

УДК 581.085

Н.А. Вечернина, О.К. Таварткиладзе, С.В. Жаркова

Каллусогенез и регенерационная способность тканей и органов *Allium cepa* L. in vitro

Для повышения эффективности селекционной работы на разных ее этапах все чаще привлекаются нетрадиционные методы. Одним из них является культивирование изолированных клеток, тканей и органов растений *in vitro*. Однако основным препятствием на пути использования этого направления исследований может стать отсутствие регенерационной способности у культивируемых *in vitro* тканей. Поэтому одной из основных задач экспериментаторов традиционно считается решение проблемы управления процессами регенерации.

В большинстве случаев способность к регенерации обнаруживается не у первичного экспланта, а в возникшем от него каллусе. Успех получения высокоморфогенного каллуса зависит от наличия в первичном экспланте митотически активных клеток. Для индукции каллуса, особенно у традиционно сложных в отношении регенерационной способности *in vitro* объектов исследования – однодольных [1; 2], в том числе и представителей семейства Alliaceae, чаще всего используют завязи и семяпочки [3].

Возможность управления процессами регенерации *in vitro* растений *Allium cepa* L. позволит относительно быстро получать гомозиготный материал из обогатенных в генетическом отношении гибридов и использовать его в гетерозисной селекции.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали лук сорта Ермак. Первичными эксплантами являлись изолированные семяпочки и завязи, которые вычленили из цветков, находящихся в нераскрывшихся соцветиях диаметром 2–2,5 см. Поверхностную стерилизацию соцветия проводили 0,1% раствором сулемы в течение 30 минут с последующим промыванием в четырех порциях стерильной дистиллированной воды. Затем снимали с соцветия покрывало и вычленили семяпочки и завязи.

Экспланты культивировали на агаризованной питательной среде. В качестве минеральной основы использовали среду по прописи BDS [4]. Среда дополняли регуляторами роста и развития растений: 6-бензиламинопурином (БАП), кинетином (К), 1-нафтилуксусной кислотой (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислотой (2,4-Д), 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновой кислотой (АТХП), рН среды доводили до значения 5,6–5,8 и

стерилизовали в автоклаве при давлении 0,9+0,1 атм в течение 15 минут. Все операции, требующие соблюдения асептических условий, проводили в ламинар-боксе.

Каллус индуцировали в условиях темноты, а процессы регенерации – в условиях фотопериода 16/8 часов. Культивирование проводили при 24+1° С.

Для вычленения семяпочек и завязей, а также при наблюдении ранних стадий развития морфогенных структур в каллусе, использовали стереомикроскоп МБС-9. В каждом варианте опыта культивировали 15–20 эксплантов.

Результаты и обсуждения. При индукции каллуса от семяпочек лука было испытано 12 вариантов питательных сред, различающихся по составу и концентрации регуляторов роста: БАП (1, 2 и 5 мкМ) в сочетании с 2,4-Д или АТХП (10 и 20 мкМ). Оказалось, что использование БАП в сочетании с АТХП было неэффективно, так как не удалось индуцировать развитие каллуса. Тогда как 50% семяпочек на среде BDS + БАП 2мкМ + 2,4-Д 10мкМ пролиферировали каллус. Повышение концентрации 2,4-Д до 20 мкМ при той же концентрации цитокинина снизило эту способность до 6%. Увеличение концентрации БАП с 1 до 5 мкМ при использовании 10 мкМ 2,4-Д изменило количество пролиферирующих семяпочек с 14 до 9%.

Каллус от завязей индуцировали на 20 вариантах питательных сред. Результаты этого эксперимента приведены в таблице 1.

Представленные данные показывают, что интенсивность каллусогенеза завязей, так же, как и семяпочек, зависела от природы и концентрации используемых ауксинов. Наиболее индуктивными были среды, дополненные 2,4-Д и АТХП. Комбинация 1 мкМ БАП с 10 мкМ 2,4-Д

Таблица 1

Влияние регуляторов роста на интенсивность каллусогенеза (%) завязей лука (n = 20)

Цитокинин	мкМ	Ауксин, мкМ								
		НУК			2,4-Д			АТХП		
		5	20	5	10	20	5	10	20	
БАП	1	14	–	7	75	–	38	0	50	
	2	–	40	–	50	40	–	55	27	
	5	–	–	–	–	0	–	33	12	
К	1	0	–	33	–	–	29	–	–	
	2	–	35	–	–	56	–	–	44	

позволила индуцировать каллус у 75% эксплантов. Полученные в условиях темноты каллусы по морфологическим характеристикам не различались и представляли собой плотный каллус желтого цвета.

Каллусы, помещенные на регенерационные среды и в условия фотопериода, уже через две недели культивирования можно было разделить на три морфотипа: I – белые, рыхлые, мелкозернистые; II – белые с зелеными очагами, плотные; III – желтые, рыхлые, глобулярные. Причем каллус, индуцированный от семян, был представлен только третьим морфотипом, тогда как каллус от завязей был всех трех морфотипов.

Регенерационную способность каллусов проверяли на четырех типах питательных сред (табл. 2).

Наибольшая частота образования морфоген-

Таблица 2

Влияние регуляторов роста на регенерационную способность и морфогенез каллуса завязей лука

Регуляторы роста, мкМ	Общее количество каллусов, шт.	Морфогенез, %	
		почки	корни
БАП8 + АТХПЗ	44	4	0
БАП8 + 2,4-ДЗ	23	13	0
БАП4 + НУК0,5	22	18	26
БАП8	15	0	46

ного каллуса наблюдалась в среде с БАП 8 мкМ, однако происходила регенерация только корней. Высокий процент морфогенеза отмечен на среде BDS + БАП 4 мкМ + НУК 0,5 мкМ, причем более половины каллусов регенерировали почки. Использование в составе среды 2,4-Д индуцировало регенерацию только почек, не было отмечено ни одного каллуса с ризогенезом. АТХП была менее эффективна по сравнению с 2,4-Д, так как только у 4% каллусов происходила регенерация почек. Питательные среды, в которых происходила индукция ризогенеза, в последующих экспериментах не использовались, так как при последующем культивировании происходил интенсивный синтез эндогенного ауксина, который стимулировал процессы вторичной дедифференцировки организованных структур. Однако ряд исследователей отмечают, что именно сочетание БАП и НУК являлось одним из оптимальных факторов, способствующих регенерации почек и побегов у лука [5]. Вероятно, следует учитывать и влияние генотипа на регенерационную способность каллусов [6; 7].

При изучении влияния морфотипа каллуса на регенерационную способность оказалось, что только каллусы II и III типов были способны к регенерации. В таблице 3 представлены данные, отражающие влияние морфологических осо-

Таблица 3

Влияние морфологии каллуса завязей лука на регенерационную способность

Регуляторы роста, мкМ	Морфотип каллуса	Интенсивность морфогенеза, %	
		почки	корни
БАП8 + АТХПЗ	II	40	20
	III	0	33
БАП8 + 2,4-ДЗ	II	60	30
	III	0	11

бенностей каллуса на его морфогенетический потенциал.

Результаты, представленные в таблице 3, свидетельствуют о том, что большей регенерационной способностью обладал белый каллус с зелеными очагами. Причем в среде с 2,4-Д его морфогенетический потенциал был выше, чем в среде с АТХП.

Каллус, индуцированный от семян, на протяжении всего периода культивирования по морфологии был желтым, рыхлым, оводненным. Такие типы каллусов для многих культур, в том числе и для лука, являются неморфогенными или проявляют очень низкий морфогенетический потенциал.

Наблюдая за динамикой изменения морфогенетических процессов, которые представлены в таблице 4, можно отметить, что с увеличением срока культивирования происходит уменьшение регенерационной способности каллуса, индуцированного от завязей лука, начиная с 3-го пассажа на регенерационной среде с АТХП и с 4-го пассажа – на регенерационной среде с 2,4-Д.

Снижение частоты регенерации с увеличением срока культивирования свидетельствует о том, что каллусы лука в основном реализуют свой морфогенетический потенциал на 9–14 неделе культивирования, т.е. получать растения-регенеранты лука целесообразно не позднее 2–3 пассажей. Такой же подход предпринимали и другие исследователи, работавшие с растениями лука. Кроме того, отмечено, что частота регенерации растений выше при использовании в качестве эксплантов завязей, чем семян [8].

Таблица 4

Частота регенерации (%) плотного белого каллуса с зелеными очагами в зависимости от длительности культивирования

Регуляторы роста, мкМ	Пассаж			
	1	2	3	4
БАП8 + АТХПЗ	8	60	0	0
БАП8 + 2,4-ДЗ	32	92	89	30

Выводы

1. Морфогенетический потенциал каллусных тканей завязей выше, чем у семян.
2. Установлено, что плотный белый каллус с зелеными очагами обладает наивысшей способностью к регенерации почек.
3. Преобладание в среде цитокинина БАП

над ауксинами индуцирует морфогенез в каллусной культуре завязей.

4. Частота регенерации растений из каллусных культур уменьшается с увеличением периода культивирования: наиболее интенсивно процессы морфогенеза происходят на 9–14 неделе культивирования.

Литература

1. Копертек Л.Г., Бутенко Р.Г. Нативные фитогормоны экспланта и морфогенез пшеницы *in vitro* // Физиол. раст. 1995. Т. 42. №4.
2. Кучеренко Л.А. О некоторых параметрах технологии регенерации риса *in vitro* // С/х биология. 1994. №1.
3. Smith B.M., Codwin R.M., Harvey E., Werner C.P. Gynogenesis from whole flowerbuds in bulb onions (*Allium cepa* L.) and luks (*A. purrum* L.) // J. Genet. and Breed. 1991. V. 45. №4.
4. Калинин Ф.М., Сарнацкая В.В., Полищук Е.В. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, 1980.
5. Genesni J.A., Mantinovich L. *In vitro* gynogenesis induction in Hungarian lines of onion (*Allium cepa* L.) // Loidsegetermesztesis hut. intez. bull. 1995. V. 27.
6. Чернышова В.Г., Долгих Ю.И. Влияние генотипа на способность к морфогенезу в культуре тканей кукурузы // Биология культивируемых клеток и биотехн: Тез. докл. междунар. конф. Новосибирск, 1988.
7. Ралдутина Г.Н., Соболюкова Г.И. Факторы, влияющие на органогенез у семядольных эксплантов рапса // Физиол. раст. 1995. Т. 42. №6.
8. Bohanes B., Jakse M., Ihan A., Javornik B. Studies of gynogenesis in onion (*Allium cepa* L.): Induction procedurus and genetic analysis of regenerants // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1995. V. 40. №3.