

УДК 581.143.6:582.475

Влияние тидиазурона на морфогенез *Picea pungens* в культуре *in vitro*

Effect of thidiazuron on morphogenesis of *Picea pungens* *in vitro*

Несмелова Л. С., Железниченко Т. В., Воронкова М. С., Мурасева Д. С.

Nesmelova L. A., Zheleznichenko T. V., Voronkova M. S., Muraseva D. S.

ФГБУН «Центральный сибирский ботанический сад СО РАН», г. Новосибирск, Россия
E-mail: liliya-akitova2013@yandex.ru; bmc_87@mail.ru; zhelez05@mail.ru; dinarakulkhanova@yandex.ru

Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Реферат. Выявлены особенности морфогенеза ели голубой (*Picea pungens* Engelm.) в культуре *in vitro* под действием тидиазурона. Установлено, что при культивировании зрелых зиготических зародышей на свету с тидиазуроном протекают процессы непрямо́й регенерации, т.е. через стадию каллусообразования. При этом прослеживается асинхронность развития структур и полиморфизм типов органогенеза: формируются адвентивные почки на разных стадиях развития, микропобеги, а также отдельные хвоинки.

Summary. Peculiarities of blue spruce (*Picea pungens* Engelm.) morphogenesis *in vitro* under the influence of thidiazuron were revealed. It has been established that during the cultivation of mature zygotic embryos in the light with thidiazuron, processes of indirect regeneration take place, i.e. through the stage of callus formation. In this case, asynchronous development of structures and polymorphism of organogenesis types are observed: adventitious buds at different stages of development, microshoots, and also individual needles are formed.

Тидиазурон (ТДЗ) (N-фенил-N'-1,2,3-тиадиазол-5-ил-мочевина) является гербицидом, который разработали как дефолиант хлопка. В настоящее время обнаружено, что ТДЗ обладает мощной цитокин-подобной активностью, хотя и не является производным аденина как природные цитокинины. Уникальное свойство ТДЗ заключается в способности проявлять одновременно и цитокининовую, и ауксиновую активность (Murthy et al., 1998). В связи с этим он стал эффективным регулятором морфогенеза в культуре *in vitro* для многих видов растений. Применение ТДЗ вызывает разнообразные морфогенетические реакции, начиная от каллусообразования и заканчивая формированием соматических эмбриоидов. Несмотря на то, что точный механизм действия этого регулятора роста еще не установлен, количество публикаций с его использованием растет в геометрической прогрессии (Guo et al., 2011). Однако работ по воспроизводству хвойных под действием этого регулятора роста в настоящее время немного. Одним из интересных представителей хвойных растений является североамериканский вид *Picea pungens* Engelm. – ель голубая или колючая. Несмотря на свое происхождение, ель голубая широко применяется в ландшафтном дизайне городов России. Использование импортного посадочного материала для озеленения городских территорий является дорогостоящим. Размножение ели колючей может осуществляться либо генеративным, либо вегетативным способом. При семенном размножении декоративные признаки материнского растения часто не передаются потомству. Вегетативное размножение также имеет определенные сложности, поскольку регенерация корней у одревесневших черенков затруднена (Steele et al., 1989). Наиболее распространенным способом размножения *Picea pungens* являются прививки. Однако эффективность такого способа размножения составляет 50–60 % (Kirdar et al., 2009). В связи с этим требуется применение современных биотехнологических подходов для разработки эффективных методов размножения этого декоративного растения. Метод культуры тканей представляет альтернативу традиционным способам размножения растений, в том числе и декоративных древесных растений. В настоящее время с помощью культуры *in vitro* достигнута успешная регенерация 50 видов хвойных (Thorpe et al., 1990). Тем не менее, работы по воспроизводству ели колючей в культуре *in vitro* единичны (Afele et al., 1992; Afele, Saxena, 1995).

Цель исследования заключалась в изучении особенностей морфогенеза *Picea pungens* в культуре *in vitro* под действием тидиазурона.

Эксплантами для введения в культуру служили зрелые зиготические зародыши, выделенные из семян. Семена собирали со свободно-опыленных деревьев, произрастающих в искусственных насаждениях г. Новосибирска (Академгородок). Материал стерилизовали 10 % H_2O_2 (10 мин.), затем промывали стерильной водой (10 мин.). Культивирование проводили на питательной среде $\frac{1}{2}$ LV (Litvay, 1985) при 23 °C и 16-часовом фотопериоде. В качестве регуляторов роста использовали ТДЗ в концентрации 0,5 μ M/l и 1 μ M/l. Длительность первого пассажа подбирали экспериментально (25–45 суток). Материал для морфо-гистологического анализа фиксировали в FAA – этанол : формалин : ледяная уксусная кислота (100 : 7 : 7), начиная с 4 суток культивирования и далее отбирали образцы с периодичностью 4–5 суток. Промывку и дальнейшее хранение осуществляли в 70 % этаноле. Далее фиксированный материал подготавливали для заливки в Paraplast (Sigma, США), проводя через этанол, смесь этанола и хлороформа, хлороформ. Изучение процессов морфогенеза проводили на базе Центра коллективного пользования Центрального сибирского ботанического сада (ЦКП ЦСБС) СО РАН на постоянных препаратах (Паушева, 1988). Тонкие срезы (7–9 μ км) получали на ротационном микротоме (Microm, Германия), затем их помещали на предметные стекла и окрашивали гематоксилином по Эрлиху с подкраской алциановым синим. Гистологический анализ проводили с помощью светового микроскопа Axioskop-40 (Carl Zeiss, Германия) с программным управлением, оборудованным цифровой камерой. Полученные при культивировании *in vitro* морфогенные структуры и динамику их развития анализировали с помощью стереомикроскопа Carl Zeiss Stereo Discovery V 12. Статистическую обработку данных проводили по стандартным методикам, используя Microsoft Excel 2003. Все эксперименты проводили минимум в трехкратной повторности.

Изучен морфогенез *Picea pungens* из зрелых зиготических зародышей с концентрацией ТДЗ 0,5 μ M/l и 1 μ M/l в питательной среде $\frac{1}{2}$ LV. При обеих концентрациях регулятора роста в питательной среде происходили процессы регенерации в тканях первичных эксплантов. Морфогенный ответ был высоким и составлял 96–98 %. На четвертые сутки культивирования отмечено небольшое увеличение зиготических зародышей в объеме и появление рыхлого каллуса в области гипокотыля. К десятым суткам культивирования происходило разрастание семядолей и формирование из них плотного зеленоватого каллуса, что может свидетельствовать о начале ассимиляционной активности, а в области гипокотыля развивался белый рыхлый каллус.

К 28-м суткам культивирования каллус, сформировавшийся из семядолей, приобретал ярко-зеленое окрашивание, а на его поверхности было отмечено образование многочисленных меристемои-

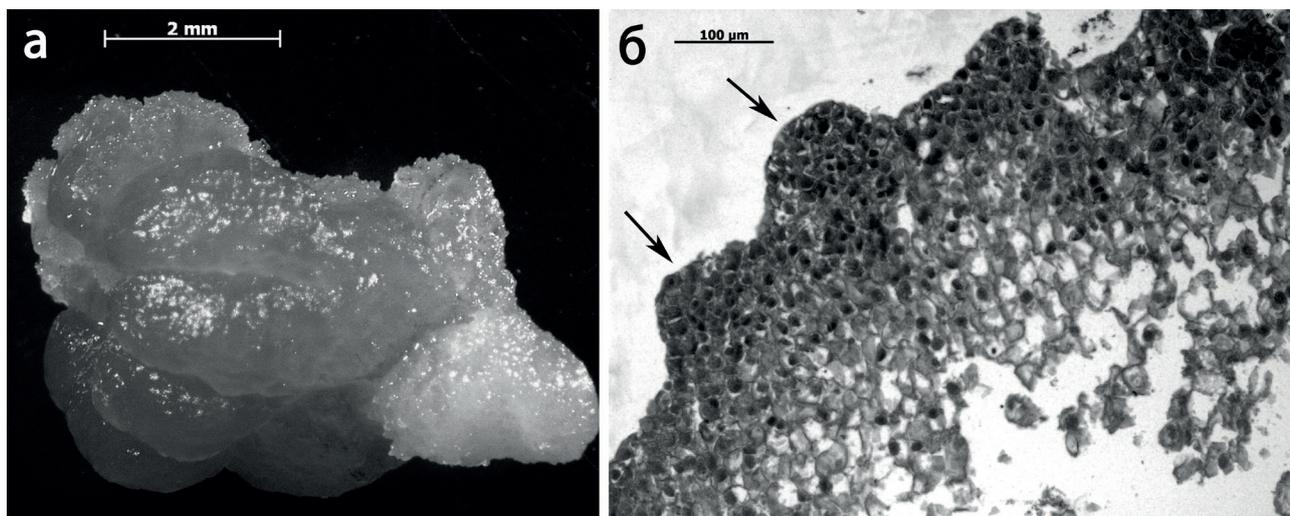


Рис. 1. Регенерация ели колючей на питательной среде $\frac{1}{2}$ LV, содержащей тидиазурон (0,5 μ M), на 30-е сутки культивирования: а – сформировавшийся каллус, масштаб: 2 мм; б – поперечный срез каллуса, стрелками обозначены меристемойды, масштаб: 100 μ m.

дов (рис. 1а). Гистологический анализ показал, что каллус, образовавшийся на поверхности семядолей, внутри имел рыхлую структуру, в его поверхностных слоях формировались многочисленные меристематические центры (рис. 1б), а также глобулярные структуры. Объем клеточной массы увеличивался за счет переклиальных делений, которые приводили к образованию десяти слоев клеток.

Установлено, что концентрация ТДЗ в питательной среде и длительность инкубации влияли на процессы органогенеза в каллусной ткани. При более высокой концентрации ТДЗ ($1\ \mu\text{M}$) – каллус имел розоватое окрашивание, а при пересадке его на безгормональные питательные среды наблюдали некроз тканей. Показано, что наилучший период для культивирования эксплантов составлял 25–30 суток. Более длительное пассирование приводило к формированию неморфогенного каллуса.

После культивирования полученных каллусов на безгормональных питательных средах в течение пассажа (25–30 суток) отмечена асинхронность процессов органогенеза. Наблюдали формирование как адвентивных почек на разных стадиях развития, так и микропобегов, а также отдельных хвоинок. При последующем культивировании в течение двух пассажей на безгормональной питательной среде наблюдали удлинение микропобегов. Количество микропобегов на экплант составляло в среднем 44 ± 7 , длина – 7–12 мм (рис. 2).

Таким образом, установлено, что при культивировании зрелых зиготических зародышей на свету с тидиазуром отмечен непрямой тип морфогенеза, т.е. через стадию каллусообразования. При этом прослеживается асинхронность развития структур и полиморфизм (т.е. наблюдаются разные типы органогенеза). Оптимальной концентрацией тидиазура в питательной среде для формирования адвентивных почек является $0,5\ \mu\text{M/l}$ при длительности пассажа 25–30 суток. Полученные результаты послужат основой для разработки эффективных систем клонального размножения *Picea pungens*.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта № 18-34-00434 мол_а «Регуляция путей регенерации хвойных в системе *in vitro* на примере представителей рода *Picea*».

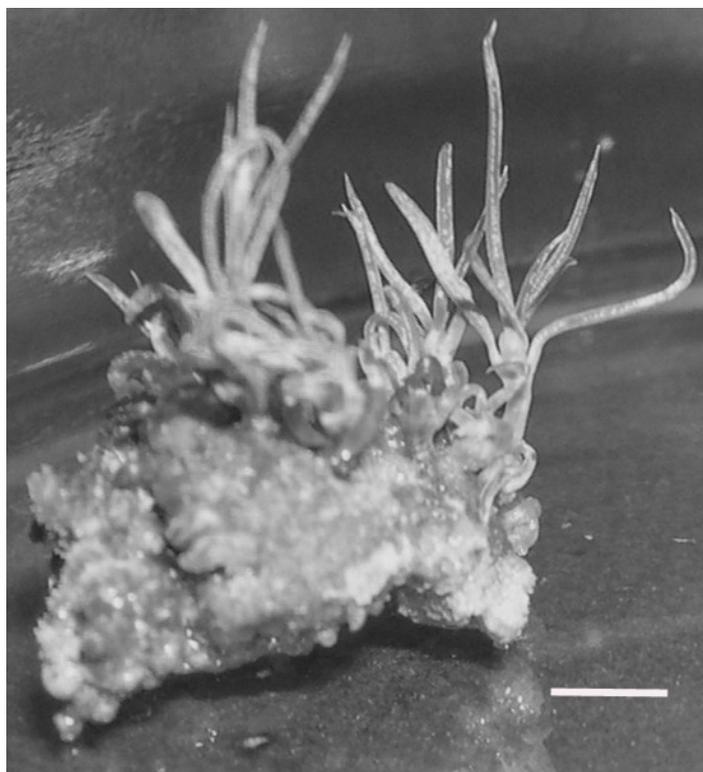


Рис. 2. Развитие и удлинение микропобегов после трех пассажей на безгормональной питательной среде $\frac{1}{2}$ LV из каллусов, полученных на среде с тидиазуром ($0,5\ \mu\text{M/l}$). Масштаб: 1 см.

ЛИТЕРАТУРА

- Паушева З. П.** Практикум по цитологии растений. – М.: Агропромиздат, 1988. – 271 с.
- Afele J. C., Saxena P. K.** Somatic embryogenesis in blue spruce (*Picea pungens* Engelmann) // Somatic embryogenesis in woody plants forestry sciences / Eds. S. M. Jain, P. K. Gupta, R. J. Newton: Springer Science+Business Media Dordrecht, 1995. – Vol. 44–46. – P. 99–109.
- Afele J. C., Senaratha T., Saxena P.** Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo culture *Picea pungens* // Plant Cell Reports, 1992. – Vol.11. – P. 299–303.
- Guo B., Abbasi B. H., Zeb A., Xu L. L., Wei Y. H.** Thidiazuron: a multidimensional plant growth regulator // African journal of biotechnology, 2011. – Vol. 10 (45). – P. 8984–9000.
- Kirdare E., Ertekin M., Gökyer E., Çorbacı Ö. L.** Mavi ladinin (*Picea pungens* Engelm.) aşısı ile üretimi üzerine araştırmalar // Kastamonu Üni., Orman fakültesi Dergisi, 2009. – Vol. 9(1). – P. 35–41.
- Litvay J. D., Verma D. C., Jonson M. A.** Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of wild carrot (*Daucus carota* L.) // Plant Cell Rep., 1985. – Vol. 4. – P. 325–328.
- Murthy B. N. S., Murch S.J., Saxena P. K.** Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis // In vitro cell dev. biol. plant, 1998. – Vol. 34. – P. 267–275.
- Steele M. J., Yeoman M.M., Coutts M. P.** Developmental changes in Sitka spruce as indices of physiological age // New Phytologist, 1989. – Vol.8. – P. 114–121.
- Thorpe T. A.; Harry I. S., Kumar P. P.** Application of micropropagation to forestry. // Micropropagation: technology and application. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990. – P. 311–336.