

УДК 581.1

Башилов Антон Вячеславович,
кандидат биологических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник

Шутова Анна Геннадьевна,
кандидат биологических наук, доцент,
заведующая лабораторией
оранжерейных растений,

Седун Екатерина Анатольевна,
младший научный сотрудник

Войцеховская Елена Анатольевна
научный сотрудник

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»

Попова Ирина Викторовна,
ведущий научный сотрудник
НИИ Ботанический сад им. Э. Гареева НАН КР

Bashylau Anton,
PhD, Associate Professor, Leading Researcher,

Shutava Hanna,
PhD, Associate Professor, Head of Laboratory,

Siadun Katsiaryna,
Junior Researcher,

Voytsekhovskaya Yelena
Researcher,

Central Botanical Garden of the NAS of Belarus

Popova Irina
Leading Researcher,
Gareev Botanical Garden of NAS KR

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ К ПРОРАСТАНИЮ СЕМЯН И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *EX SITU* И *IN VITRO* ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРЕДСТАВИТЕЛЯ РОДА *ALLIUM L.* – *ALLIUM PSKEMENSE V. FEDTSCH*

Аннотация. Анализ процесса набухания выявил некоторые различия в кинетике у *A. pskemense* V.Fedtsch. от 2-х других представителей рода *Allium L.* – *A. aflatunense* V.Fedtsch. и *A. altissimum Regel*. Произведено введение в культуру *in vitro* растений *A. pskemense* V.Fedtsch. на среде Мурасиге и Скуга + 0,5 6-бензиламинопурина. Получена каллусная культура из корней на среде Мурасиге и Скуга с добавлением 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксисукусной кислоты, 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина и 30 г/л сахарозы. Срок образования каллуса – около 3 месяцев.

Ключевые слова: *Allium L.*, *A. pskemense* V.Fedtsch., *ex situ*, *in vitro*.

***ALLIUM L.* – *ALLIUM PSKEMENSE* B. FEDTSCH ТУКУМУНУН *EX SITU*
ЖАНА *IN VITRO* ПЕРСПЕКТИВДҮҮ ТҮРҮН КУЛЬТИВАЦИЯЛОО
ЖАНА УРУКТАРДЫН ӨСҮҮ ЖӨНДӨМДҮҮЛҮГҮН БААЛОО**

Аннотация. Көбүү процессинин анализи негизинде *A. pskemense* B. Fedtsch *Allium L.* тукумунун башка 2 өкүлүнөн *A. aflatunense* B. Fedtsch. жана *A. altissimum* Regel кинетикасынын кээ бир айырмачылыктары аныкталды. *A. pskemense* B. Fedtsch өсүмдүгү *in vitro* культуурасына Мурасиге и Скуга + 0,5 6-бензиламинопурина чөйрөсүнүн негизинде киргизилди. Мурасиге и Скуга чөйрөлөрүндө 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксустук кислотасын, 0,2 мг/л 6-бензиламинопурин жана 30 г/л сахароза кошуу менен тамырларынан каллустук культура алынды. Каллустун пайда болуу мөөнөтү – 3 айга жакын.

Негизги сөздөр: *Allium L.*, *A. pskemense* B. Fedtsch., *ex situ*, *in vitro*.

**EVALUATION OF SEED GERMINATION ABILITY AND *EX SITU* AND
IN VITRO CULTIVATION OF A PROMISING REPRESENTATIVE OF THE GENUS
ALLIUM L. – *ALLIUM PSKEMENSE* B. FEDTSCH.**

Abstract. Analysis of the swelling process revealed some differences in the kinetics in *A. pskemense* B. Fedtsch. from 2 other representatives of the genus *Allium L.* – *A. aflatunense* B. Fedtsch. and *A. altissimum* Regel. *A. pskemense* B. Fedtsch plants were introduced into *in vitro* culture on Murashige and Skoog + 0.5 6-benzylaminopurine medium. Callus culture obtained from the roots on Murashige and Skoog medium with the addition of 1.0 mg/l of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 0.2 mg/l of 6-benzylaminopurine and 30 g/l of sucrose. The period of callus formation is about 3 months.

Keywords: *Allium L.*, *A. pskemense* B. Fedtsch., *ex situ*, *in vitro*.

Ботанические сады являются центрами сохранения мировой флоры сохраняя ее *ex situ* и *in vitro*. *Allium L.* относится к числу крупнейших родов растений. По современным данным, он объединяет до 800-та видов распространенных в Северном полушарии. В роде *Allium L.* довольно много редких видов – эндемиков и реликтов [1, 2].

Allium pskemense B. Fedtsch. (лук пскемский) – многолетнее корневищно-луковичное растение. *A. pskemense* B. Fedtsch. – ксерофит с периодом летнего относительного покоя. В природе он приурочен к недостаточно увлажненным областям степных и луговых ценозов низко- и среднегорий. Впервые обнаружен в бассейне реки

Пскем. Произрастает только в Западном Тянь-Шане по рекам Аксу, Угем, Пскем и их протокам, встречается в трещинах скал, на каменистых осыпях и обнажениях. Встречается в разнотравных сообществах, очень редко образует на небольших участках раз-

нотравно-луковую, луково-феруловую и луково-шиповниковую ассоциации. Длинные толстые корни позволяют растению надежно закрепиться в расщелинах скал, предохраняя розетку листьев от смыва ливнями и сноса сильными ветрами. Шнуровидные корни обладают большой сосущей силой. Само растение очень холодостойкое, луковицы способны промерзнуть и сохраняться жизнеспособными в замороженном состоянии благодаря высокому содержанию сухих веществ [1, 3].

A. pskemense B. Fedtsch. – узкий эндемик Западного Тянь-Шаня, занесен в Красную книгу Казахстана, Узбекистана, Кыргызстана к числу находящихся на грани исчезновения.

Численность вида по всему ареалу быстро сокращается, сохранился лишь в самых труднодоступных местах.

Луковицы *A. pskemense* B. Fedtsch. удлиненно-яйцевидные, толщиной 4–6 см, с

красно-бурыми, тонкокожистыми цельными оболочками. Стебель мощный, 40–80 см высоты, полый, с плавным вздутием в средней части. Листья в числе 3–4 цилиндрические, сужающиеся к вершине, дудчатые, прямые, 2–3 см толщины, в 2 раза короче стебля. Чехол приблизительно равен зонти-

ку, зонтик шаровидный, густой, многоцветковый. Листочки звездчатого околоцветника белые с мало заметной жилкой, около 6 мм длины, равные, продолговатые, тупые. Нити тычинок немного длиннее листочков околоцветника. Коробочка шаровидно-трехгранная (рисунок 1) [1].



Рисунок 1. Габитус *A. pskemense* В. Fedtsch. [4].

Ежегодно *A. pskemense* В. Fedtsch. наращивает хорошую вегетативную массу. В течение вегетационного сезона можно делать 3–4 срезки. Важным свойством является его устойчивость к поражению мучнистой росой. Цветет в июле, в течение 3 недель. Численность популяции *A. pskemense* В. Fedtsch. лимитирована орографией, абиотическими и антропогенными факторами. Его используют в качестве пряности в национальной кухне народов Средней Азии, относя к группе острых луков [3, 5].

Пищевая ценность *A. pskemense* В. Fedtsch. обусловлена: аскорбиновой кислотой (19,2–32,6 мг%), каротином (14,9–26,1 мг%), флавоноидами (251–325 мг%), гидроксикоричными кислотами (155–194 мг%) и др. [6].

Цель настоящей работы: оценить способность к прорастанию семян и культивированию *ex situ* и *in vitro*, инициировать каллусогенез перспективного представителя рода *Allium* L. – *A. pskemense* В. Fedtsch.

Материалы и методы исследования.

Исследования проводили на базе отдела биохимии и биотехнологии ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» (г. Минск, Беларусь).

В качестве объекта исследования использовали семена *A. pskemense* В. Fedtsch., *A. aflatumense* В. Fedtsch. и *A. altissimum* Regel переданные НИИ «Ботанический сад им. Э.З. Гареева» Национальной академии наук Кыргызской Республики.

Оценка способности к прорастанию: семена на влажной фильтровальной бумаге помещали на 60 дней в воздушный термостат «ХТ 3/70» при температуре 50°C в темноте. Проростки *A. pskemense* В. Fedtsch. высаживали в грунт (3:1 вермикулит – поликомпонентный субстрат (разработан Институтом экспериментальной ботаники НАН Беларуси) в контролируемых условиях. В июне растения высажены в открытый грунт участка ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси».

Кинетика набухания: семена помещали в мерные стаканы и наливали по 50 мл дистиллированной воды. Стаканы плотно закрывали алюминиевой фольгой и выдерживали при различных временных промежутках. Регистрацию кинетики набухания проводили путем определения количества поглощенной семенами воды путем взвешивания семян через определенные промежутки времени на аналитических весах (Ohaus, E12140). При этом с семян удаляли влагу с помощью фильтровальной бумаги.

Введение в культуру *in vitro*: для набухания семена помещали в дистиллированную воду на 30 минут. Обработывали в 2%-ом растворе хозяйственного 72%-го мыла в течение 10 минут. Далее отмывали дважды по 5 минут в дистиллированной воде и переносили в стерильные условия – ламинар-бокса (ТУ ВУ 101148500.21-2008). Семена помещали на 15 минут в 0,01% раствор фунгицида «Прозаро» (действующие вещества: протиоконазол и тебуконазол). После чего отмывали дважды по 5 минут в стерильной дистиллированной воде. Далее семена переносили в 0,1% раствор нитрата серебра на 10 минут. Затем отмывали в стерильной дистиллированной воде дважды по 5 минут и переносили на питательную среду. Семенной материал помещали на питательную среду, базисом для которой являлась среда Woody Plant Medium [7]. В качестве уплотняющего вещества использовали растительный агар (Duchefa) в концентрации 6,5 г/л. Величина рН до автоклавирова-

ния составляла 5,6–5,8. Условия культивирования: температура 25°C, освещенность 3000 Лк, фотопериод 16 часов.

Опыты проводили в трехкратной повторности. В работе обсуждаются различия, достоверные при 95%-ном уровне значимости.

Результаты и их обсуждение. Одна из наиболее значительных проблем при культивировании *A. pskemense* В. Fedtsch. – воспроизводство из семенного материала. Считается, что в природных условиях семена подвергаются естественной многоступенчатой стратификации, что облегчает процесс прорастания. Однако процесс прорастания имеет много аспектов, в том числе, семена различаются по степени и скорости набухания.

Предварительно нами были проведены исследования по характеристике процесса набухания семян. Известно, что кинетика набухания семян лимитирует процесс их пробуждения и прорастания [8]. Для сравнения кроме образцов *A. pskemense* В. Fedtsch. были использованы *A. aflatumense* В. Fedtsch. и *A. altissimum* Regel. На рисунке 2 представлены данные по увеличению массы при набухании семян луков, откуда видно, что *A. pskemense* В. Fedtsch. отличается медленным постепенным изменением массы, которое продолжалось до конца вторых суток эксперимента. Это отличало его от *A. aflatumense* В. Fedtsch., который на вторые сутки достиг максимальной величины увеличения массы семян за счет набухания.

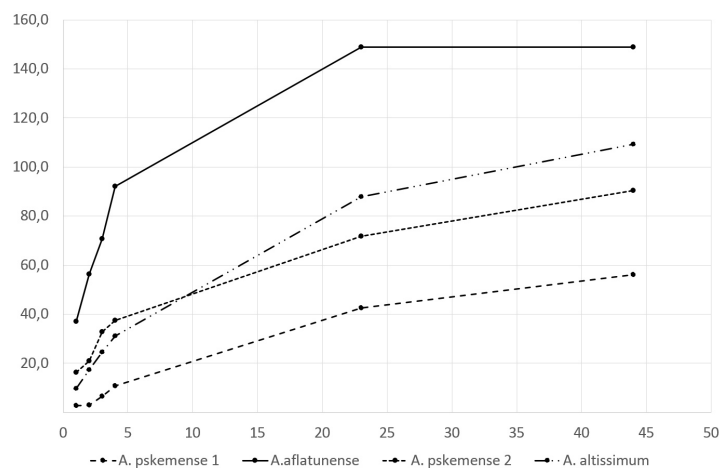


Рисунок 2. Кинетика набухания семян. Изменение массы, % от исходной при набухании семян луков (по оси абсцисс – время, ч)

Кривая зависимости увеличения массы от времени для *A. aflatumense* В. Fedtsch. имела характерный быстрый начальный участок, который обусловлен поглощением воды покровной тканью семян и веществом зародыша, которые играют роль входных каналов для последующего проникновения воды в эндосперм, составляющий основную массу вещества семян. Данный участок для *A. pskemense* В. Fedtsch. имел явные отличия: на первом этапе (до 2 часов) наблюдалось замедленное поглощение воды покровами семени, и лишь потом поглощение воды увеличивалось. В то же время, *A. aflatumense* В. Fedtsch. обладал сходной с *A. pskemense* В. Fedtsch. кинетикой набухания.

При введении в культуру *in vitro* семенной материал должен быть свободен от грибной и бактериальной инфекции. Выбранная схема обработки семян стерилизующими агентами позволила достигнуть 100%-ой стерильности эксплантов.

Спустя 28 дней культивирования на питательной среде прорастание семян не наблюдалось. С целью активации ростовых процессов была применена методика стратификации (60 дней экспозиции при 4°C) после которой чашки Петри с семенами помещали в исходные условия (16/8 фотопериод, 25°C, освещение 300 Лк). На 4-ый день после изменения условий культивирования наблюдалось прорастание семян в условиях *in vitro* (рисунок 3).

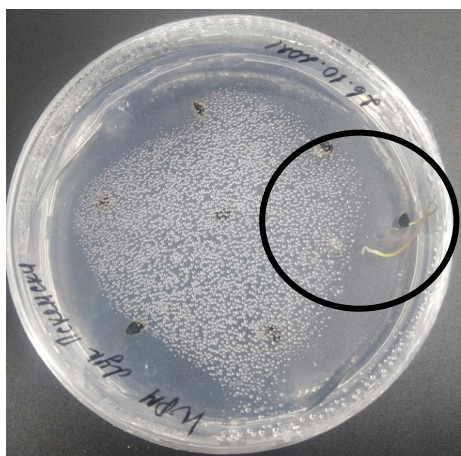


Рисунок 3. Прорастание семян *A. pskemense* В. Fedtsch. в условиях *in vitro*

Проростки субкультивировали через 15 суток на модифицированной питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга с добавлени-

ем 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина и 15 г/л сахарозы. Таким образом была получена устойчивая культура *in vitro* *A. pskemense* В. Fedtsch. (рисунок 4).

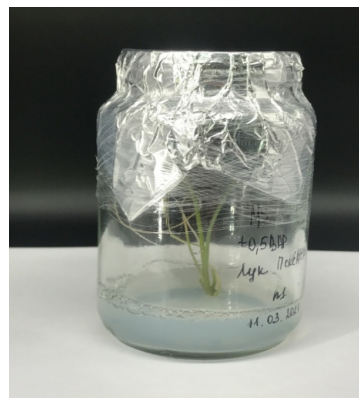
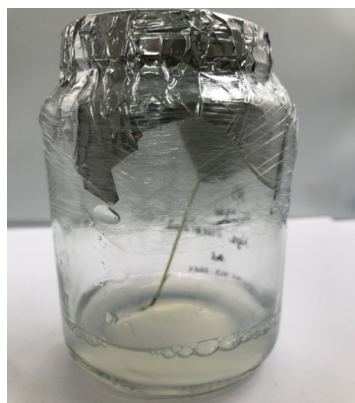


Рисунок 4. *A. pskemense* В. Fedtsch. спустя 2 недели и 3 месяца культивирования *in vitro*

Для получения каллусной культуры в качестве первичных эксплантов использовали высежки из листовой пластины и корня, которые были перенесены на каллусогенные среды содержащие минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга с добавлением 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина и 30 г/л сахарозы. Условия культивирования: термостат, темнота, 25°C.

Спустя 3 месяца культивирования каллусогенез наблюдали лишь у 15% от общего числа эксплантов из корня. У эксплантов из листовой пластины на 3-м месяце культивирования не отмечалась инициация каллусогенеза (рисунок 5). В целом следует констатировать, что и микрочеренки, а также каллус в культуре *in vitro* у *A. pskemense* V.Fedtsch. обладают низкой скоростью роста.

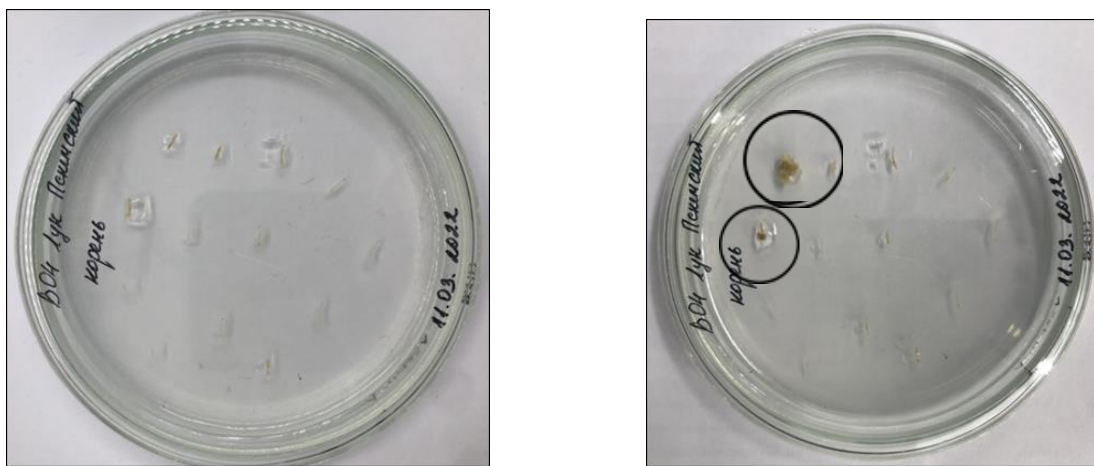


Рисунок 5. Каллусная культура *in vitro* из частей корня *A. pskemense* V. Fedtsch. на начало (слева) пассажа и спустя 3 месяца (справа) культивирования.

Параллельно введению в культуру *in vitro* проростки *A. pskemense* V.Fedtsch. были высажены сначала на искусственный субстрат при светодиодном освещении (на

3 месяца (DSL 26-01-RC-01, 1800 Лм) и затем, после окончания заморозков в грунт (первая декада июня) (рисунок 6).



Рисунок 6. *A. pskemense* V.Fedtsch. в условиях открытого грунта (вторая декада июля)

Выводы. Анализ процесса набухания выявил некоторые различия в кинетике этого процесса у *A. pskemense* V.Fedtsch. от 2-х других представителей рода *Allium* L. – *A. aflatunense* V.Fedtsch. и *A. altissimum* Regel.

Произведено введение в культуру *in vitro* растений *A. pskemense* V.Fedtsch. на среду Мурасиге и Скуга + 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина. Однако на этой среде стерильная культура *A. pskemense* V. Fedtsch., отличалась невысокой скоростью роста, по-

этому целесообразным является оптимизация среды культивирования для обеспечения массового получения микрочеренков и саженцев.

Получена каллусная культура из корней на среде Мурасиге и Скуга с добавлением 1,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина и 30 г/л сахарозы. Срок образования каллуса достаточно длительный – около 3 месяцев.

Литература

1. Тухватуллина Л.А. Редкий вид Средней Азии лук пскемский в Южно-Уральском ботаническом саду / Л.А. Тухватуллина // Известия Уфимского научного центра РАН – 2018. – № 4. – С. 95–99.
2. Попова И.В., Малосиева Г.В., Кенжебаева Н.В. Редкие и охраняемые растения природной флоры Кыргызстана в ботаническом саду им. Э.З. Гареева НАН КР / И.В.Попова, Г.В.Малосиева, Н.В.Кенжебаева // Известия НАН КР – 2018. – № 6. – С. 93–97.
3. Пратов У.П., Юлдашев А.С. Лук пскемский-эндемичный дикий сородич культурного лука / У.П. Пратов, А.С. Юлдашев // Материалы Республиканской научно-практической конференции «Сохранение и утойчивое использование биоразнообразия сельскохозяйственных культур и их диких сородичей», Ташкент, 12 ноября 2009 г. / Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан; редкол.: С.К. Бабоев, [и др.] – Ташкент: Институт генетики и экспериментальной биологии растений Академии Наук Республики Узбекистан. 2009. – С. 50–53. 4. www.plantarium.ru
5. Ключиков Е.В., Терентьева Е.И., Украинская У.А. Перспективные пищевые и декоративные дикорастущие луки в культуре ботанического сада МГУ им. М.В. Ломоносова / Е.В. Ключиков, Е.И. Терентьева, У.А. Украинская // Плодоводство и ягодоводство России – 2017. – Т. L. – С. 155–160.
6. Бухаров А.Ф., Иванова М.И., Степанюк Н.В., [и др.] урожайность и качество продукции лука ошанина (*Allium oschaninii* O. Fedtsch.) и лука пскемского (*Allium pskemense* V. Fedtsch.) при выращивании в центральном регионе / А.Ф. Бухаров, М.И. Иванова, Н.В. Степанюк, [и др.] // Овощи России – 2018. – № 3 (41). – С. 32–35.
7. McCown B.H., Lloyd G. Woody Plant Medium (WPM) – A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species / B.H. McCown, G. Lloyd // HortScience – №. 16. – P. 453.
8. Холманский А.С., Сидоренко А.С. Зависимость кинетики набухания семян от температуры / А.С. Холманский, А.С. Сидоренко // Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал – 2008. – Т. 7. – №. 1.