

## Особенности размножения *in vitro* некоторых видов рода *Tulipa* L.

### *In vitro* reproduction peculiarities of some species from genus *Tulipa* L.

Малаева Е. В.<sup>1,2</sup>, Фетисова А. И.<sup>1</sup>

Malaeva E. V.<sup>1,2</sup>, Fetisova A. I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Волгоградский региональный ботанический сад, г. Волгоград, Россия. E-mail: e.malaeva@mail.ru

<sup>1</sup>Volgograd Regional Botanical Garden, Volgograd, Russia

<sup>2</sup>Волгоградский государственный социально-педагогический университет, г. Волгоград, Россия

E-mail: nastyusha.rusina@mail.ru

<sup>2</sup>Volgograd State Social and Pedagogical University, Volgograd, Russia

**Реферат.** В статье представлена информация по совершенствованию технологии клonalного микроразмножения трех видов тюльпанов, произрастающих на территории Волгоградской области – *Tulipa biebersteiniana*, *T. suaveolens* и *T. biflora*. Подобран оптимальный режим стерилизации семян рода *Tulipa* – 7%-й раствор Lysoformin® 3000, при экспозиции 3 минуты. При данном режиме выход стерильных эксплантов составил для *T. biebersteiniana* 90 %, *T. suaveolens* 75 % и 70 % для *T. biflora*. Максимальные коэффициенты размножения получены на питательной среде МС, содержащей 6-БАП 15 мг/л и ИУК 7,0 мг/л для *T. suaveolens* и *T. biebersteiniana* – 25,6 ± 0,9 и 32,2 ± 1,1. Однако высокие коэффициенты размножения сочетались с большим количеством аномальных (вигрифцированных) побегов – 68 % и 75 % для исследуемых видов. Подобраны оптимальные питательные среды для индукции прямого органоненеза тюльпанов – БАП 0,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л. На данной питательной среде из одного сегмента чешуи развивалось от 7,6 ± 0,6 для *T. suaveolens* до 9,1 ± 0,7 для *T. biebersteiniana* побегов за один пассаж. Максимальные показатели длины побега зафиксированы на питательной среде содержащей Кинетин 0,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л – 52,9 ± 0,6, 49,1 ± 0,8 и 47,5 ± 0,6 для *T. biebersteiniana*, *T. biflora* и *T. suaveolens* соответственно.

**Ключевые слова.** Питательная среда, регуляторы роста, род *Tulipa* L., экспланкт, *in vitro*.

**Summary.** This article provides information about improving of the clonal micropropagation technology and *in vitro* reproduction peculiarities of 3 species of tulips growing in the Volgograd region – *Tulipa biebersteiniana*, *T. suaveolens* and *T. biflora*. The optimal mode of sterilization seeds of species of the genus *Tulipa* has been selected – a 7% solution of Lysoformin® 3000, at an exposure of 3 minutes. With this regime, the yield of sterile explants was 90 % for *T. biebersteiniana*, 75 % for *T. suaveolens* and 70 % for *T. biflora*. The highest reproduction coefficient were obtained on the MS nutrient medium using 6-BAP 15 mg/l and IAA 7.0 mg/l for *T. suaveolens* and *T. biebersteiniana* – 25.6 ± 0.9 and 32.2 ± 1.1. Optimal nutrient media for induction of direct organogenesis of tulips were selected – BAP 0.5 mg/l + NAA 1.0 mg/l. On this nutrient medium, from one segment of scales, from 7.6 ± 0.6 for *T. suaveolens* to 9.1 ± 0.7 for *T. biebersteiniana* shoots developed in one passage. The highest shoot length values were recorded on a nutrient medium using Kinetin 0.5 mg/l + NAA 1.0 mg/l – 52.9 ± 0.6, 49.1 ± 0.8 and 47.5 ± 0.6 for *T. biebersteiniana*, *T. biflora* and *T. suaveolens*, respectively.

**Key words.** Explants, genus *Tulipa* L., *in vitro*, medium nutrient, plant growth regulators.

Тюльпан (*Tulipa* L.) – род многолетних травянистых растений семейства Лилейные (Liliaceae). По сведениям различных авторов, род *Tulipa* насчитывает 100–140 видов (Введенский, 1935; Мордак, 1979; Баранова, 1999). На территории Волгоградской области произрастают три вида рода *Tulipa*: *Tulipa suaveolens* Roth. (*T. schrenkii* Regel.), *T. biebersteiniana* Schult. et Schult. и *T. biflora* Pall. Многие виды тюльпанов относятся к числу охраняемых растений во многих регионах России. Так, *T. suaveolens* занесен в Красную книгу РФ (2024) и Красную книгу Волгоградской области (2017), а также в Красные книги сопредельных регионов.

Целью нашей работы являлась оптимизация состава питательных сред для ускоренного размножения дикорастущих видов тюльпанов в культуре *in vitro*.

Работы А. Ш. Ахметовой и Л. Н. Мироновой (2008) посвящены разработке технологии клonalного микроразмножения гибридных форм тюльпанов путем прямого органогенеза. В качестве

первичных эксплантов авторы использовали сегменты семядолей и чешуи микролуковиц. В работах Т. А. Крицкой, А.С. Кашина и М.Ю. Касаткина (2019) изучены особенности морфогенеза *T. suaveolens* *in vitro* и проведена оценка генетической стабильности растений-регенерантов с помощью молекулярных ISSR-маркеров.

Для разработки и усовершенствования протокола микроразмножения трех видов тюльпанов: *T. suaveolens*, *T. biflora* и *T. biebersteiniana*, использовали зрелые семена, собранные из природных популяций Волгоградской области (Старополтавский район, Новотихоновский тюльпанный луг).

За основу методики биотехнологических исследований взяты общепринятые биотехнологические методы и приемы (Бутенко, 1999). Асептические работы с культурой тканей проводили в условиях горизонтального ламинар-бокса S2010 (Holten LaminAir, Франция). Для стерилизации семян использовали раствор Lysoformin® 3000 (Лизоформин 3000) и Sodium hypochlorite (Белизна) в различной концентрации и временной экспозиции (табл. 1)

Таблица 1

Варианты режимов стерилизации растительных эксплантов

| Стерилизатор        | Концентрация, % |       |        |
|---------------------|-----------------|-------|--------|
|                     | 5               | 7     | 10     |
| Sodium hypochlorite | 20 мин          |       | 10 мин |
| Lysoformin® 3000    | 5 мин           | 3 мин |        |
|                     | 7 мин           | 5 мин |        |

Оптимальный режим стерилизации определяли опытным путем с учетом количества инфицированных образцов и количества проросших семян, выраженный в процентах.

Семена помещали в Чашки Петри на безгормональную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) (Murashige, Skoog, 1962) и культивировали в климатической камере SANYO MRL-351H при температуре  $8 \pm 1$  °C для холодной стратификации. Через 2 месяца проростки пересаживали в пробирки на питательные среды для микроразмножения. В экспериментах использовали следующие модификации питательных сред:

1. МС 6-БАП 1,5 мг/л и 5,0 мг/л
2. МС 6-БАП 5,0 мг/л + ИУК 1,5 мг/л
3. МС 6-БАП 10,0 мг/л + ИУК 2,0 мг/л
4. МС 6-БАП 15 мг/л + ИУК 7,0 мг/л
5. МС 6-БАП 0,2 мг/л + НУК 0,5 мг/л
6. МС 6-БАП 0,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л
7. МС 6-БАП 0,5 мг/л + ИУК 1,0 мг/л
8. МС Кинетин (Кин) 0,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л
9. МС Кинетин (Кин) 0,5 мг/л + ИУК 2,0 мг/л

В процессе исследований измеряли и рассчитывали: среднее число побегов на экспланта (в штуках) и среднюю длину побега (в миллиметрах). Повторность опытов трехкратная по 10 эксплантов в каждом варианте. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Microsoft Office Exel. Полученные данные достоверны при  $p < 0,05$ .

Семена тюльпанов характеризуются глубоким морфофизиологическим типом покоя. Причина такого покоя заключается в недоразвитии зародыша и сильном физиологическом механизме торможения прорастания (Николаева и др., 1985). Для созревания зародыша семенам необходима холодная стратификация в темноте при температуре  $8 \pm 1$  °C. Семена культивировали 2 месяца в условиях климатической камеры, затем переносили в культуральное помещение при температуре  $24 \pm 2$  °C, освещенностью 2,5–5 клк и 16-часовом фотопериоде.

Для стерилизации эксплантов семян тюльпанов использовали бытовую белизну (Sodium hypochlorite) и раствор Lysoformin® 3000 в различной концентрации и времени экспозиции.

По результатам наших исследований для видов рода *Tulipa* L. оптимальным режимом стерилизации является 7% Lysoformin® 3000, при этом время экспозиции составило 3 минуты. При данном режиме выход стерильных эксплантов после холодной стратификации составил для *T. biebersteiniana* 90 %, *T. suaveolens* – 75 % и 70 % для *T. biflora* (табл. 2).

Таблица 2

Выход жизнеспособных эксплантов видов рода *Tulipa* L. в зависимости от режима стерилизации

| №<br>п/п | Вид                       | Выход жизнеспособных эксплантов, %    |                                      |                                   |                                   |                                   |                                   |
|----------|---------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
|          |                           | 10 % Sodium<br>hypochlorite<br>10 мин | 5 % Sodium<br>hypochlorite<br>20 мин | 5 %<br>Lysoformin®<br>3000, 5 мин | 5 %<br>Lysoformin®<br>3000, 7 мин | 7 %<br>Lysoformin®<br>3000, 3 мин | 7 %<br>Lysoformin®<br>3000, 5 мин |
| 1        | <i>T. suaveolens</i>      | 35                                    | 40                                   | 50                                | 55                                | 75                                | 55                                |
| 2        | <i>T. biebersteiniana</i> | 40                                    | 60                                   | 50                                | 60                                | 90                                | 60                                |
| 3        | <i>T. biflora</i>         | 35                                    | 45                                   | 45                                | 55                                | 70                                | 65                                |

В настоящее время во многих исследованиях для сокращения сроков стратификации семян используют культуру изолированных зародышей. Следует отметить, что для дальнейшего развития зародышей достаточно сложно подобрать оптимальную питательную среду, которая обеспечит их динамичный рост и развитие.

В исследованиях Л. И. Тихомировой (2009), А. Ю. Набиевой и Т. В. Елисафенко (2012) получены высокие коэффициенты размножения для видов рода *Iris* L. на питательных средах с высоким содержанием 6-БАП 1,5-15 мг/л в сочетании с ИУК 2,0-7,0 мг/л.

В своих исследованиях мы использовали высокие концентрации цитокининов и их сочетания с ауксинами с целью подбора оптимальных питательных сред для проростков рода *Tulipa*. На предварительном этапе при помощи культуры изолированных зародышей были получены проростки *T. biebersteiniana* и *T. suaveolens*, которые в дальнейшем пересаживали на экспериментальные среды.

Таблица 3

Коэффициент размножения видов рода *Tulipa* на экспериментальных питательных средах

| Вид                       | Питательная среда   |                      |                      |  |   |   |
|---------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|--|---|---|
|                           | МС 6/г,<br>контроль | МС 6-БАП<br>1,5 мг/л | МС 6-БАП<br>5,0 мг/л | МС 6-БАП 5,0<br>мг/л + ИУК 1,5<br>мг/л | МС 6-БАП<br>10,0 мг/л +<br>ИУК 2,0 мг/л | МС 6-БАП 15,0<br>мг/л<br>+ ИУК 7,0 мг/л |
| <i>T. suaveolens</i>      | 1,2 ± 0,4           | 2,5 ± 0,6            | 6,3 ± 0,7            | 8,5 ± 0,9                              | 12,3 ± 1,2                              | 25,6 ± 0,9                              |
| <i>T. biebersteiniana</i> | 1,4 ± 0,2           | 3,1 ± 0,4            | 7,4 ± 0,6            | 8,9 ± 0,7                              | 15,8 ± 0,8                              | 32,2 ± 1,1                              |

Примеч.: коэффициент размножения, шт. на 70-й день культивирования.

Следует отметить, что на экспериментальных питательных средах зафиксирована высокая регенерационная активность в сравнении с контрольной средой. Так, на питательной среде МС, содержащей 6-БАП 15 мг/л и ИУК 7,0 мг/л коэффициент размножения (среднее количество побегов на экспланта, шт.) на 70-й день культивирования для *T. suaveolens* и *T. biebersteiniana* был максимальным и составил 25,6 ± 0,9 и 32,2 ± 1,1 соответственно (табл. 3). При этом, высокие коэффициенты размножения сочетались с большим количеством аномальных (витрифицированных) побегов – 68 % и 75 % для исследуемых видов.

Установлено, что высокие содержания цитокининов обеспечивают высокую регенерационную активность, но в тоже время значительно стимулируют образование аномальных (витрифицированных) побегов, что является негативным фактором в работе с редкими видами растений.

Многие авторы в своих исследованиях отмечают, что одним из основных показателей эффективности размножения редких видов *in vitro* является поддержание генетической стабильности размножаемых образцов (Самарская и др., 2019; Молканова и др., 2020; Малаева, 2022).

Таким образом, использование высоких концентраций фитогормонов для проростков нецелесообразно. В дальнейших исследованиях, для индукции прямого органогенеза, использовали кроющие чешуйки микролуковиц проростков, которые субкультивировали на модифицированных питательных средах, содержащих 6-БАП, Кин в сочетании с ИУК и НУК в различных концентрациях (табл. 4).

Лучшие показатели индукции прямого органогенеза – среднее число побегов на экспланта, получены на питательной среде 6-БАП 0,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л. На данной питательной среде зафиксированы высокие показатели органогенеза для трех исследуемых видов тюльпанов. Из одного сегмента чешуи развивалось от 7,6 ± 0,6 для *T. suaveolens* до 9,1 ± 0,7 для *T. biebersteiniana* побегов за один пассаж.

Таблица 4

Органогенез видов рода *Tulipa* на экспериментальных питательных средах

| Регуляторы роста, мг/л | <i>T. suaveolens</i> |            | <i>T. biebersteiniana</i> |            | <i>T. biflora</i> |            |
|------------------------|----------------------|------------|---------------------------|------------|-------------------|------------|
|                        | 1                    | 2          | 1                         | 2          | 1                 | 2          |
| МС 6/г (контроль)      | 1,1 ± 0,2            | 20,1 ± 0,5 | 1,7 ± 0,4                 | 23,7 ± 0,5 | 1,2 ± 0,3         | 21,2 ± 0,4 |
| 6-БАП 0,2 + НУК 0,5    | 4,3 ± 0,63           | 30,8 ± 0,5 | 6,0 ± 0,7                 | 34,5 ± 0,6 | 4,8 ± 0,5         | 32,3 ± 0,5 |
| 6-БАП 0,5 + НУК 1,0    | 7,6 ± 0,6            | 40,1 ± 0,6 | 9,1 ± 0,7                 | 45,6 ± 0,7 | 8,2 ± 0,4         | 42,3 ± 0,5 |
| 6-БАП 0,5 + ИУК 1,0    | 3,6 ± 0,4            | 30,1 ± 0,7 | 3,8 ± 0,5                 | 38,1 ± 0,5 | 3,5 ± 0,3         | 34,6 ± 0,4 |
| Кин 0,5 + НУК 1,0      | 5,1 ± 0,2            | 47,5 ± 0,6 | 6,2 ± 0,4                 | 52,9 ± 0,6 | 5,9 ± 0,3         | 49,1 ± 0,8 |
| Кин 0,5 + ИУК 2,0      | 2,7 ± 0,7            | 26,9 ± 0,4 | 3,2 ± 0,6                 | 29,8 ± 0,4 | 2,9 ± 0,4         | 27,5 ± 0,5 |

Примеч.: 1 – среднее число побегов на эксплант (шт.); 2 – средняя длина побега (мм).

Одновременно с пролиферацией побегов на чешуях микролуковиц наблюдали и элонгацию микропобегов. Максимальные показатели длины побега зафиксированы на питательной среде содержащей Кин 0,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л – 52,9 ± 0,6, 49,1 ± 0,8 и 47,5 ± 0,6 для *T. biebersteiniana*, *T. biflora* и *T. suaveolens* соответственно.

Таким образом, питательные среды, содержащие 6-БАП 0,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л и Кин 0,5 мг/л + НУК 1,0 мг/л являются оптимальными для ускоренного размножения дикорастущих видов тюльпанов в культуре *in vitro* путем прямого органогенеза.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Ахметова А. Ш., Миронова Л. Н.** Особенности размножения и регенерации тюльпанов *in vitro* // Бюл. Бот. сада СГУ, 2008. – №7. – С. 198–202.
- Баранова М. В.** Луковичные растения семейства Лилейных (география, биоморфологический анализ, выращивание). – СПб.: Наука, 1999. – 229 с.
- Бутенко Р. Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. учеб. пособие. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.
- Введенский А. И.** Флора СССР: Т. IV. / А. И. Введенский, Н. Ф. Гончаров, С. Г. Горшкова и др.; гл. ред. В. Л. Комаров // Флора СССР. – Л.: Изд-во АН СССР, 1935. – С. 320–464.
- Красная книга Волгоградской области, Т.2. Растения и другие организмы / под ред. О. Г. Барановой, В. А. Сагалаева. – Воронеж: ООО «Издат-Принт», 2017. – 268 с.**
- Красная книга Российской Федерации. Растения и грибы / отв. редактор: Д. В. Гельтман. – Москва: ВНИИ «Экология», 2024. – 944 с.**
- Крицкая Т. А., Кашин А. С., Касаткин М. Ю.** Микроразмножение и сомаклональная изменчивость *Tulipa suaveolens* (Liliaceae) *in vitro* // Онтогенез, 2019. – Т. 50, № 4. – С. 270–277. <https://doi.org/10.1134/S0475145019040049>
- Малаева Е. В.** Особенности культивирования *in vitro* редких видов семейства Iridaceae Juss. // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии, 2022. – № 21 (2). – С. 120–123. <https://doi.org/10.14258/pbssm.2022066>
- Молканова О. И., Горбунов Ю. Н., Ширнина И. В., Егорова Д. А.** Применение биотехнологических методов для сохранения генофонда редких видов растений // Бот. журн., 2020. – Т. 105, № 6. – С. 610–619. <https://doi.org/10.31857/S0006813620030072>
- Мордак Е. В.** Тюльпан – *Tulipa* L. // Флора Европейской части СССР. – Л.: Наука, 1979. – Т. IV. – С. 232–236.
- Набиева А. Ю., Елисафенко Т. В.** Особенности размножения редких сибирских видов рода *Iris* L. – *I. glaucescens* Bunge и *I. bloudowii* Ledeb. в условиях культуры // *Turczaninowia*, 2012. – Т. 15, № 1. – С. 80–84.
- Николаева М. Г., Разумова М. В., Гладкова В. Н.** Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 348 с.
- Самарская В. О., Малаева Е. В., Постнова М. В.** Аспекты клонального микроразмножения и сохранения растений *in vitro* // Природные системы и ресурсы, 2019. – Т. 9, № 3. – С. 13–22. <https://doi.org/10.15688/nsr.jvolsu.2019.3.2>
- Тихомирова Л. И.** Особенности морфогенеза *Iris sibirica* L. в культуре *in vitro* // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии: матер. восьмой междунар. научно-практ. конф. – Барнаул, 2009. – С. 364–369.
- Murashige T, Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*, 1962. – Vol. 15. – № 3. – P. 473–497.