

УДК 575.1:631.52:624.23

Пути регенерации растений вишни степной (*Prunus fruticosa* Pall) в условиях *in vitro*

The ways of *in vitro* regeneration of cherry (*Prunus fruticosa* Pall)

Плаксина Т. В.¹, Солохина А. А.², Артамонова О. Н.², Бородулина И. Д.²

Plaksina T. V.¹, Solohina A. A.², Artamonova O. N.², Borodulina I. D.²

¹ Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, г. Барнаул, Россия. E-mail: tplaksina@mail.ru

² Алтайский государственный университет, г. Барнаул, Россия. E-mail: borodulina.irina@gmail

¹ Federal Altai Scientific Centre of Agro-BioTechnologies, Barnaul, Russia

² Altai State University, Barnaul, Russia

Реферат. Исследованы особенности морфогенеза листовых эксплантов вишни степной сорта ‘Памяти Левандовского’ и перспективных гибридов 3-11-20; 972-7-16 в условиях *in vitro*. Изучено влияние регуляторов роста ИМК, ИУК, НУК, БАП, ТДЗ на индукцию геммогенеза и каллусогенеза.

Summary. The features of leaves explants morphogenesis of cherry variety ‘Pamyati Lewandowskogo’ as well as hybrids 3-11-20; 972-7-16 *in vitro* have been investigated. Influence of growth regulators: IBA, IAA, NAA, BAP, and TDZ on the induction of gemogenesis and callusogenesis have been studied.

Биотехнологические приемы, основанные на культивировании органов и тканей многолетних растений в условиях *in vitro*, позволяют решить проблему массового тиражирования ценных видов, форм и сортов для пополнения генофонда, создания медленно растущих коллекций в условиях *in vitro*. В настоящее время активно развиваются такие направления как генная инженерия, клеточная и тканевая селекция, соматическая гибридизация. Перечисленные направления могут успешно реализоваться только при наличии надежных способов регенерации растений из тех или иных типов эксплантов (листовые диски, корни, каллусные ткани, пыльники и так далее). Основу морфогенеза, как процесса образования определенных структур, составляют процессы размножения, роста и дифференцировки клеток. По мнению S. M. Woo с соавторами (2008), культура изолированных листовых эксплантов – перспективная система не только для массового размножения, но и для изучения фундаментальных основ морфогенеза в условиях *in vitro*, так как отсутствие апикальных меристем у листа дает возможности индуцировать широкий спектр морфогенных ответов клетками экспланта. Для многих плодовых, ягодных и декоративных растений морфогенез в культуре тканей остается открытым вопросом. Это во многом обусловлено видовой и сортовой специфичностью растений, требующих индивидуальной оптимизации условий культивирования и необходимостью изучения факторов, влияющих на морфогенез в изолированных тканях, а также поиском путей повышения результативности.

Цель исследования – оценка регенерационной способности листовых эксплантов вишни степной в культуре *in vitro*.

Материалы и методы

В настоящее время в лаборатории биотехнологии и цитологии Федерального Алтайского научного центра агробиотехнологий (ФАНЦА) продолжаются исследования по изучению основных факторов, влияющих на процессы морфогенеза изолированных соматических тканей перспективных гибридов и сортов вишни степной.

В работе использованы перспективные гибриды вишни 3-11-20, 972-7-16 и сорт ‘Памяти Левандовского’ селекции ФГБНУ «НИИСС» им. М. А. Лисавенко. В качестве первичных эксплантов ис-

пользованы молодые листья растений, культивируемых *in vitro*. Культивирование эксплантов *in vitro* проводили по общепринятым методикам (Методические рекомендации, 1996; Бутенко, 1999) на средах с минеральным составом по прописям Мурасиге и Скуга (MS) (Murashige, Skoog, 1962). Для изучения действия регуляторов роста (РР) на процесс морфогенеза использовали вещества из группы ауксинов: β -индолил-3-масляную кислоту (ИМК), α -нафтилуксусную кислоту (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индолилуксусную кислоту (ИУК), и вещества с цитокининовой активностью: 6-бензиламинопурин (6-БАП) и тидиазурон (ТДЗ). РР вносили в среды для регенерации в концентрациях от 0,5 до 16,7 мкМ/л. Всего было протестировано 19 вариантов питательных сред.

Процессы регенерации проходили в условиях фотопериода 16/8 часов свет/темнота при 24 ± 1 °С и интенсивности освещения 2000–3000 люкс и в условиях темноты. Регенерационную способность культивируемых тканей и органов оценивали по количеству эксплантов, регенерировавших морфогенные структуры (почки, корни, листья, побеги) или пролиферирующие только каллусную массу. При анализе каллусов учитывали такие морфологические признаки как цвет и консистенцию. Математическая обработка результатов исследований проведена с помощью компьютерной программы *Microsoft Office Excel* (2007).

Результаты исследований и обсуждение

Индукцию и регулирование морфогенеза у изолированных тканей осуществляют введением в питательные среды РР из групп цитокининов и ауксинов. В наших исследованиях в процессе культивирования изолированных листьев на искусственных питательных средах с относительно невысокой концентрацией цитокинина БАП (4,43 мкМ) в сочетании с ауксинами ИМК или НУК в концентрации 0,5–0,7 мкМ на листовых пластинках наблюдали прямой органогенез в основании листа в виде меристематических конусов, почек, листьев и побегов. Подобную реакцию имели 20–80 % эксплантов в зависимости от генотипа (рис. 1, 2, 3).

При увеличении концентрации ауксинов в 10 раз в сочетании с БАП 4,43 мкМ образовали каллус в основании листа и по краю листовой пластинки от 13 до 83 % эксплантов всех генотипов. У 27 % эксплантов незначительный рост каллуса сопровождался органогенезом в виде микропобегов от 1 до 8 шт./эксплант (рис. 1, 2, 3). При последующем субкультивировании таких эксплантов на среде с вдвое уменьшенным содержанием РР развивались полноценные побеги.

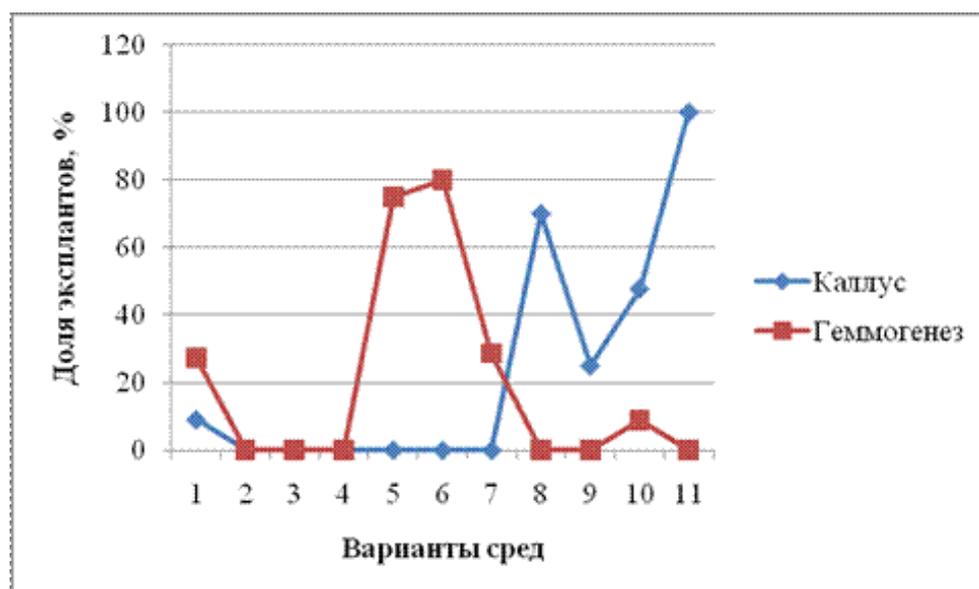


Рис. 1. Реакция листовых эксплантов гибрида 972-7-16 на гормональный состав питательных сред.
Примечание: 1–4,43 БАП+5,0 ИМК; 2–4,43 БАП+0,63 ИМК; 3–4,43 БАП+0,5 ИМК; 4–4,43 БАП+5,7 ИУК; 5–4,43 БАП+0,6 ИУК; 6–4,43 БАП+5,6 НУК; 7– 4,43 БАП+0,7 НУК; 8– 4,55 ТДЗ+5,0 ИМК; 9–4,55 ТДЗ+0,63 ИМК; 10–4,55 ТДЗ+0,5 ИМК; 11–9,09 ТДЗ+10,0 ИМК.

Дальнейшее увеличение концентрации БАП и ИМК/НУК в 2–3 раза стимулировало рост каллусной массы, начиная с основания листа и распространяясь по всей листовой пластинке в 10–90 % случаях (рис. 3, 4). Структура каллуса была неоднородной, с плотными и рыхлыми участками. Цвет каллуса варьировал от светло-зелёного до коричневого. Использование в качестве ауксина НУК усиливало рост каллуса. У большинства эксплантов органогенез не наблюдался. Лишь отдельные экспланты сорта ‘Памяти Левандовского’ (10 %) на этих средах имели геммогенез в виде листьев и микропобегов.

В последнее время в качестве эффективного индуктора морфогенеза используют ТДЗ (Зайцева, 2015; Пищева, 2016). В наших экспериментах включение ТДЗ в концентрации 4,55 мкМ в сочетании с ИМК 0,6 мкМ приводило к росту каллуса на листовой пластинке почти у 1/2 эксплантов (29–57 %). Увеличение концентрации ИМК в 10 раз при том же уровне ТДЗ усиливало рост каллуса до 76 %. Увеличение концентрации ТДЗ до 9,0 мкМ, ИМК до 10 мкМ вызвало рост каллуса у 100 % эксплантов гибридов 3-11-20, 972-7-16 и 36 % эксплантов сорта Памяти Левандовского. Он начинался от основания листа, распространяясь по центральной жилке и к концу 30 дня культивирования покрывал весь лист со всех сторон. Структура формировавшегося каллуса была плотной, бугристой, но встречались участки с рыхлыми клетками. Его цвет был от белого до светло-зелёного. Геммогенез наблюдался только у 18 % эксплантов сорта ‘Памяти Левандовского’.

Эмпирический поиск необходимого баланса ауксина и цитокинина представляет собой один из ключевых моментов при разработке методики индукции морфогенеза. Исследования, проведённые С. А. Муратовой с соавторами (2011) выявили, что для индукции морфогенеза из листовых эксплантов растений рода *Rubus* необходимо 2,0–5,0 мг/л цитокинина и один из ауксинов в концентрации 0,5–1,0 мг/л.

В наших исследованиях увеличение концентрации БАП в 2–3 раза (8,86/13,29 мкМ) по сравнению с первоначально используемой (4,43 мкМ) совместно с ауксином ИМК в концентрации 10 или 15 мкМ (либо НУК 11,1 или 16,7 мкМ) способствовало значительному росту каллусной массы. Эффективным индуктором оказалась НУК: на средах с данным ауксином от 80 до 92 % эксплантов имели рыхлый, оводнённый каллус светло-зелёного цвета. На втором месте по эффективности – ИМК: индукция

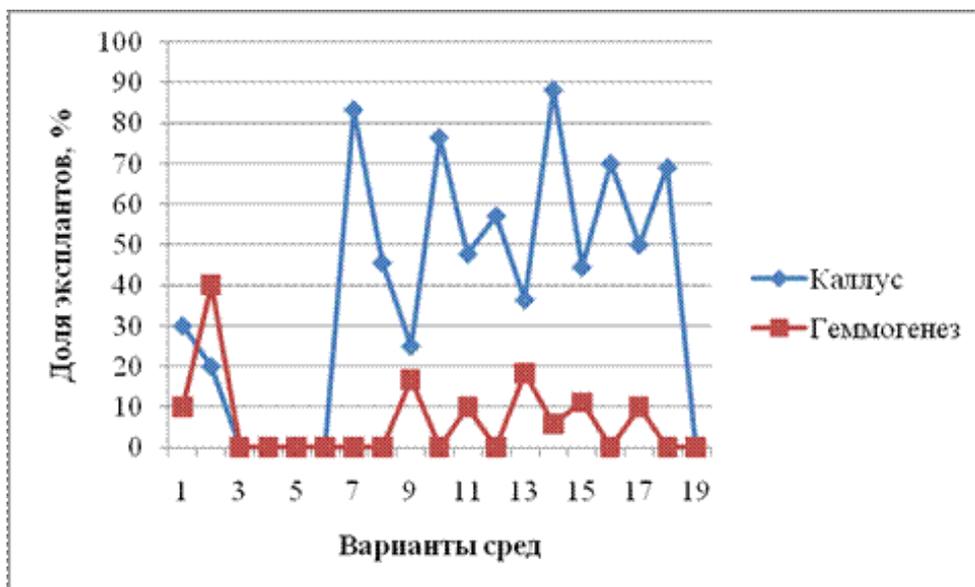


Рис. 2. Реакция листовых эксплантов сорта Памяти Левандовского на гормональный состав питательных сред. Примечание: 1–4,43 БАП+5,0 ИМК; 2–4,43 БАП+0,63 ИМК; 3–4,43 БАП+0,5 ИМК; 4–4,43 БАП+5,7 ИУК; 5–4,43 БАП+0,7 ИУК; 6–4,43 БАП+0,6 ИУК; 7–4,43 БАП+5,6 НУК; 8–4,43 БАП+0,7 НУК; 9–4,43 БАП+0,6 НУК; 10–4,55 ТДЗ+5,0 ИМК; 11–4,55 ТДЗ+0,63 ИМК; 12–4,55 ТДЗ+0,5 ИМК; 13–9,09 ТДЗ+10,0 ИМК; 14–13,65 ТДЗ+10,0 ИМК; 15–8,86 БАП+11,1 НУК; 16–13,29 БАП+16,7 НУК; 17–8,86 БАП+10,0 ИМК; 18–13,24 БАП+15,0 ИМК; 19–8,86 БАП+0,2 ИМК.

каллуса наблюдалась у 50–100 % эксплантов (рис. 2, 3). Каллус характеризовался гетерогенной структурой и был от светло-зелёного до коричневого цвета. В вариантах с высоким содержанием БАП и ауксинами (рис. 2) геммогенез имели только экспланты сорта Памяти Левандовского (10–11 %). Таким образом, использование вышеуказанных концентраций РР способствовало получению большого количества каллусной массы для дальнейших исследований.

Повышение эффективности селекционной работы отчасти обусловлено использованием метода каллусогенеза (повышается частота соматональной изменчивости) с последующей регенерацией из него растений. Для стимуляции каллусо- и органогенеза часто применяют ауксин 2,4-Д. В его присутствии каллус нарастает постепенно, не темнеет в течение 4–6 месяцев и может долго сохранять регенерационную способность. Однако у растений, полученных с использованием 2,4-Д, наблюдается повышенный процент форм, несущих соматональные изменения (Муратова и др., 2011). В нашем эксперименте, при внесении в питательную среду 2,4-Д, через две недели культивирования в темноте, на листовых пластинках образовался каллус светло-желтого цвета, состоящий из мелких клеток, плотной консистенции.

Дальнейшее культивирование эксплантов в условиях фотопериода (2 недели) способствовало увеличению каллусной массы, при этом цвет каллуса не изменялся, лишь у отдельных эксплантов появились светло-коричневые участки с антоциановыми пигментами. При последующем субкультивировании этот каллус погиб. Поэтому мы считаем, что на вышеуказанной среде был получен неморфогенный каллус. Наши предположения согласуются с экспериментами Н. А. Вечерниной (2004), которая отмечает, что каллусы с меристематическими очагами, полученные от листовых эксплантов примулы, при помещении в условия фотопериода возобновляли синтез хлорофилла и зеленели.

Морфогенный каллус обычно имеет плотную консистенцию, бугристую поверхность, а его цвет варьирует от молочно-белого до желтого. У одного и того же генотипа могут встречаться как морфогенные, так и неморфогенные каллусы (Савельев и др., 2009). В нашем случае цвет каллуса, в зависимости от концентрации РР, варьировал от молочно-белого/светло-зеленого до бурого. По консистенции каллус был плотным и среднеплотным. Известно, что прозрачный, рыхлый, оводненный каллус, как правило, не регенерирует микрорастения (Тимофеева, Румянцева, 2012).

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования показали, что листовые экспланты вишни степной (*Prunus fruticosa* Pall) способны к прямому органогенезу и к каллусогенезу в

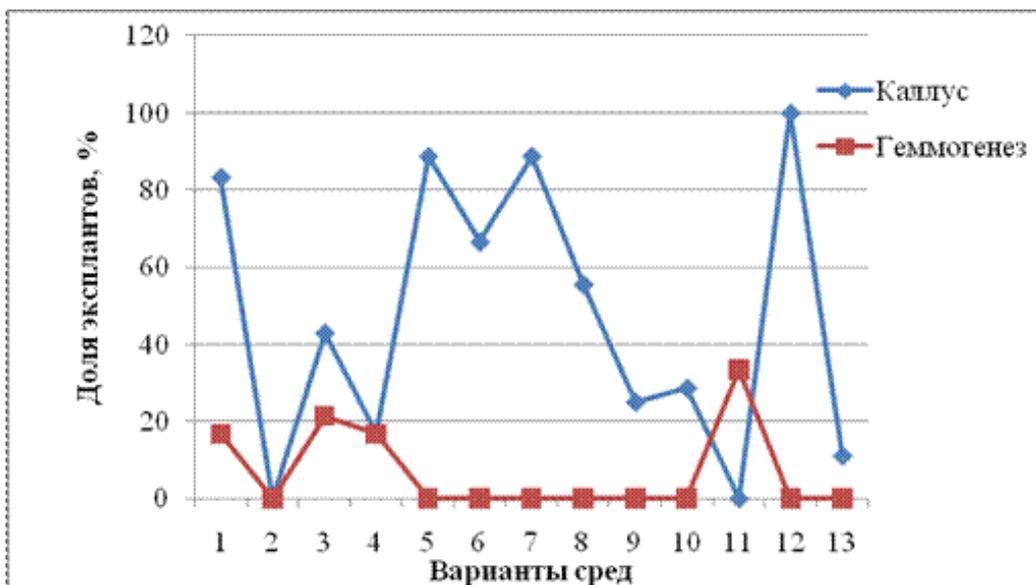


Рис. 3. Реакция листовых эксплантов гибрида 3-11-20 на гормональный состав питательных сред.
Примечание: 1–4,43 БАП+5,0 ИМК; 2–4,43 БАП+0,63 ИМК; 3–4,43 БАП+0,5 ИМК; 4–4,43 БАП+5,7 ИУК; 5–8,86 БАП+11,1 НУК; 6–8,86 БАП+10,0 ИМК; 7–13,24 БАП+16,7 НУК; 8–13,24 БАП+15,0 ИМК; 9–4,55 ТДЗ+5,0 ИМК; 10–4,55 ТДЗ+0,63 ИМК; 11–4,55 ТДЗ+0,5 ИМК; 12–9,09 ТДЗ+10,0 ИМК; 13–13,24 БАП+15,0 ИМК.

культуре *in vitro*. Для стимуляции органогенеза прямым путем достаточно использовать относительно невысокие концентрации цитокинина БАП 4,43 мкМ совместно с ИМК 0,63 мкМ для эксплантов сорта Памяти Левандовского; для гибрида 972-7-16 – такую же концентрацию БАП, но с повышенной концентрацией НУК (5,6 мкМ); для гибрида 3-11-20 в качестве цитокинина предпочтительно использовать ТДЗ 4,55 мкМ совместно с ИМК 0,5 мкМ. Эффективными индукторами каллусогенеза стали высокие концентрации РР и их совместное использование (БАП + НУК/ИМК или ТДЗ + НУК/ИМК). Из исследованных генотипов листовые экспланты гибрида 972-7-16 отличались высокой способностью к гемогенезу. На втором месте по этому признаку были экспланты сорта ‘Памяти Левандовского’.

ЛИТЕРАТУРА

- Бутенко Р. Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- Вечернина Н. А.** Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2004. – 205 с.
- Методические рекомендации. Индукция морфогенеза и тканевая селекция плодовых и ягодных культур. – Мичуринск, 1996. – 74 с.
- Муратова С. А., Соловых Н. В., Терехова В. И.** Индукция морфогенеза из изолированных соматических тканей растений. – Мичуринск: Изд-во Мичуринского госагроуниверситета, 2011. – 107 с.
- Зайцева Ю. Г.** Особенности морфогенеза и размножения *in vitro* некоторых представителей рода *Rhododendron* L.: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Новосибирск, 2015. – 17 с.
- Пищева Г. Н.** Регенерационные особенности первичных эксплантов *Phlox paniculata* L. в культуре *in vitro* // Достижения науки и техники АПК, 2016. – Т.30, № 9. – С. 40–43.
- Савельев Н. И., Олейникова О. Я.** Использование метода андрогенеза *in vitro* в работе с плодовыми ягодными культурами. – Мичуринск-наукоград: Всеросс. научно-исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений имени И. В. Мичурина, 2009. – 49 с.
- Тимофеева О. А., Румянцева Н. И.** Культура клеток и тканей растений. – Казань: Изд-во Казанского федерального ун-та, 2012. – 91 с.
- Murashige T., Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.*, 1962. – V.15, № 13. – P. 473–497.
- Woo S. M., Wetzstein H. Y.** Morphological and histological evaluations of *in vitro* regeneration in *Elliottia racemosa* leaf explants induced on media with thidiazuron // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2008. – Vol. 133. – P. 167–172.