 1. P. 91–94.
7. *Steward F.C., Shantz E.M.* Biochemistry and morphogenesis: Knowledge derived from plant tissue cultures // Forth Intern. congr. of biochem. L.: Pergamon press. Vol. 6. P. 223–236.
8. *Vasil I.K., Hildebrandt A.C.* Variations of morphogenetic behavior in plant tissue cultures. 1. *Cichorium endivia* // Amer. J. Bot. 1966. Vol. 53, N 9. P. 860–869.
9. *Danilina A.N.* Morphogenesis in tissue cultures of *Daucus carota* L. // Phytomorphology. 1972. Vol. 22. N 2. P. 160–164.
10. *Батыгина Т.Б.* О некоторых закономерностях морфогенеза при регенерации растений *in vitro* // Теоретические вопросы регенерации растений. Махачкала: Даг. гос. ун-т, 1978. С. 13–14.
11. *Batygina T.B.* The place of embryooidogeny phenomenon in system of flowering plants reproduction // XI Intern. symp. "Embryology and seed reproduction": Abstracts. Leningrad, 1990. P. 17.

Summary

Churikova O.A., Rumynin V.A., Barykina R.P., Sliusarenko A.G.
Morphogenetic processes in bulb scales of some species
of lilies during the mass-clonal propagation *in vitro*

The results of the comparative morphoanatomical study of regeneration in bulb scale explants of 6. species of *Lilium* are given. The early stages of morphogenesis, peculiarities of initial cell divisions different types of regeneration in bulb scales are discribed in detail, the features of similarity and difference being revealed. The highest meristematic potential is characteristic of the cells of 1–3 subepidermal layers of mesophyll. The first cell divisions give rise to meristematic clumps. In most cases epidermis doesn't take immediate part in this process. Early stage of hydrocytes differentiation and cork tissue formation are revealed.