

И.Д. Бородулина, Н.А. Вечернина, О.К. Таварткиладзе
**КАЛЛУСОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИОННАЯ СПОСОБНОСТЬ
ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ PRIMULA X POLYANTHA MILL**

Примула многоцветковая (*Primula x polyantha* Mill.) – один из красивейших ранневесенних многолетников. От алтайских видов *P.pallasii* Lehm., *P.cortusoides* L., *P.macrocalyx* Bunge ее отличает обильное и продолжительное цветение, богатство окрасок венчика, декоративность зимнезеленых листьев. Однако являясь европейским видом, она недостаточно адаптирована к условиям нашего резкоконтинентального климата. Получение высокодекоративных и наиболее адаптированных гибридов путем проведения различного рода скрещиваний существенно ограничено низкой семенной продуктивностью.

Для повышения эффективности селекционной работы наряду с традиционными методами перспективно применение новых подходов. Одним из них может стать метод культуры клеток и тканей *in vitro*, в том числе метод индукции каллусогенеза с последующей регенерацией из него растений. Известно, что неорганизованные культуры характеризуются генетической нестабильностью, являющейся результатом таких факторов, как генетическая изменчивость клеток экспланта, мутагенное действие условий культивирования *in vitro* и давления отбора *in vitro* [1]. Поэтому генетическая изменчивость полученных регенерантов может быть использована в качестве источника получения новых форм в селекции растений, в частности, примулы многоцветковой.

Материалы и методы исследований

В качестве исходного материала для индукции каллусогенеза были использованы листья размножаемых в культуре *in vitro* растений, у которых удаляли листовую пластинку, а оставшуюся центральную жилку делили на фрагменты и помещали на агаризованные питательные среды. Минеральной основой этих сред служили прописи по Мурасиге и Скугу (МС) и Гамборгу В₅ [2]. Ос-

новную питательную среду дополняли различными концентрациями регуляторов роста: 1-нафтилуксусной кислотой (НУК) 0,5 – 20 мкМ, 2,4-дихлорфеноксиксусной кислотой (2,4-Д) 10 мкМ, 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновой кислотой (АТХП) 10 мкМ, 6-бензиламинопурином (БАП) 2-30 мкМ, 6-фурфуриламинопурином (К) 10 мкМ и гибберелловой кислотой (ГК) 5 – 10 мкМ.

Индукцию и культивирование каллуса осуществляли в условиях темноты, морфогенетические процессы индуцировали в условиях фотопериода (16/8 часов). Температура культивирования поддерживалась в пределах 24 ± 1 °С.

Рост каллуса оценивали по 5-балльной системе: "-" – нет роста, "+" – слабый рост, "++" – средний рост, "+++" – хороший рост, "++++" – очень хороший рост.

Результаты и обсуждение

Регенерация растений является самым важным моментом во всей методологии культуры клеток и тканей. Регенерация представляет собой завершающий этап работы, и без ее достижения теряют смысл все проведенные ранее исследования. Процесс регенерации зависит от совокупности различных факторов. Одним из них является правильный выбор экспланта.

Анализ литературы по проблемам регенерации показал, что как для травянистых, так и для древесных видов растений высоким морфогенетическим потенциалом обладают ткани листа [3, 4]. Повышенной регенерационной способностью выделяются центральные жилки листа, характеризующиеся высокими дозами эндогенных гормонов [5]. Высокая способность к регенерации характерна для ювенильных эксплантов, в том числе и для эксплантов листового происхождения [6]. Поэтому в своих исследованиях мы использовали фрагменты центральной

жилки листа реювенилизированных (размножаемых *in vitro*) растений примулы.

Для индукции каллусогенеза использовали питательные среды, дополненные различными ауксинами (2,4-Д, НУК, АТХП) и цитокининами (БАП, К). Безгормональные среды, а также среды, дополненные только одним типом регуляторов роста (ауксином или цитокинином), оказались неэффективными, так как не было отмечено ни одного случая индукции каллуса.

В таблице 1 представлены данные о влиянии ауксинов на индукцию каллуса от листовых эксплантов примулы. Результаты исследований показывают, что природа используемого ауксиноподобного вещества оказывает влияние на интенсивность каллусогенеза и морфогенетические особенности образующегося каллуса. Так, НУК и АТХП были наиболее эффективными индукторами каллусогенеза по сравнению с 2,4-Д. Процесс образования каллуса на среде с НУК и АТХП происходил на 18-21 сутки, тогда как на среде с 2,4-Д – на 34 сутки. Темпы роста каллуса также различались в зависимости от использованного ауксина. Решающее значение для каллусообразования имело соотношение и концентрация ауксин: цитокинин. Применение БАП и НУК в одной и той же концентрации при соотношении 1:1 (10 мкМ) оказалось неэффективным: только на одном из 15 эксплантов произошло развитие каллуса. При увеличении концентрации ауксинов в среде и изменении соотношения НУК:БАП до 10:1 частота каллусообразования составила 40%. Наши исследования показали, что для индукции каллуса с высокой частотой (более 90%) от листовых эксплантов примулы в состав питательной среды необходимо добавлять ауксины и цитокинины в соотношении 5:1. Было также установлено, что более важным фактором для каллусообразования являлась природа ауксина по сравнению с цитокинином. Так, замена БАП на К (2 мкМ) не приводила к существенным изменениям этого процесса.

Субкультивирование каллусов, индуцированных на трех типах питательных сред (А,Б,В), осуществляли на среду В5. Уже в конце 2-пассажа в каллусах появлялись узловые структуры.

Хорошо развитые каллусы в 3-пассаже переносили на 6 вариантов сред и культивировали в условиях фотопериода. В конце пассажа проводили наблюдения, результаты которых представлены в таблице 2.

Результаты представленного в таблице 2 эксперимента показывают, что в узловом каллусе примулы, культивируемом в условиях освещения, даже на среде без регуляторов роста развиваются меристематические очаги. Процессы морфогенеза шли более интенсивно при наличии в среде цитокинина и прямо зависели от концентрации этого регулятора роста. Так, при увеличении концентрации БАП с 2 до 20 мкМ количество морфогенных каллусов возросло почти вдвое (29,5% и 47,6%, соответственно). Представленные данные позволяют сделать вывод, что присутствие в питательной среде экзогенной ГК не было необходимо для перехода компетентных клеток каллуса в меристематические. По-видимому, для этого было достаточно эндогенного уровня ГК.

Каллусы, характеризующиеся наличием меристематических очагов, отличались от неморфогенных возобновлением синтеза хлорофилла при помещении их в условия фотопериода, то есть они были зеленого цвета. У неморфогенных каллусов в этих же условиях синтезировались только автоциановые пигменты, поэтому они имели цвет от розового до темно-бордового.

Каллусы зеленого цвета, характеризующиеся наличием меристематических очагов, пассировали на среду для регенерации почек. Среда была подобрана эмпирическим путем и содержала в своем составе 30 мкМ БАП + 10 мкМ ГК + 0,1 мкМ НУК. На 14 из 24 каллусов (58,3%) регенерировали почки. Необходимо отметить, что все эти 14 каллусов были индуцированы на питательных средах Б и В. Каллусы, индуцированные на среде с 2,4-Д (А) в процессе культивирования либо отмирали, либо были неморфогенными и по этой причине не использовались в последующих экспериментах.

Каллусы с почками переносили на среду Гамборга В₅ с 10 мкМ БАП + 5 мкМ ГК + 0,5 мкМ НУК. В конце пассажа проводили подсчет числа растений-регенерантов. Их

количество варьировало от 4 до 30 штук на один регенерирующий каллус.

Таким образом, показана принципиальная возможность получения растений-регенерантов примулы многоцветковой из каллуса листового происхождения. Результаты экспериментальных исследований позволяют заключить, что для индукции каллусогенеза в питательную среду МС

необходимо добавлять ауксин (НУК или АТХП) и цитокинин (БАП или К) в соотношении 5:1. Для индукции регенерационных процессов в каллусе из состава среды исключают ауксин, а количество цитокинина (БАП) повышают до 20 мкМ. Растения-регенеранты успешно развиваются на среде Гамборга В₅ с 10 мкМ БАП + 5 мкМ ГК + 0,5 мкМ НУК.

Таблица 1

Влияние ауксинов на индукцию каллусогенеза листовых эксплантов примулы

Регуляторы роста, мкМ	Число эксплантов, шт.	Каллус, шт./%	Морфология каллуса		Рост каллуса, баллы
			структура	цвет	
МС	15	0/0	–	–	–
А.2,4-Д10+БАП2	12	9/75	плотный	кремовый	+
Б.НУК10 + БАП2	12	11/92	рыхлый	кремовый	++
В.АТХП10+ БАП2	24	23/96	рыхлый	кремовый	++

Таблица 2

Влияние регуляторов роста на морфогенетический потенциал листового каллуса примулы

Регуляторы роста, мкМ	Число каллусов, шт.		% морфогенных каллусов
	посаженных	с меристематическими очагами	
1. МС	15	3	20,0
2. БАП2	24	15	29,2
3. БАП2+ГК10	12	3	25,0
4. БАП20	21	10	47,6
5. БАП20+ГК10	11	5	45,5
6. БАП10+К10+НУК0,5	23	12	52,2

ЛИТЕРАТУРА

1. Evans D.A. Somaclonal variation – genetic basis and breeding application // Trends in Genetic. 1989
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980.
3. Malik K.A., Saxena P.K. Regeneration in *Phaseolus vulgaris* L. Promotiverole of 6-benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves // Planta, 1991.
4. Вечернина Н.А., Таварткиладзе О.К., Кутубидзе В.В. Регенерация растений актинидии китайской из каллусных культур листьев // Субтропические культуры, 1990.
5. Дерфлинг К. Гормоны растений. М., 1985.
6. Welander M. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised in vitro from mature apple trees // J. Plant Physiol., 1988.