

КОРЗИНА Н.В., МИТРОФАНОВА О.В.

*Никитский ботанический сад — Национальный научный центр,
Украина, АР Крым, г. Ялта, 98648, e-mail: in_vitro@ukr.net*

ИНДУЦИРОВАННЫЙ МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ РАЙОНИРОВАННЫХ И ПЕРСПЕКТИВНЫХ СОРТОВ ЧЕРЕШНИ (*PRUNUS AVIUM* L.) *IN VITRO*

В последние годы в мире все активней проводятся исследования в области биотехнологии садовых культур. Известно, что способность к морфогенезу изолированных органов и тканей зависит от многих факторов, таких как видовая принадлежность, сортоспецифичность, возраст растения-донора, тип первичного экспланта и сроки его введения *in vitro*. Кроме того, имеется ряд сообщений о влиянии таких абиотических факторов, как состав питательной среды, физические условия культивирования (температура, освещенность, влажность) и показано их значение для успешной регенерации растений [2, 5]. Работы ряда авторов свидетельствуют о различных сложностях, возникающих при микроразмножении сортов косточковых плодовых культур, обладающих низкой способностью к морфогенезу по сравнению с подвойными сортами и гибридными формами [1, 4, 8, 14, 15]. К числу таких трудноразмножаемых растений относится черешня (*Prunus avium* L.) — культура, наиболее распространенная в южных регионах Украины и имеющая важное промышленное значение. В связи с недостаточной изученностью вопросов регенерации *in vitro* растений *P. avium* целью данной работы было выявление особенностей морфогенеза эксплантов районированных и перспективных сортов черешни с разными сроками созревания плодов на разных этапах клонального микроразмножения.

Материалы и методы

Для исследований были отобраны сорта черешни (Призерша, Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман и Анонс) разных сроков созревания плодов, произрастающих в коллекционных насаждениях Степного отделения НБС-ННЦ (п. Гвардейское, АР Крым) и в опытном хозяйстве “Мелитопольское” Института орошаемого садоводства им. Н.Ф. Сидоренко (г. Мелитополь). В работе применяли биотехнологические методы, как общепринятые, так и разработанные в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [2, 4, 5]. Экспланты помещали на поверхность агаризованной питательной среды в условиях ламинарного бокса Fatran Lf (Чехия) и культивировали на питательных средах Gamborg и Eveleigh (B5) [11], Quoirin и Lepoivre (QL) [13], Tabachnik и Kester (ТК) [16], Murashige и Skoog (МС) [12] и их модификациях. Для изучения морфогенетических потенциалов органов и тканей в питательную среду в зависимости от этапов микроразмножения добавляли регуляторы роста: 6-бензиламинопурин (БАП), N⁶-(2-изопентил)аденин (2ip), 6-(4-гидрокси-3-метил-2-бутирил-амино)-пурин (зеатин), β-индолил-3-масляную кислоту (ИМК), β-индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), α-нафтилуксусную кислоту (НУК), гибберелловую кислоту (ГК₃). Пробирки с

эксплантами помещали в культуральную комнату с заданным режимом интенсивности освещения (2–3 клк), 16-ти часовым фотопериодом и температурой 23 ± 1 °С.

Результаты и обсуждение

Известно, что для стерилизации растительного материала косточковых плодовых культур используются реагенты: гипохлорит натрия (NaClO) или кальция ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) [1, 14], сулема (HgCl_2) [15], раствор нитрата серебра (AgNO_3) [9]. Однако уровень контаминации эксплантов оставался достаточно высоким. Нами для эксплантов черешни экспериментально определен способ стерилизации, при котором получено минимальное количество инфицированных и потемневших меристем путем погружения вегетативных почек сорта Сказка в 2%-ный раствор гипохлорита натрия (NaClO) на 14–19 минут, и сортов Призерша и Анонс — на 15–18 минут. Для почек сортов Рубиновая Ранняя и Талисман успешным оказалось применение 1,75%-ного и 2%-ного раствора этого антисептика (16 и 15–19 минут соответственно). Показано, что на режим стерилизации оказывают влияние сроки введения эксплантов в культуру *in vitro*. Так, для органов и тканей, изолированных с донорного растения в марте – апреле, положительные результаты были получены при обработке 1,75–2%-ным раствором гипохлорита натрия в течение 12–15 минут. Для почек образцов черешни, отобранных в декабре — феврале, использовали более длительную экспозицию. Наиболее чувствительными к действию стерилизующего вещества оказались вегетативные почки и верхушки растущих побегов сортов черешни раннего (Призерша), раннесреднего (Рубиновая Ранняя) и позднего (Анонс) сроков созревания плодов. Меньше повреждались экспланты сортов среднего (Сказка) и среднепозднего (Талисман) сроков созревания плодов.

Наряду с этим, развитие первичных эксплантов *P. avium* в культуре *in vitro* во многом зависело от фазы вегетации растения. Полученные данные подтвердили, что для всех изученных сортов наиболее оптимальными для изолирования и введения эксплантов в стерильные условия являются февраль — апрель. Таким образом, результаты наших экспериментов показали, что на регенерацию меристем и апексов растущих побегов черешни *in vitro* оказывает влияние совокупность факторов, таких как генотип донорного растения, режимы стерилизации, сроки отбора сортообразцов [7].

При исследовании воздействия трофических факторов на культивирование микропобегов черешни было испытано несколько составов питательных сред, из которых оптимальными оказались среды МС и В5 с высоким содержанием азота, фосфора и калия. Поэтому в дальнейших исследованиях применяли разные модификации этих сред. В зависимости от этапа микроумножения их дополняли регуляторами роста.

Изучение влияния различных ауксинов и цитокининов на регенерацию микропобегов показало стимулирующую роль совместного применения БАП и ГК_3 на этапе введения. Так, для снятия апикального доминирования у первичных эксплантов в питательные среды добавляли вещества цитокинино-

вого типа действия: 2iP, зеатин и БАП. На средах, дополненных 2,46–4,92 мкМ 2iP и 0,73–1,46 мкМ ГК₃, нормальное развитие меристем происходило в течение 10 суток, однако постепенно шчи некротизировались. Применение в опытах зеатина, также как и в случае с 2iP, не показало положительных результатов.

При использовании в качестве регулятора роста ГК₃ выявлено, что первичные экспланты сортов черешни неодинаково реагируют на ее присутствие в среде. Так, концентрации 0,73–1,44 мкМ оказывают индуцирующее действие на развитие меристем сортов Призерша и Рубиновая Ранняя. Наряду с этим для успешной регенерации эксплантов сортов Сказка и Талисман потребовалось увеличение концентрации ГК₃ до 1,44–2,89 мкМ., для сорта Анонс — до 2,16–2,89 мкМ ГК₃. Только у эксплантов сортов Сказка и Рубиновая Ранняя спустя 30 суток после введения развились дополнительные микропобеги, и частота регенерации составила 40% и 8% соответственно [8].

Одним из наиболее сложных этапов клонального микроразмножения является корнеобразование, поэтому опытным путем подобраны концентрации регуляторов роста — НУК (8,06–16,12 мкМ) и ГК₃ (0,73–1,46 мкМ), что способствовало образованию корней у 90% микропобегов *P. avium*. Наиболее интенсивное корнеобразование происходило в период с апреля по июль. При этом корни появлялись уже на 10–12 сутки культивирования, в том числе и в контрольном варианте (среда без регуляторов роста). В остальные месяцы для первичного корнеобразования требовалось минимум 18–20 суток. Установлено, что на этапе укоренения агаризованная питательная среда обладала рядом преимуществ по сравнению с жидкой. На агаризованной среде происходило активное образование корней (3,5±0,64 шт./эксплант) и у регенерантов отсутствовали признаки оводненности. Растения, полученные на жидкой среде, не удалось адаптировать к нестерильным условиям.

Как известно из литературы, процесс формирования корней *in vitro* у древесных растений может происходить различными путями [3]. Расширить представления о морфогенезе микропобегов черешни на этапе ризогенеза нам удалось в результате выявления 4-х типов формирования корней: 1) непосредственно из тканей микропобега; 2) из каллуса; 3) выше базальной части микропобега; 4) смешанный — корни развиваются из базальной части и на микропобеге (без процессов дедифференциации и каллусообразования) [6].

Лучшим субстратом для адаптации растений черешни оказалась смесь из песка, торфа и перлита с рН 6,95. Применение этого стерильного субстрата способствовало приживаемости (63,1%) и дальнейшему развитию регенерантов в условиях *in vivo*.

Выводы

1. В результате проведенных исследований разработаны биотехнологические приемы клонального микроразмножения сортов черешни разных сроков созревания плодов, основанные на регенерации растений из веге-

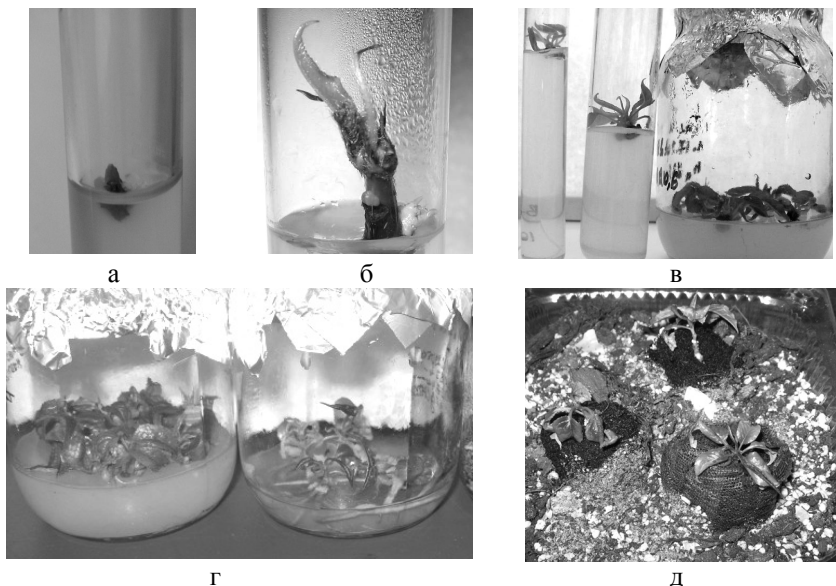


Рис. Этапы клонального микроразмножения растений черешни: а) и б) введение первичных эксплантов; в) регенерация и размножение микропобегов; г) укоренение; д) адаптация *in vivo*

тативных почек и верхушек активно растущих побегов, включающие укоренение микропобегов *in vitro* и адаптацию регенерантов *in vivo* (рис.).

2. Способ клонального микроразмножения черешни может быть использован в биотехнологических и селекционных центрах для получения растений районированных и перспективных сортов *P. avium*.

Литература

1. Бленда А.В. Микроразмножение *in vitro* представителей подсемейства *Prunoideae* // Физиология и биохимия культурных растений.— 2000.— Т.32, №5.— С. 428–434.
2. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений.— М.: Наука.— 1964.— 272 с.
3. Виджешивар П., Митрофанова О.В., Лицук А.И. Клональное микроразмножение актинидии превосходной [*Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Ferguson] / Сб. науч. тр. Никит. ботан. сада.— 1997.— Т.119.— С. 111–126.
4. Диагностика вирусных болезней и биотехнологические приемы получения безвирусного посадочного материала косточковых плодовых культур / Митрофанова О.В., Славгородская—Курпиева Л.Е., Митрофанова И.В., Лукичева Л.А.— Ялта: Крымпресс, 2000.— 46 с.
5. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроразмножения растений.— Киев: Наукова думка.— 1992.— 232 с.

6. Корзина Н.В. Микроразмножение перспективных сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* // Сб. науч. трудов Никит. ботан. сада.— 2009.— Т.131.— С. 112–117.

7. Кузнецова Н.В. Особенности введения первичных эксплантов четырех сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условия *in vitro* / Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: III Междунар. науч. конф., г. Минск, 14–16 мая 2008 г.— Минск, 2008.— С. 265–268.

8. Кузнецова Н.В. Влияние регуляторов роста на регенерационную способность четырех сортов черешни (*Prunus avium* L.) в условиях *in vitro* / Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова / За ред. М.В. Роїка.— К.: Логос, 2008.— Т.5.— С. 287–290.

9. Лукичева Л.А. Особенности клонального микроразмножения безвирусных сортов вишни и сливы // Сб. науч. трудов Никит. ботан. сада.— 1997.— Т.119.— С. 34–45.

10. Митрофанова О.В., Митрофанова И.В., Смыков А.В., Лесникова Н.П. Методы биотехнологии в селекции и размножении субтропических и косточковых плодовых культур // Сб. науч. тр. Никит. ботан. сада.— 1999.— Т.118.— С. 189–199.

11. Gamburg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem.— 1968.— V.46, №5.— P. 417–421.

12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant.— 1962.— Vol.15, №3.— P. 473–497.

13. Quoirin M., Lepoivre Ph. Etude de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus* // Acta Hort.— 1977.— Vol.78.— P. 437–442.

14. Sauer A. *In vitro* — Vermehrung verschiedener genotypen von *Prunus avium* L. // Gartenbauwissenschaft.— 1983.— Bd.48.— S. 124–127.

15. Sedlbk J. *In vitro* shoot proliferation of sweet cherry cultivars Карельова and Rivan // HortScience.— 2008.— Vol.35, №3.— P. 95–98.

16. Tabachnik L., Kester D.E. Shoots culture for Almond and Almond-Peach hybrid clones *in vitro* // HortScience.— 1977.— Vol.12, №6.— P. 545–547.

Резюме

Разработаны биотехнологические приемы клонального микроразмножения 5 сортов черешни (Призерша, Рубиновая Ранняя, Сказка, Талисман, Анонс) с разными сроками созревания плодов. Установлено индуцирующее влияние трофических и гормональных факторов культивирования на регенерацию растений.

Розроблено біотехнологічні прийоми клонального мікророзмноження 5 сортів черешні (Призерка, Рубінова Раня, Сказка, Талісман, Анонс) з різними строками достгання плодів. Встановлено індукуючий вплив на регенерацію рослин трофічних та гормональних факторів культивування.

Biotechnological methods of clonal micropropagation of 5 sweet cherry cultivars (Prizersha, Rubinovaya Rannaya, Skazka, Talisman, Anons) with different periods of fruits ripening have been worked out. Induction influence of trophic and hormonal factors of cultivation on plant regeneration has been determined.

*КРАСНОВ М.С., *ЯМСКОВА В.П., *РЫБАКОВА Е.Ю., КУЛИКОВА О.Г.,
МАРГАСЮК Д.В., ЯМСКОВ И.А.

* Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 26,
e-mail: embbrmsk@mail.ru

Учреждение Российской Академии Наук Институт элементоорганических
соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 28

АКТИВНЫЕ В СВЕРХМАЛЫХ ДОЗАХ БИОРЕГУЛЯТОРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ПОДОРОЖНИКА И АЛОЭ, ОКАЗЫВАЮТ ПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НА КОЖУ В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

Ранее в различных тканях животных нами были идентифицированы биорегуляторы (БР), проявляющие активность в сверхмалых дозах (СМД), соответствующих концентрациям 10^{-8} – 10^{-15} мг/мл. Для исследования БР данной группы был разработан экспериментальный подход, включающий получение тканевого экстракта, содержащего БР, методику очистки, а также метод биотестирования и экспериментальные модели для изучения специфической активности этих биорегуляторов [1–8]. В этих исследованиях было установлено, что БР локализованы во внеклеточном пространстве, а их активность характеризуется наличием тканевой, но отсутствием видовой специфичности. В СМД БР влияют на важнейшие биологические процессы — миграцию, адгезию, пролиферацию, дифференцировку клеток [3–8]. Результаты исследований показали, что данные БР характеризуются сходством ряда физико-химических свойств, а именно: низким значением (менее 10 кДа) молекулярной массы, устойчивостью к воздействию денатурирующих факторов, преобладанием β -структур во вторичной структуре, тенденцией к агрегации, результатом которой является образование наночастиц в водном растворе. Целью настоящей работы явилась идентификация в тканях растительноного происхождения БР данной группы и изучение их специфической активности. В качестве объектов исследования были выбраны лекарственные растения, широко применяемые в медицине, подорожник большой *Plantago major* и алоэ древовидное *Aloe arborescens*.

Материалы и методы

Выделение БР из растений проводили по методике, разработанной для биорегуляторов данной группы [2–8]. Тканевые экстракты получали из свежих листьев подорожника большого и алоэ древовидного, нарезанных на небольшие фрагменты, которые экстрагировали в растворе с pH 6,0, содержащем NH_4NO_3 $2,06 \cdot 10^{-2}$ моль/л; KNO_3 $1,88 \cdot 10^{-2}$ моль/л; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $3 \cdot 10^{-3}$ моль/л; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л; KH_2PO_4 $1,25 \cdot 10^{-3}$ моль/л, в течение 2-х часов при 4 °С. Далее, полученные экстракты дважды высаливали, добавляя сульфат аммония до образования насыщенного раствора. Фракции супернатантов разделяли либо методом изоэлектрофокусирования в градиенте плотности сахарозы (pH 3,5–10,0), либо с помощью ионообменной