

20. Круглова Н.Н. Микроспора злаков как модельная система для изучения путей морфогенеза: Автореф. ...д-ра биол. наук / 03.00.05. – Институт биологии Уфимского центра РАН. – Уфа. – 2002. – 48 с.

#### **Резюме**

Исследована способность к регенерации новообразований в культуре пыльников пшеницы у генотипов, отличающихся продолжительностью периода «всходы-колошение». Показано, что уровень регенерации зеленых растений в культуре пыльников пшеницы выше у генотипов, с более непродолжительным периодом «всходы – колошение». Предложено использовать продолжительность периода «всходы – вакуолизирующая микроспора» при прогнозировании уровня регенерации генотипов в культуре пыльников озимой мягкой пшеницы.

Досліджена регенераційна здатність новоутворень в культурі пиляків у генотипів, які відрізнялися за тривалістю періоду розвитку «сходи-колосіння». Показано, що рівень регенерації зелених рослин в культурі пиляків пшениці вищий у генотипів, із нетривалим періодом «сходи-колосіння». Запропоновано використовувати показник тривалості періоду «сходи-вакуолізована мікроспора» при прогнозуванні рівня регенерації генотипів в культурі пиляків м'якої пшениці.

Research of regeneration ability of new formations in the anther culture of wheat at genotypes different by duration of «ear emergence - heading» period was conducted. It was shown, that the level of regeneration of green plants in the anther culture of wheat is higher at genotypes, with shorter «ear emergence - microspore» period. It was suggested to use duration of period «ear emergence - microspore» at prognostication of genotypes with high level of regeneration in the anther culture of common wheat.

**МИТРОФАНОВА И.В., ЕЖОВ В.Н., ИВАНОВА Н.Н., ЧЕЛОМБИТ С.В.**

*Никитский ботанический сад – Национальный научный центр,  
Украина, 98648, АР Крым, Ялта, e-mail: in\_vitro@ukr.net*

#### **РАЗЛИЧНЫЕ ПУТИ МОРФОГЕНЕЗА *IN VITRO* КАЛАДИУМА (*CALADIUM HORTULANUM* BIRDSEY.) КАК СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ РАСТЕНИЙ**

Каладиум (*Caladium hortulanum* Birdsey.) относится к семейству ароидных и очень популярен среди декоративных растений. Эту культуру в последние годы широко используют для озеленения зимних садов. Однако, известно, что каладиум очень трудно размножается традиционными методами [4].

Первые работы по культуре тканей *C. hortulanum* появились в начале 70-х годов прошлого столетия. Они касались изучения вирусных болезней этой культуры и разработки метода культуры меристем для оздоровления [8]. Значительно позже появились отдельные публикации об исследованиях прямой и непрямой регенерации растений каладиума в условиях *in vitro* [2, 5, 7, 10]. В настоящее время американские ученые работают в области селекции *in vitro* каладиума. Проращивая пыльцу этого растения, они научились в течение короткого времени сохранять ее в условиях *in vitro* [6]. Впервые изучением вопросов соматического эмбриогенеза *in vitro* каладиума начали заниматься в отделе биотехнологии и биохимии растений НБС-ННЦ [3].

Однако результаты всех работ, проводимых с культурой каладиума, показали, что до сих пор не выявлены морфогенетические потенции органов и тканей различных сортов каладиума в условиях *in vitro* и соответственно не разработаны эффективные

биотехнологические системы получения и сохранения этого трудноразмножаемого растения.

Целью настоящего исследования было выявление различных путей морфогенеза растений каладиума (*C. hortulanum*) в условиях *in vitro*.

#### **Материалы и методы**

Исследования по культуре органов и тканей каладиума выполняли на базе отдела биотехнологии и биохимии растений Никитского ботанического сада – Национального научного центра в 2001-2005 гг. Для исследований были отобраны два сорта, из коллекционного генофонда НБС-ННЦ и 3 сорта, любезно предоставленные нам сотрудником Литовского аграрного университета Dr. Simas Gliozeris: сильнорослый – сорт *Triumphe de Compte*, среднерослые – сорта *Pink Gem*, *Gypsy Rose*, *White Christmas*, низкорослый – *Frieda Hempel*. Период вегетации этих растений – с апреля по ноябрь.

Для стерилизации растительных эксплантов, отобранных с взрослых растений в период с мая по сентябрь, использовали различные антисептики, такие как 70%-ный этиловый спирт ( $C_2H_5OH$ ), 1% и 1,8%-ные растворы гипохлорита натрия ( $NaClO$ ), 0,08%-ный раствор  $AgNO_3$ , 1%-ный раствор *Thimerosal* (*Sigma*, США). Эффективность стерилизации повышали за счет добавления в стерилизующие растворы детергента Tween-80 (2-3 капли).

Работу по вычленению первичного экспланта проводили в ламинарных боксах марки «*Fatran Lf*» (Чехия).

Для культивирования эксплантов использовали питательную среду, содержащую минеральные соли по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [9]. Во все питательные среды добавляли 554,93 мкМ мезоинозита, 0,1 мкМ тиамина- $HCl$ , 2,43 мкМ пиридоксина- $HCl$ , 4,06 мкМ никотиновой кислоты, 3% сахарозы, 0,8% агара. рН среды доводили до показателя 5,6.

Для индукции регенерационных процессов *in vitro* каладиума в питательные среды добавляли 1,36-5,56 мкМ зеатина, 1,0-9,0 мкМ тидиазурона (ТДЗ, *Sigma*, США), кинетин (*Sigma*, США) в концентрации 1,39-4,60 мкМ и 5,37 мкМ НУК (*Sigma*, США), БАП (*Sigma*, США) в концентрации 0,89-4,40 мкМ и 1,07-5,37 мкМ НУК, 0,98-2,48 мкМ ИМК (*Sigma*, США).

Высечки листа культивировали в термостате при температуре 25 °С в отсутствие освещения, а также в культуральной комнате на свету при постоянной температуре  $24 \pm 1$  °С, интенсивности освещения  $40 \text{ мкМ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$  и 16-часовом фотопериоде.

Субкультивирование тканей и органов проводили через 30 суток. Каждый эксперимент был поставлен трижды в 10-кратной повторности.

Для приготовления препаратов растительную ткань фиксировали в растворах 2,5% глутарового альдегида с 2% формальдегидом, затем пропитывали пропиленгликолем при  $-20^\circ\text{C}$ , после чего заливали в ПЭГ-1500 [1]. Срезы получали с использованием микротомы «МС-2» (Россия) толщиной 5 и 10 микрон и окрашивали 0,1%-ным водным раствором акридинового оранжевого, 0,5%-ным водным раствором толуидинового синего и DAPI. Препараты исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа «*Leica DMLB*» (Германия).

#### **Результаты и обсуждение**

Известно, что правильный выбор первичного экспланта, способа стерилизации, применение экзогенных регуляторов роста, условия культивирования позволяют регулировать морфогенетические процессы в культуре органов и тканей и получать желаемый результат. В качестве первичных эксплантов были использованы высечки листа и сегменты черешков каладиума сортов *Pink Gem*, *Triumphe de Compte*, *Gypsy Rose*, *Friedf Hempel*, *White Christmas*. Отбор листьев с черешками исследуемых сортов каладиума и введение их в культуру *in vitro* проводили с началом появления нормальных листьев (май) и в период его вегетации по сентябрь включительно. Было установлено,

что листья, отобранные в период с мая по июль, были наиболее морфогенными, при этом частота образования соматических зародышей достигала 86-100%.

Одной из основных проблем, препятствующих успешному применению биотехнологических методов в размножении растений, является стерилизация исходного растительного материала эксплантов для получения асептической культуры. Нам удалось освободить исходный материал от экзогенной бактериальной и грибной инфекции, применяя метод последовательной стерилизации в 1,8%-ном растворе гипохлорита натрия (5 мин) и 70%-ном этаноле (1 мин). Присутствие в качестве антисептиков нитрата серебра и Thimerosal способствовало выходу  $79,3 \pm 5,3\%$  стерильных эксплантов, однако их воздействие вызывало не только сильный ожог тканей, но снижало частоту регенерации микропобегов.

В процессе исследования был модифицирован состав питательной среды МС (С1) и подобраны оптимальные концентрации цитокинина для индукции морфогенетических процессов в тканях листа, приводящих к соматическому эмбриогенезу. Нами было отмечено, что использование зеатина не оказывало индуцирующее действие как на процессы дедифференциации, так и дифференциации тканей листа. В присутствии ТДЗ по периметру высечки листа формировался рыхлый светло-зеленый каллус. Введение кинетина в концентрации 2,32 мкМ способствовало образованию соматических зародышей на 50-72% листовых дисках у исследуемых сортов каладиума.

Вычлняя высечки листа размером 10 x 10 мм из разных зон только что раскрывшейся листовой пластинки и помещая их на питательную среду с кинетином, удалось определить наиболее морфогенные зоны, способные к прямому и непрямому соматическому эмбриогенезу. Это зоны соединения листовой пластинки с черешком и край высечки листа. Период развития от введения первичных эксплантов обоих сортов каладиума в культуру до появления глобулярных структур по краю высечки листа без этапа каллусообразования составил 30 суток.

Наряду с этим было установлено, что путь реализации морфогенетического потенциала эксплантов зависит от условий культивирования. Так, в термостате формировались только соматические зародыши. Эмбриоид в среднем формировал 2-3 корешка. Особых различий в количестве и длине корней у соматических зародышей, образовавшихся из высечек листа и сегментов черешка, отмечено не было. Однако корни у эмбриоидов, развивающихся из листа, были мощнее и имели корневые волоски. На свету происходило три морфогенетических процесса: органогенез в морфогенном каллусе, непрямой и прямой соматический эмбриогенез. В зоне соединения листовой пластинки с черешком эмбриогенные структуры появлялись непосредственно в эпидермальной и субэпидермальной зоне высечки листа. В течение последующих 30 суток наблюдали развитие полноценных соматических зародышей. В присутствии кинетина в питательной среде С1 в концентрации 2,32 мкМ и 5,37 мкМ НУК среднее количество соматических эмбриоидов на эксплант достигало  $10 \pm 1,4$  штук. Последующие пассажи соматических зародышей на питательную среду С1 индуцировали вторичный эмбриогенез. Вторичные эмбриоиды формировались непосредственно на первичных соматических зародышах.

В процессе исследований было выявлено, что на индукционной среде растения развивались очень медленно, поэтому для массового образования растений из эмбриоидов концентрацию НУК уменьшали в 10 раз. Весь процесс от введения эксплантов до регенерации растений составил 3 месяца.

При культивировании *in vitro* высечек листа каладиума на средах с БАП и НУК было отмечено различие в особенностях органогенеза и соматического эмбриогенеза у 5 сортов каладиума. Так, меристематиды, из которых затем развивались адвентивные почки у сорта Pink Gem и Gypsy Rose, формировались в каллусе. При этом у сорта Triumphe de Compte, White Christmas and Frieda Hempel адвентивные почки и

эмбриониды образовывались непосредственно по краю высечки листа без этапа каллусообразования. В результате проведенных исследований установлены оптимальные концентрации регуляторов роста (2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК – питательная среда С2), индуцирующие формирование максимального количества микропобегов и эмбрионидов. Увеличение концентрации регуляторов роста приводило к снижению регенерационного потенциала и оводнению образовавшихся микропобегов. В том случае, когда путь развития экспланта реализовался через непрямую регенерацию микропобегов, в течение 20-30 суток на эксплантах образовывался компактный каллус светло-зеленого цвета. После этапа каллусообразования через 14 суток культивирования отмечали появление меристематидов. Затем на 21 сутки происходила регенерация микропобегов, а в течение последующих 14 суток появлялись корни и развивались полноценные растения. После декапетирования регенерантов в их основании активно закладывались адвентивные почки. Количество адвентивных микропобегов достигало в среднем 15-20 штук на эксплант.

Образование соматических зародышей в эмбрионном каллусе также происходило на питательной среде С2. Однако появление эмбрионидов было отмечено на 7 сутки после образования каллуса. При таком способе формирования эмбрионидов для глобулярных зародышей была характерна более насыщенная зеленая окраска. Формирование соматических зародышей происходило асинхронно: в одно и то же время появлялись новые эмбриониды и развивались растения (рис.). Регенеранты легко отделялись от самого каллуса и их высаживали на адаптацию в условия *in vivo* или доращивали на питательной среде с 0,02 мкМ НУК.

Путем прямой регенерации микропобегов при последовательных субкультивированиях из одного экспланта в течение года можно получить до  $5 \cdot 10^6$  микропобегов. Для укоренения микропобегов каладиума использовали ИМК в концентрации 0,98-2,48 мкМ. Среднее количество корней на эксплант достигало 4,5 штук.



Одновременное развитие эмбрионидов и растений каладиума на среде С2

В результате соматического эмбриогенеза из одной высечки листа можно было получить более  $10 \cdot 10^6$  растений, исключая затраты на стадию укоренения.

Эффективность адаптации регенерантов каладиума в смешанном субстрате торфа и песка (3:1) или в перлите составила 90–96%.

#### **Выводы**

Таким образом, нами установлены оптимальные сроки отбора листьев каладиума (май-июль) для введения в условия *in vitro*. Показано, что в результате применения 1,8%-ный раствора гипохлорита натрия (5 мин) и 70%-ного этанола (1 мин) получено 96,5% эксплантов, свободных от контаминации. На основе изучения действия

экзогенных факторов (кинетина и НУК) на реализацию морфогенетического потенциала высечек листа 5 сортов каладиума определены основные пути регенерации растений и разработаны биотехнологические системы получения и сохранения каладиума через соматический эмбриогенез и органогенез *in vitro*.

#### Литература

1. Дженсен У. Ботаническая гистохимия. – М.: Мир, 1965. – 374 с.
2. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
3. Митрофанова И.В., Соколов О.И., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н. Пути реализации морфогенетического потенциала каладиума (*Caladium hortulanum* Birdsey.) и цветной каллы (*Zantedeschia hybrida*) в условиях *in vitro* // Біологічний вісник. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 64-67.
4. Чуб В., Лезина К. Все о комнатных растениях. – М.: ЭКСМО-Пресс, 2002. – 336 с.
5. Chan L.-K., Tan C.M., Chew G.S. Micropropagation of the Araceae ornamental plants // Acta Horticulturae. – 2003. – N 616. – P. 383-390.
6. Deng Z., Harbaugh B.K. Technique for *in vitro* pollen germination and short-term pollen storage in caladium // HortSci. – 2004. – Vol. 39. – P. 365-367.
7. Gliozieris S., Tamosiunas A., Stuopyte L. Effect of BAP and 2,4-D on *in vitro* regeneration of some cultivars of *Caladium hortulanum* // Plant Tissue Culture: Abstracts 4<sup>th</sup> Intl. Conf. (1-3 Nov. 2001, Dhaka). – Dhaka, 2001. – P. 26.
8. Hartman R.D. Dasheen mosaic virus and other phytopatogen eliminated from caladium, taro and cocoyam by culture of shoot tips // Phytopath. – 1974. – Vol. 64. – P. 237-240.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497.
10. Tamosiunas A., Gliozieris S., Stuopyte L. Prospects for micropropagation of *Caladium* as pot plants production // Plant Tissue Culture: From Theory to Practice: Abstracts Intl. Conf. of Baltic States (27-28 May 2004, Salaspils, Latvia). – Salaspils, 2004. – P. 61.

#### Резюме

На основе соматического эмбриогенеза и органогенеза каладиума разработаны системы *in vitro* получения и сохранения растений. Исследовано влияние концентрации кинетина и БАП на индукцию формирования соматических зародышей и адвентивных почек. Регенеранты были адаптированы *in vivo*.

На основі соматичного ембріогенезу і органогенезу каладіума розроблено системи *in vitro* одержання та збереження рослин. Досліджено вплив концентрації кінетину і БАП на індукцію формування соматичних зародків та адвентивних бруньок. Регенеранти були адаптовані *in vivo*.

On the basis of somatic embryogenesis and organogenesis of caladium the *in vitro* systems of plants obtaining and preservation have been developed. Influence of kinetin and BAP concentration on inducing of somatic embryo and adventive buds formation has been investigated. The regenerants have been transferred to conditions *in vivo*.

**ОРЛОВСКАЯ О.А., САКОВИЧ В.И., ЛЕМЕШ В.А., ХОТЫЛЕВА Л.В.**

*Институт генетики и цитологии НАН Беларуси,*

*Беларусь, 220072, Минск, ул. Академическая, 27, e-mail: O.Orlovskaya@igc.bas-net.by*

**ВЛИЯНИЕ РАЗМЕРА ЭКСПЛАНТА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПОБЕГОВ ИЗ  
ГИПОКОТИЛЬНЫХ СЕГМЕНТОВ РАСТЕНИЙ ЛЬНА**