

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА СОЦВЕТИЙ ЧЕСНОКА (*ALLIUM SATIVUM* L.) *IN VITRO*

✉ Азопкова М.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт овощеводства –
филиал Федерального научного центра овощеводства
Московская область, дер. Верея, Россия

✉ e-mail: tixanish@mail.ru

С целью расширения генетического разнообразия чеснока озимого (*Allium sativum* L.) изучена возможность использования *in vitro* технологии получения соматоклональных вариантов каллусной культуры. Представлены результаты исследования эффективности каллусогенеза соцветий чеснока озимого сорта Гладиатор в зависимости от возраста экспланта (7, 14 и 21 сут с момента выхода соцветий из листовых пазух) и сочетания регуляторов роста (2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в концентрациях 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 мг/л и кинетина в концентрациях 0,25; 0,5; 1,0 мг/л). Установлено, что ступенчатая стерилизация материала, основанная на последовательной обработке стерилизующими растворами, позволяет получать 92–98% стерильных эксплантов. У соцветий чеснока раннего возраста первые признаки начала каллусогенеза отмечены на 35-е сутки культивирования, а у соцветий в возрасте 21 сут – на 50-е. Зафиксировано образование каллуса из основания соцветий при добавлении в питательную среду 0,5; 1,0 и 2,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и кинетина в изучаемых концентрациях. Наиболее интенсивное каллусообразование выявлено у 7-суточных эксплантов на питательной среде Мурасига – Скуга, обогащенной 2,0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, а также 0,5 и 1,0 мг/л кинетина. При этом доля эксплантов с каллусом составила 94 и 96% соответственно. Каллусообразование из основания соцветий в возрасте 14 и 21 сут при использовании этих вариантов питательной среды наблюдалось у 44 и 22% эксплантов соответственно.

Ключевые слова: чеснок озимый (*Allium sativum* L.), *in vitro*, эксплант, каллус, регулятор роста

INDUCTION OF GARLIC (*ALLIUM SATIVUM* L.) INFLORESCENCE CALLUSOGENESIS *IN VITRO*

✉ Azopkova M.A.

All-Russian Research Institute of Vegetable Growing –
Branch of the Federal Scientific Center of Vegetable Growing
Vereya, Moscow region, Russia

✉ e-mail: tixanish@mail.ru

In order to expand the genetic diversity of winter garlic (*Allium sativum* L.), the possibility of using *in vitro* technology to obtain somaclonal variants of a callus culture was studied. The results of the study of the efficiency of inflorescences callusogenesis of winter garlic cultivar ladiator depending on the explant age (7, 14 and 21 days from the moment when inflorescences emerge from the leaf axils) and the combination of the growth regulators (2,4-dichlorophenoxyacetic acid in concentrations 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/l and kinetin in concentrations 0,25; 0,5; 1,0 mg/l) are presented. It was found that stepwise sterilization of the material, based on sequential treatment with sterilizing solutions, allows obtaining 92-98% sterile explants. The first signs of the beginning of callusogenesis were observed in early garlic inflorescences on the 35th day of cultivation, and in the inflorescences aged 21 days - on the 50th day. Callus formation from the base of inflorescences was recorded when 0.5; 1.0 and 2.0 mg/L of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin were added to the nutrient medium at the concentrations studied. The most intensive callus formation was detected in 7-day-old explants on the Murashige - Skoog nutrient medium enriched with 2.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.5 and 1.0 mg/L kinetin. The proportion of explants with callus was 94% and 96%, respectively. Callus formation from the base of inflorescences at 14 and 21 days of age using these nutrient media options was observed in 44 and 22% of explants, respectively.

Keywords: winter garlic (*Allium sativum* L.), *in vitro*, explant, callus, growth regulator

Для цитирования: Азопкова М.А. Индукция каллусогенеза соцветий чеснока (*Allium sativum* L.) *in vitro* // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2023. Т. 53. № 2. С. 43–47. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-2-5>

For citation: Azopkova M.A. Induction of garlic (*Allium sativum* L.) inflorescence callusogenesis *in vitro*. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki* = *Siberian Herald of Agricultural Science*, 2023, vol. 53, no. 2, pp. 43–47. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-2-5>

Конфликт интересов

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

Благодарность

Автор выражает благодарность научному руководителю доктору биологических наук, профессору А.В. Полякову за помощь в проведении исследований.

Acknowledgements

The author is grateful to the supervisor Doctor of Biological Sciences, Professor A.V. Polyakov for help with the research.

ВВЕДЕНИЕ

Чеснок посевной (*Allium sativum* L.), относящийся к семейству Амариллисовые (Amaryllidaceae) и подсемейству Луковые (Allioideae, Alliaceae), является ценной овощной и лекарственной культурой, широко применяемой в питании человека и фармацевтической промышленности. В нем содержатся витамины, биологически активные вещества: флавоноиды, стероидные сапонины и др.¹ Чеснок характеризуется хорошо развитыми бактерицидными и антиоксидантными свойствами², способностью накапливать высокие концентрации таких эссенциальных элементов, как селен³ [1] и германий⁴.

Для размножения чеснока в основном используют зубки. В этом случае скрытые болезни передаются потомству, приводя к его быстрому вырождению. Ввиду отсутствия у чеснока семенного размножения нет воз-

можности расширить генетическое разнообразие данной культуры традиционными методами селекции.

Однако современные биотехнологические методы позволяют получить в культуре *in vitro* генотипы, являющиеся ценным исходным материалом для селекции. Перспективными считаются следующие направления: продуцирование соматоклональных вариантов, клеточная селекция и мутагенез *in vitro*.

Известны способы получения морфогенного каллуса чеснока из базальной части зубка [2], кончиков корней⁵⁻⁷ [3, 4], апикальных меристем [2, 3, 5], стеблевых и листовых дисков⁸ [6, 7].

Основная цель исследования – подбор оптимального сочетания факторов (возраст экспланта, концентрация регуляторов роста), обеспечивающих получение каллусных тканей чеснока озимого сорта Гладиатор в культуре *in vitro*.

¹Пивоваров В.Ф., Ершов И.И., Агафонов А.Ф. Луковые культуры: монография. М., 2001. 500 с.

²Зеленков В.Н., Лапин А.А., Поляков А.В. Суммарная антиоксидантная активность чеснока озимого отечественной и зарубежной селекции // Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты: сб. науч. тр. М., 2016. Вып. 23. С. 69–72.

³Голубкина Н.А., Никульшин В.П., Хрынина Ю.А. Особенности внекорневого способа обогащения растений чеснока селеном // Сельскохозяйственная биология. 2007. № 1. С. 82–85.

⁴Поляков А.В., Алексеева Т.В. Чеснок (*Allium sativum* L.) как источник органического германия // Горизонты науки и образования: сб. материалов междунар. науч.-практ. конф. Алматы, 2018. С. 80–83.

⁵Martin-Urdiroz N., Garrido-Gala J., Martin J., Barandaran X. Effect of light on the organogenic ability of garlic roots using a one step *in vitro* system // Plant Cell Reports. 2004. N 22 (10). P. 721–724.

⁶Zheng Si Jun, Heinken B., Krens F.A., Kik C., Zheng S.J. The development of an efficient cultivar-independent plant regeneration system from callus derived from both apical and non-apical root segments of garlic (*Allium sativum* L.) // *In vitro* Cellular and Developmental Biology-Plant. 2003. N 30 (3). P. 288–292.

⁷Khan N., Alam M.S., Nath U.K. *In vitro* regeneration of garlic through callus culture // Journal of Biological Sciences. 2004. N 4 (2). P. 189–191.

⁸Haque M.S., Wada T., Hattori K., Plas L.H.W., Klerl G.J. Garlic roots for micropropagation through *in vitro* bulblet formation // Proc. the XXV International Horticultural Congress. Brussels, 2000. Part 10: Application of biotechnology and molecular biology and breeding, *in vitro* culture. P. 45–52.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент проведен в отделе биотехнологии и инновационных проектов Всероссийского научно-исследовательского института овощеводства – филиала Федерального научного центра овощеводства в 2019–2021 гг.

Материалом для исследований послужили соцветия чеснока озимого сорта Гладиатор, изолированные на 7, 14 и 21-е сутки после их выхода из пазух листьев.

Сорт Гладиатор включен в Госреестр Российской Федерации с 2011 г., характеризуется как среднеспелый (длина вегетационного периода 90–98 сут), стрелкующийся, отличающийся высокой зимостойкостью, лежкоспособностью и урожайностью [8].

Для введения в *in vitro* применяли ступенчатую стерилизацию. Соцветия промывали 30–60 мин в 10%-м мыльном растворе, 15–20 мин в 0,1%-м растворе марганцовокислого калия, затем 30 с в 70%-м растворе этанола. Далее стерилизовали в 1,0%-м растворе гипохлорита натрия в течение 20 мин, после чего трижды промывали стерильной водой⁹ [9].

Экспланты культивировали на питательной среде Мурасига – Скуга (MS)¹⁰, обогащенной 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д) и кинетином, концентрации которых представлены в табл. 1. Другие характеристики исследования: постоянная температура 20 °С, освещенность 5000 лк и 16/8-часовой фотопериод.

Статистическую обработку экспериментальных данных осуществляли с помощью программного пакета Microsoft Office Excel. Учет проводили каждые 7 сут после введения регуляторов роста в культуру.

Табл. 1. Концентрация регуляторов роста, мг/л
Table 1. Growth regulator concentration, mg/l

2,4-Д	Кинетин			
	0	0,25	0,5	1,0
0,25	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+
1,0	+	+	+	+
2,0	+	+	+	+

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе исследований установлено, что не во всех изученных вариантах происходило образование каллуса из основания соцветия. Кроме того, в зависимости от возраста экспланта наблюдались некоторые особенности протекания процесса.

У соцветий раннего возраста первые признаки начала каллусогенеза были отмечены на 35-е сутки культивирования, а у соцветий в возрасте 21 сут – на 50-е. При культивировании соцветий чеснока, изолированных на 7-е сутки с момента выхода стрелки, на питательной среде (обогащена 2,4-Д и кинетином в концентрациях 2,0; 0,5 и 1,0 мг/л соответственно) доля каллусогенных эксплантов составила 94 и 96% соответственно (см. табл. 2).

Табл. 2. Доля каллусогенных эксплантов, % ± 2Sp (n = 100)

Table 2. Proportion of garlic callus explants, % ± 2Sp (n = 100)

2,4-Д, мг/л	Кинетин, мг/л	Возраст эксплантов, сут		
		7	14	21
0,25	0	0	0	0
	0,25	0	0	0
	0,5	0	13,0 ± 6,7	0
	1,0	0	13,0 ± 6,7	0
0,5	0	0	13,0 ± 6,7	0
	0,25	10,0 ± 6,0	12,0 ± 4,6	7,0 ± 5,1
	0,5	12,0 ± 4,6	13,0 ± 6,7	12,0 ± 4,6
	1,0	14,0 ± 6,8	14,0 ± 6,8	12,0 ± 4,6
1,0	0	12,0 ± 4,6	15,0 ± 7,0	13,0 ± 6,7
	0,25	16,0 ± 7,3	26,0 ± 8,8	12,0 ± 4,6
	0,5	30,0 ± 9,1	27,0 ± 8,9	13,0 ± 6,7
	1,0	32,0 ± 9,3	29,0 ± 9,1	14,0 ± 6,8
2,0	0	56,0 ± 9,8	33,0 ± 9,0	21,0 ± 8,0
	0,25	58,0 ± 9,8	33,0 ± 9,0	22,0 ± 8,2
	0,5	94,0 ± 4,7	44,0 ± 9,9	22,0 ± 8,2
	1,0	96,0 ± 3,9	40,0 ± 9,8	22,0 ± 8,2

⁹Поляков А.В., Азопкова М.А., Муравьева И.В. Получение *in vitro* посадочного материала чеснока озимого (*Allium sativum* L.): метод. руководство. М., 2018. 12 с.

¹⁰Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiologia Plantarum*. 1962. Vol. 15. N 13. P. 473–497.

При культивировании эксплантов на питательной среде, содержащей 0,25 мг/л 2,4-Д, не было отмечено образование каллуса.

При культивировании соцветий чеснока в возрасте 7 сут на питательной среде, содержащей 0,5 мг/л 2,4-Д и кинетин в изучаемых концентрациях, доля каллусогенных эксплантов варьировала на уровне 10–14%.

Доля каллусогенных эксплантов, культивируемых на питательной среде, содержащей 1,0 мг/л 2,4-Д, составила 12–32% в зависимости от концентрации кинетина.

Наибольшее количество каллусогенных эксплантов (44 и 40%) зафиксировано при культивировании соцветий чеснока озимого в возрасте 14 сут на питательной среде, содержащей 2,4-Д в концентрации 2,0 мг/л и кинетин в концентрации 0,5 и 1,0 мг/л соответственно.

В процессе культивирования 14-суточных соцветий чеснока на питательной среде, содержащей 0,25–1,0 мг/л кинетина и 1,0 мг/л 2,4-Д, наблюдали образование каллуса у 26,0–27,0% эксплантов; 0,25–1,0 мг/л кинетина и 0,5 мг/л 2,4-Д – у 12,0–14,0%; 0,5 и 1,0 мг/л кинетина и 0,25 мг/л 2,4-Д – у 13,0%.

При культивировании соцветий чеснока в возрасте 21 сут на питательной среде, обогащенной регуляторами роста в изучаемых концентрациях, зафиксировано угнетение эксплантов во всех вариантах, представленных в табл. 2. На питательной среде, содержащей кинетин в заданных концентрациях и 0,25 мг/л 2,4-Д, каллусообразование не отмечено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследований по выявлению концентрации регуляторов роста и возраста экспланта, оптимальных для индукции каллусогенеза чеснока озимого, установлено, что наибольшей каллусогенной способностью (94–96%) обладают соцветия в возрасте 7 сут с момента выхода стрелки из листовых пазух; при культивировании на питательной среде MS, обогащенной 2,0 мг/л 2,4-Д, а также 0,5 и 1,0 мг/л кинетина, начало образования каллуса происходит на 10–15 сут раньше, чем у эксплантов в возрасте 14 и 21 сут.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Середин Т.М., Агафонов А.Ф., Герасимова Л.И., Солдатенко А.В., Кривенков Л.В. Селекция чеснока озимого на качество продукции: монография. 2-е изд., доп. Омск: Издательский центр КАН, 2020. 115 с.
2. Hassan M.N., Haque M.S., Hassan M.M., Haque M.S. An efficient protocol for somatic embryogenesis of garlic (*Allium sativum* L.) using root tip as explant // Journal of the Bangladesh Agricultural University. 2014. N 12 (1). P. 1–6. DOI: 10.3329/jbau.v12i1.20747.
3. Metwally E.I., Denary M.E., Dewir Y.H., Naidoo Y. *In vitro* propagation of garlic through adventitious shoot regeneration // African Journal of Biotechnology. 2014. N 13 (38). P. 3892–3900. DOI: 10.5897/AJB2014.13931.
4. Khan N., Chaudhary M.F., Abbasi A.M., Khan S.A., Nazir A. et al. Development of an efficient callus derived regeneration system for garlic (*Allium sativum* L.) from root explants // Journal of Plant Breeding and Agriculture. 2017. Vol. 1. N 1. P. 1–12.
5. Скорина В.В., Берговина И.Г., Никонович Т.В. Оптимизация условий регенерации растений озимого чеснока (*Allium sativum* L.) в культуре *in vitro* // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. 2010. № 1. С. 67–72.
6. Mehta J., Sharma A., Sharma N., Megwal S., Sharma G., Gehlot P. et al. An improved method for callus culture and *in vitro* propagation of garlic (*Allium sativum* L.) // International Journal of Pure and Applied Bioscience. 2013. N 1 (1). P. 1–6.
7. Sayed R.H., Mohammad R.H., Shanjida R., Shirin S., Tamanna Q., Moutoshi C., Aunamika H., Md Hasan S., Md Ashraf H. *In vitro* plantlet regeneration of four local garlic (*Allium sativum* L.) Accessions of Bangladesh // British Biotechnology Journal. 2015. N 3. P. 1–12. DOI: 10.9734/BBJ/2015/18619.
8. Поляков А.В. Гладиатор – новый сорт чеснока озимого // Картофель и овощи. 2013. № 9. С. 31–33.
9. Поляков А.В., Азопкова М.А., Лебедева Н.Н., Муравьева И.В. Регенерация растений чеснока озимого (*Allium sativum* L.) *in vitro* из воздушных луковичек // Овощи России. 2018. № 4. С. 20–25. DOI: 10.18619/2072-9146-2018-4-20-25.

REFERENCES

1. Seredin T.M., Agafonov A.F., Gerasimova L.I., Soldatenko A.V., Krivenkov L.V. *Selection of winter garlic for product quality*. Omsk: Izdatel'skii tsentr KAN, 2020, 115 p. (In Russian).
2. Hassan M.N., Haque M.S., Hassan M.M., Haque M.S. An efficient protocol for somatic embryogenesis of garlic (*Allium sativum* L.) using root tip as explant. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*, 2014, no. 12 (1), pp. 1–6. DOI: 10.3329/jbau.v12i1.20747.
3. Metwally E.I., Denary M.E., Dewir Y.H., Naidoo Y. *In vitro* propagation of garlic through adventitious shoot regeneration. *African Journal of Biotechnology*, 2014, no. 13 (38), pp. 3892–3900. DOI: 10.5897/AJB2014.13931.
4. Khan N., Chaudhary M.F., Abbasi A.M., Khan S.A., Nazir A. et al. Development of an efficient callus derived regeneration system for garlic (*Allium sativum* L.) from root explant. *Journal of Plant Breeding and Agriculture*, 2017, vol. 1, no. 1, pp. 1–12.
5. Skorina V.V., Bergovina I.G., Nikonovich T.V. Optimization of the conditions of regeneration of winter garlic plants (*Allium sativum* L.) in culture *in vitro*. *Vestnik Belorusskoi gosudarstvennoi sel'skokhozyaistvennoi akademii = Bulletin of the Belarusian State Agricultural Academy*, 2010, no. 1, pp. 67–72. (In Russian).
6. Mehta J., Sharma A., Sharma N., Megwal S., Sharma G., Gehlot P. et al. An improved method for callus culture and *in vitro* propagation of garlic (*Allium sativum* L.). *International Journal of Pure and Applied Bioscience*, 2013, no. 1 (1), pp. 1–6.
7. Sayed R.H., Mohammad R.H., Shanjida R., Shirin S., Tamanna Q., Moutoshi C., Aunamika H., Md Hasan S., Md Ashraf H. *In vitro* plantlet regeneration of four local garlic (*Allium sativum* L.) Accessions of Bangladesh. *British Biotechnology Journal*, 2015, no. 3, pp. 1–12. DOI: 10.9734/BBJ/2015/18619.
8. Polyakov A.V. Gladiator – a new variety of winter garlic. *Kartofel' i ovoshchi = Potatoes and vegetables*, 2013, no. 9, pp. 31–33. (In Russian).
9. Polyakov A.V., Azopkova M.A., Lebedeva N.N., Murav'eva I.V. Regeneration of winter garlic plants (*Allium sativum* L.) *in vitro* from bulbils. *Ovoshchi Rossii = Vegetable Crops of Russia*, 2018, no. 4, pp. 20–25. (In Russian). DOI: 10.18619/2072-9146-2018-4-20-25.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ

✉ **Азопкова М.А.**, кандидат сельскохозяйственных наук, научный сотрудник; **адрес для переписки:** Россия, 140153, Московская область, дер. Верея, строение 500; e-mail: tixanish@mail.ru

AUTHOR INFORMATION

✉ **Marina A. Azopkova**, Candidate of Science in Agriculture, Researcher; **address:** 500, Vereya vil., Moscow Region, 140153, Russia; e-mail: tixanish@mail.ru

Дата поступления статьи / Received by the editors 13.05.2022
Дата принятия к публикации / Accepted for publication 01.08.2022
Дата публикации / Published 20.03.2023