

УДК 581.085

*Н.А. Вечернина***Регенерация растений в культуре
in vitro семядолей груши**

Регенерация (лат. *regeneratio* – восстановление, возрождение) – восстановление организмом поврежденных или утраченных частей тела. Способность к регенерации широко распространена у растений от низших до высших. В ходе эволюции это свойство растений не только не утрачивается, как в животном мире, а наоборот, совершенствуется и становится разнообразнее. Не теряется способность к регенерации недостающих тканей и органов за счет практически любого участка растительного организма. Даже из одной вегетативной клетки любого органа в экспериментальных условиях можно восстановить целый организм. В этом проявляется свойство тотипотентности растительных клеток (лат. *totus* – весь, целый и *potentia* – сила). Свойство тотипотентности, т.е. способности полностью реализовать генетическую программу развития с образованием целого организма, является одной из примечательных особенностей культивируемых клеток растений. В основе тотипотентности клеток растений лежит присущая всем клеткам высших организмов omnipotentность ядра, т.е. полное сохранение свойственной зиготе генетической программы всеми клетками организма, и кроме того, в отличие от клеток высших животных, отсутствие строгого запрета к повторной экспрессии генов. Последнее позволяет надеяться на возможность индуцирования активности тех генов, которые отвечают за переход в меристематическое состояние с последующей дифференцировкой стеблевого или корневого апексов, или эмбрионной структуры.

Селекционная работа с плодовыми культурами направлена на улучшение комплекса ценных признаков и свойств. Основным методом селекции для них является искусственная половая гибридизация. Однако получение большого количества новых гибридных форм, среди которых будут отобраны лучшие, лимитируется как низким выходом гибридных семян, так и плохой их всхожестью. Одним из подходов, решающих эту проблему, в последнее время является привлечение в традиционную селекционную работу методов биотехнологии. Однако разработке и широкому использованию биотехнологий для улучшения древесных садовых растений препятствует то, что культивируемые ткани часто проявляют строгую зависимость от генотипа, поэтому эмпирическим путем необходимо осуществлять подбор сред для регенерации растений из них. Целью работы явилось изучение влияния экзогенных регуляторов роста на

регенерационные процессы в культуре изолированных тканей семядолей груши.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования являлись семена груши сорта Повислая, полученные от свободного опыления. Плоды груши протирали спиртом и обжигали в пламени спиртовки, в стерильных условиях ламинар-бокса извлекали семена. В качестве первичных эксплантов использовали фрагменты тканей семядолей. Введение в культуру *in vitro* тканей семядолей проводили в середине августа. Каждую семядолю делили на две части и помещали на питательные среды. В качестве основной питательной среды применяли агаризованную среду (0,6% агар) по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [1, с. 115–127], в состав которой вводили экзогенные регуляторы роста: 6-бензиламинопурин (БАП), изопентиладенин (ИПА), 1-нафтилуксусную кислоту (НУК), гибберелловую кислоту (ГК), триодбензойную кислоту (ТИБК). До автоклавирования pH среды доводили до 5,8–5,9. Автоклавировали приготовленные питательные среды в течение 20 мин. при $1 \pm 0,1$ атм. Всего было испытано 8 вариантов питательных сред, в каждом варианте на среды помещалось по 15 фрагментов семядолей.

Ткани семядолей груши в течение первых двух недель культивировали в условиях темноты, а затем культуральные сосуды с эксплантатами для изучения регенерационных процессов переносили в условия фотопериода 16/8 часов свет/темнота при 24 ± 1 °C. Через месяц от начала введения эксплантов в культуру *in vitro* проводили наблюдения. Регенерационную способность культивируемых тканей и органов изучаемых растений оценивали по количеству эксплантов, регенерировавших морфогенные структуры: почки, корни или пролиферирующие каллусную массу.

Результаты исследований и их обсуждение. Независимо от состава питательной среды (по введенным регуляторам роста) в конце 0-пассажа у всех эксплантов увеличилась биомасса, что явилось результатом увеличения клеток в размере. Остальные типы ответов варьировали в зависимости от количества и природы экзогенных регуляторов роста. Необходимо отметить, что на среде без регуляторов роста не происходило нарастания биомассы, к концу 0-пассажа у большинства эксплантов даже произошла дегенерация части клеток эксплантата и уже к середине пассажа большинство из них оказались нежизнеспособными.

В ответ на введение экзогенных регуляторов роста наблюдались такие типы ответов, как каллусогенез, ризогенез и стеблевой органогенез. Частота встречаемости того или иного типа ответов, представленная на рисунках 1–5, позволяет судить о влиянии различного типа регуляторов роста, их сочетаний и концентраций на регенерационную способность изолированных тканей семядолей груши.

Данные, представленные на рисунке 1, свидетельствуют о влиянии на регенерационные процессы цитокинина (БАП) и ауксина (НУК). Причем изменение соотношения между БАП и НУК (от 5 : 1 к 2 : 1) приводит к тому, что часть морфогенных клеток, слагающих эксплант, теряют способность к регенерации почек и приобретают способность к регенерации корней. А такой тип морфогенеза, как ризогенез, не имеет практического значения. Все морфогенные структуры (почки, корни) регенерировали прямым путем. Каллус характеризовался медленными темпами роста и отсутствием регенерационной способности.

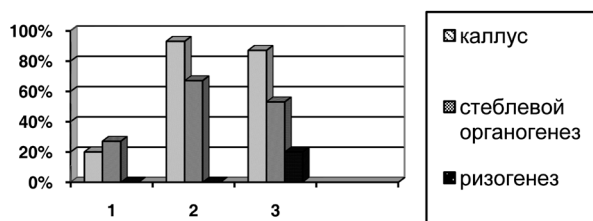


Рис. 1. Влияние БАП и НУК на регенерационную способность изолированных тканей семядолей груши:
1 – МС + 10 мкМ БАП;
2 – МС + 10 мкМ БАП + 2 мкМ НУК;
3 – МС + 10 мкМ БАП + 5 мкМ НУК

Некоторые исследователи отмечают, что добавление в состав питательной среды ауксина отрицательно сказывается на регенерационной способности культивируемых тканей. Так, для ряда гибридов яблони, ткани семядолей которых использовались в качестве эксплантов, добавление в состав среды ауксина НУК снизило частоту регенерации побегов до 41% по сравнению со средой, дополненной только цитокинином БАП (частота регенерации побегов варьировала от 52 до 83%). Эти же исследователи отмечают влияние генотипа на частоту регенерации [2, с. 394]. Однако в нашем исследовании отмечено увеличение частоты стеблевого органогенеза с 27% при использовании только цитокинина БАП до 67% при совместном использовании БАП и НУК.

Целесообразно ли повышение концентрации БАП для того, чтобы повысить частоту регенерации побегов? Мы увеличили вдвое концентрацию БАП (до 20 мкМ). На рисунке 2 представлены результаты, свидетельствующие о том, что все-таки при нарушении соотношения цитокинин : ауксин, даже в случае

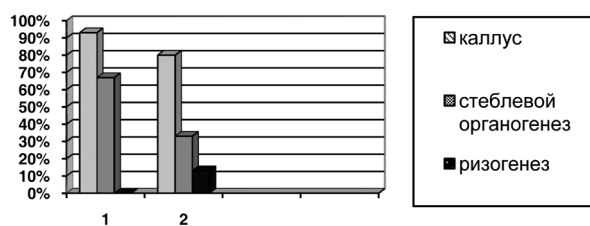


Рис. 2. Влияние концентрации БАП на регенерационную способность изолированных тканей семядолей груши:
1 – МС + 10 мкМ БАП + 2 мкМ НУК;
2 – МС + 20 мкМ БАП + 2 мкМ НУК

преобладания цитокинина над ауксином, может произойти снижение частоты стеблевого органогенеза. В нашем эксперименте частота стеблевого органогенеза снизилась вдвое: с 67% до 33%.

О важном значении определенных групп регуляторов роста цитокининовой и ауксиновой природы говорится во многих работах, связанных с изучением процессов регенерации в культивируемых изолированных тканях. Например, об использовании определенных концентраций и соотношения БАП и НУК для индукции массовой регенерации побегов в культуре тканей семядолей сообщается для таких растений, как чай [3, с. 19], подсолнечник [4, с. 52]. Для культивируемых семядолей от трех сортов вишни изменение природы используемых регуляторов роста приводило к изменению процессов морфогенеза. Показано, что при использовании сочетания 2,4-дихлофеноксиуксусной кислоты и кинетина можно было индуцировать соматический эмбриоидогенез, тогда как замена в составе среды этих регуляторов роста на БАП и НУК индуцировала регенерацию побегов и в значительной степени снижала регенерацию соматических эмбриоидов [5, с. 109]. При использовании в качестве эксплантов тканей листа использование БАП и НУК также индуцировало регенерацию почек и побегов, например у таких растений, как бегония [6, с. 190], диоскорея [7, с. 274], актинидия китайская [8, с. 30].

Для большинства культур в качестве цитокинина используют БАП, который является синтетическим цитокинином. Для некоторых растений он по своему действию оказывается менее эффективным по сравнению с природными цитокининами – зеатином и ИПА. Например, использование зеатина эффективно при регенерации растений в культуре листовых эксплантов у хлопчатника [9, с. 90], а для вересковых, в частности голубики, только использование другого природного цитокинина – ИПА дает возможность получить растения-регенеранты, тогда как применение синтетических цитокининов БАП или кинетина неэффективно совсем [10, с. 35].

Мы помещали также часть фрагментов семядолей на питательную среду, в которой цитокинин БАП был

заменен на ИПА (рис. 3). Данные, представленные на рисунке 3, продемонстрировали, что для груши наиболее эффективным цитокинином является БАП. Природный цитокинин ИПА индуцировал процессы стеблевого органогенеза с меньшей частотой: 47% против 67%. Причем при использовании ИПА отметили массовое заложение почек, но ни в одном случае не было отмечено развития из них побегов, тогда как на среде с БАП за этот же период времени часть почек развилась в побеги. Единичные побеги были высотой 2–3 см.

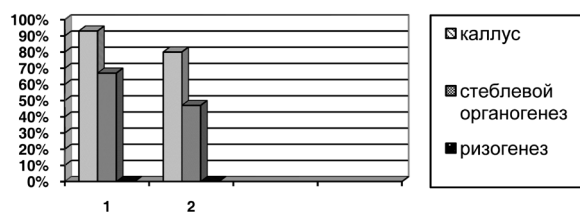


Рис. 3. Влияние природы экзогенного цитокинина на регенерационную способность изолированных тканей семядолей груши: 1 – МС + 10 мкМ БАП + 2 мкМ НУК; 2 – МС + 10 мкМ ИПА + 2 мкМ НУК

При сравнительном изучении индуцирующего действия разных цитокининов (БАП, кинетин, ИПА) земляники было отмечено, что наилучшие показатели по выживаемости и регенерационной способности узелковых сегментов, использованных в качестве эксплантов, наблюдали только на среде с БАП [11, с. 85].

Для некоторых видов растений с целью увеличения регенерационной способности культивируемых тканей или органов в состав питательных сред вводят помимо цитокинина и ауксина другие регуляторы роста, в частности, ГК. Повышение регенерационной способности в присутствии ГК отмечено, например, для таких растений, как ирис [12, с. 141], лилейник [13, с. 126], примула [14, с. 122]. Часть фрагментов семядолей груши помещали на питательную среду, в составе которой присутствовала ГК (5 мкМ, рис. 4).

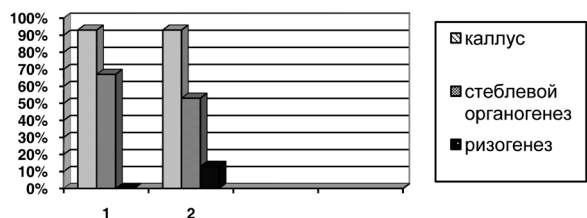


Рис. 4. Влияние экзогенной гибберелловой кислоты на регенерационную способность изолированных тканей семядолей груши: 1 – МС + 10 мкМ БАП + 2 мкМ НУК; 2 – МС + 10 мкМ БАП + 2 мкМ НУК + 5 мкМ ГК

Для тканей семядолей груши использование в составе среды ГК привело к уменьшению частоты регенерации почек, кроме того, присутствие ГК стимулировало развитие некоторых клеток по пути ризогенеза. Частота каллусогенеза при добавлении ГК не изменилась.

Совместно с цитокинином и ауксином в состав среды вводили и изучали действие ингибитора транспорта ауксинов – ТИБК (рис. 5). ТИБК вводили в состав среды совместно с таким сочетанием цитокинина и ауксина, которое предположительно должно было стимулировать развитие каллуса. Как видно из результатов эксперимента, представленных на рисунке 5, добавление ингибитора транспорта ауксинов полностью ингибировало развитие ризогенеза, тогда как частота стеблевого органогенеза не изменилась. Следует отметить также, что ТИБК значительно стимулировала процессы дедифференциации клеток экспланта, что приводило к развитию у подавляющего большинства эксплантов каллуса. Темпы роста каллуса, однако, не отличались от темпов роста каллуса, индуцированного на эксплантах, культивируемых на других вариантах питательных сред. Использование ТИБК в качестве негормонального препарата было предложено как альтернативный путь, способный повлиять на проявление апикального доминирования. Его использование существенно повышало коэффициент размножения у ряда сортов и форм косточковых культур [14, с. 35]. В нашем эксперименте продемонстрировано еще одно физиологическое действие ТИБК – подавление ризогенеза и стимуляция каллусогенеза.

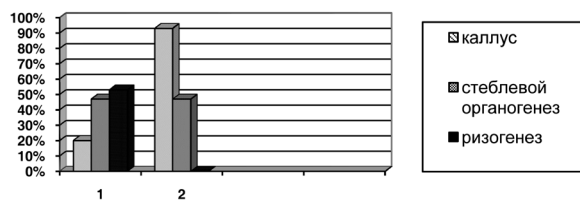


Рис. 5. Влияние экзогенного ингибитора транспорта ауксина (ТИБК) на регенерационную способность изолированных тканей семядолей груши: 1 – МС + 5 мкМ БАП + 5 мкМ НУК; 2 – МС + 5 мкМ БАП + 5 мкМ НУК + 10 мкМ ТИБК

Проанализирована частота встречаемости типов органогенеза на одном фрагменте ткани семядолей груши. Результаты этого анализа даны в таблице. Как видно из представленных данных, у подавляющего большинства фрагментов семядолей в основном наблюдался один из типов органогенеза. Только на трех вариантах питательных сред (среды №3, №6, №7) на одном фрагменте семядоли регенерировали как почки, так и корни. Причем у 20% фрагментов семядолей одновременно два типа морфогенеза были индуцированы путем повышения концентрации НУК и изменения соотношения НУК и БАП. Следовательно, с помощью регуляторов роста можно управлять

Типы органогенеза и их встречаемость, %, на одном фрагменте ткани семядолей груши, n = 15

Регуляторы роста	Частота регенерации, %		
	Почки	Корни	Почки + корни
1. 10 мкМ БАП	47	0	0
2. 10 мкМ БАП + 2 мкМ НУК	67	0	0
3. 10 мкМ БАП + 5 мкМ НУК	47	13	7
4. 10 мкМ ИПА + 2 мкМ НУК	47	0	0
5. 20 мкМ БАП + 2 мкМ НУК	33	13	0
6. 5 мкМ БАП + 5 мкМ НУК	33	33	20
7. 10 мкМ БАП + 2 мкМ + 5 мкМ ГК	40	7	7
8. 5 мкМ БАП + 5 мкМ НУК + 10 мкМ ТИБК	47	0	0

процессами морфогенеза и регенерацией в культуре тканей *in vitro*.

Субкультивирование тканей семядолей проводили на среду МС с 10 мкМ БАП и 2 мкМ НУК. Побеги, имевшие к концу 0-пассажа высоту не менее 1 см, изолировали от тканей и пересаживали на среду В₅ с 2 мкМ БАП. Массовая регенерация почек происходила на средах МС с 10 мкМ ИПА и 2 мкМ НУК, МС с 10 мкМ БАП, 2 мкМ и 5 мкМ ГК, а также МС с 5 мкМ БАП, 5 мкМ НУК и 10 мкМ ТИБК; почки, регенерировавшие на фрагментах тканей семядолей, при субкультивировании их в следующем пассаже на среду МС с 10 мкМ БАП и 2 мкМ НУК развились в побеги. Однако на тех фрагментах семядолей, у которых отсутствовал стеблевой органогенез в 0-пассаже, морфогенные структуры не формировались и при их последующем субкультивировании.

Заключение. В результате поставленного эксперимента установлено, что органогенез в тканях семядолей груши стимулируется изменением соотношения

концентраций цитокининов и ауксинов. Несмотря на то, что изучалось действие различных регуляторов роста в культуре одних и тех же тканей, характеризующихся одинаковым эндогенным гормональным статусом, на одних и тех же вариантах питательных сред частота тех или иных типов ответов варьировала. Такую вариабельность в частоте, а также типе ответов можно объяснить тем, что каждая клетка, имея свою собственную генетическую программу, отвечает на определенные сигналы (регуляторы роста) специфически; более того, одна и та же клетка на разной стадии развития может по-разному отвечать на одни и те же сигналы. В нашем исследовании определены концентрации и соотношения цитокинина и ауксина (10 мкМ БАП и 2 мкМ НУК), позволяющие с относительно высокой частотой (67%) индуцировать процессы регенерации почек в культуре тканей семядолей груши, которые успешно развиваются при последующем культивировании в побеги. После укоренения побегов полученные растения-регенеранты могут быть включены в селекционный процесс.

Библиографический список

1. Калинин, Ф.А. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.А. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев, 1980.
2. Станис, В.А. Влияние фитогормонов на морфогенез семядолей яблони в культуре ткани / В.А. Станис, Г.В. Стане // Физиология растений. – 1991. – 38. – №2.
3. Вечернина, Н.А. Разработка метода индуцирования нормального морфогенеза в длительно поддерживаемой культуре тканей чайного растения / Н.А. Вечернина // Доклады ВАСХНИЛ. – 1991. – №4.
4. Moieni, A. Plant regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) / A. Moieni, P.I. Azad, M.R. Ahmadi // The 2 Intern. Conf. «Agriculture and Natural Resources». Moscow, 1–2 Febr., 2001: Proceedings. – М., 2001.
5. Haoru, T. Somatic embryogenesis and organogenesis from immature embryo cotyledons of three sour cherry cultivars (*Prunus cerasus* L.) / T. Haoru, R. Zhenglong, K. Gabi // Sci. hort. (Neth.). – 2000. – 83. – №2.
6. Lida, A. Mass propagation of Begonia tuberhybrida Voss. plantlets using tissue culture / A. Lida, K. Yabe, L. Wasida, V. Sakurai // Res. Bull. Aichi. – Ken Agr. Res. Center. Nakagute, Aichi. – 1986. – №18.
7. Hiroyuki, K. Micropropagation of Yamatoimo Chinese yam (*Dioscorea opposita*) from immature leaves / K. Hiroyuki, A. Hajime, I. Masashi // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1995. – 40. – №3.
8. Вечернина, Н.А. Регенерация растений актинидии китайской из каллусных культур листьев / Н.А. Вечернина, О.К. Таварткиладзе, В.В. Кутубидзе // Субтроп. культ. – 1990. – №5.
9. Bao-Hong, Z. Plant regeneration via somatic embryogenesis in cotton / Z. Bao-Hong, L. Fang, Y. Chang-Bing // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2000. – 60. – №2.
10. Концевая, И.И. Морфогенетический потенциал листовых эксплантов голубики высокой в условиях *in vitro* / И.И. Концевая, А.А. Яцына // Вести АН Беларуси. – Сер. биол. науки. – 1998. – №1.
11. Bhatt, I.D. Micropropagation of Indian wild strawberry / I.D. Bhatt, U. Dhar // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2000. – 60. – №2.
12. Нурмуханбетова, Г.А. Клональное микроразмножение касатиковых / Г.А. Нурмуханбетова // Физиол. роста и

устойчивости интродуцированных растений в Казахстане : сб. ст. – Алма-Ата, 1986.

13. Вечернина, Н.А. Регенерация и ускоренное размножение лилейника *in vitro* / Н.А. Вечернина, О.К. Таварткиладзе, Л.В. Пронькина // Известия АлтГУ. – 1997. – №1.

14. Бородулина, И.Д. Размножение двух гибридных видов рода *Primula* L. в культуре *in vitro* / И.Д. Бородулина,

Н.А. Вечернина, З.В. Долганова // Растительные ресурсы. – 2001. – №4.

15. Высоцкий, В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного посадочного материала и селекции плодовых и ягодных растений : автореф. дис. ... д-ра с/х наук / В.А. Высоцкий. – М., 1998.