

**ИННЮТКИНА А. Г., ЕГОРОВА Н. А.**

*Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН,  
АР Крым, 95493, Симферополь, ул. Киевская, 150, e-mail: artemisiadr@gmail.com*

## **ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСО- И МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНОВ ПОЛЫНИ ЭСТРАГОН**

В настоящее время в селекции большинства эфиромасличных и лекарственных растений используются в основном традиционные методы гибридизации и отбора. Повысить эффективность селекционного процесса возможно за счет применения биотехнологических подходов, и в частности, таких клеточных технологий как получение соматональных вариантов, клеточная селекция, мутагенез *in vitro*. Использование этих методов позволяет расширить уровень генетической гетерогенности исходного селекционного материала и получить ценные генотипы. Одним из сложных этапов многих клеточных технологий является индукция морфогенеза в культуре каллусных тканей. Вторичная дифференциация, которая ведет к регенерации растений путем соматического эмбриогенеза или органогенеза, зависит от многих факторов. Среди них наиболее важными являются генотип исходного растения, состав питательных сред и условия культивирования *in vitro* [2]. Высокий уровень генетической детерминированности процессов морфогенеза обуславливает необходимость эмпирическим путем для каждого вида или даже сорта оптимизировать условия культивирования каллусных тканей и регенерации из них растений.

На территории Крымского полуострова произрастает 14 видов полыни, из них 6 отнесены к перспективным для селекционной работы, к их числу относится и полынь эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) [4]. Эстрагон широко применяется в пищевой промышленности при приготовлении маринадов и солений, а также в медицине для повышения аппетита, лечения нарушений обмена веществ, заболеваний почек, цинги и других заболеваний.

В литературе имеются сведения об изучении каллусогенеза и морфогенеза у отдельных представителей рода *Artemisia* L. [3, 5, 6]. Данных об исследовании этих процессов у полыни эстрагон в доступной нам литературе не найдено. Поэтому для разработки клеточных технологий, способствующих повышению эффективности селекции этого ценного растения, актуальным является изучение влияния состава питательной среды, генотипа и типа экспланта на индукцию образования каллуса и регенерацию из него растений, что и явилось целью нашей работы.

### **Материал и методы**

Объектом исследований служили селекционные образцы полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) из коллекции Института эфиромасличных и лекарственных растений УААН — №5р.24, №бр.17, и №7р.1, различающиеся по морфологии и составу эфирного масла. Первичный каллус получали, используя в качестве эксплантов фрагменты стебля, высечки листа и меристемы. Стерилизацию эксплантов проводили с использованием 70%

этанол и 50% раствора препарата “Брадофен”. Асептические экспланты помещали на модифицированную питательную среду Мурасиге и Скуга (МС), дополненную фитогормонами (БАП, кинетин, 2,4-Д, НУК) в различных комбинациях и концентрациях. При введении в культуру, приготовлении питательных сред использовали традиционные для работ по культуре тканей методики [1].

Условия культивирования — температура +26 °С, относительная влажность воздуха 70%, освещенность 2–3 тыс. лк, 16-ти часовой фотопериод.

В конце цикла выращивания определяли частоту каллусогенеза (как отношение числа эксплантов с каллусом к общему числу эксплантов), частоту морфогенеза (как отношение числа эксплантов с морфогенным каллусом к общему числу эксплантов), проводили подсчет количества почек (в расчете на одну пробирку с морфогенным каллусом), а также оценивали интенсивность образования каллуса (визуально по 3-х балльной системе).

Полученные данные обработаны статистически с использованием стандартного приложения пакета статистики в Microsoft Excel. На рисунках представлены средние арифметические и доверительные интервалы при уровне значимости 0,05.

### **Результаты и обсуждение**

На начальном этапе введения в культуру *in vitro* изолированных органов полыни эстрагон была проведена оптимизация режимов стерилизации. Установлено, что для получения 92,5–93,3% асептических эксплантов высечек листа и сегментов стебля стерилизацию следует проводить последовательно 70% этанолом (30 секунд), а затем 50% раствором препарата “Брадофен” (12 минут), а изолированных меристем — раствором препарата “Брадофен” в течение 6 минут.

Через 2 недели культивирования на месте среза, а иногда по всей поверхности экспланта, наблюдали образование светло-бежевого с зелеными участками рыхлого каллуса. Частота каллусогенеза на большинстве испытанных питательных сред у образца №5р.24 была на высоком уровне (95–100%). Исключение составили среды, содержащие кинетин или БАП, на которых не наблюдали образования каллуса из листа и стебля. Частота каллусогенеза из меристемных эксплантов на этих средах составила 20% (МС 21) и 95% (МС 24) с интенсивностью прироста каллуса 1,0–1,1 балла (табл.).

Использование в составе питательных сред регуляторов роста цитокининового и ауксинового типа действия позволило повысить интенсивность образования каллуса. Так, на среде с добавлением 0,5 мг/л БАП и 1,0 мг/л НУК она составила 1,3–2,1 балла. Обратное соотношение концентраций этих двух регуляторов роста (МС 58) снизило значения изучаемых показателей. При добавлении к БАП 1,0 мг/л 2,4-Д интенсивность образования каллуса из меристем составила 2,4 балла, а из листа и стебля — 1,2 балла. Совместное введение кинетина и НУК (МС 72) также увеличило показатели, однако интенсивность каллусообразования была ниже, чем на среде МС 160.

Таблица

**Влияние гормонального состава питательной среды и типа экспланта на индукцию морфогенеза в первичном каллусе полыни эстрагон (образец №5р.24)**

№ питательной среды	Гормональные добавки в питательной среде (мг/л)	Тип экспланта	Частота каллусогенеза, %	Интенсивность образования каллуса, балл	Частота морфогенеза, %	Количество почек, шт./пробирку
МС 24	БАП 1,0	лист	0	-	-	-
		стебель	0	-	-	-
		меристема	95,0±5,0	1,1±0,1	-	-
МС 21	Кинетин 1,0	лист	0	-	-	-
		стебель	0	-	-	-
		меристема	20,0±3,3	1,0±0,0	единичн.	единичн.
МС 72	К 0,5+ НУК 1,0	лист	100,0±0,0	1,2±0,1	-	-
		стебель	100,0±0,0	1,3±0,1	-	-
		меристема	100,0±0,0	1,5±0,1	-	-
МС 160	БАП 0,5+ НУК 1,0	лист	100,0±0,0	1,3±0,1	-	-
		стебель	100,0±0,0	2,1±0,1	-	-
		меристема	100,0±0,0	1,8±0,2	20,5±6,2	4,0±0,8
МС 50	БАП 0,5+ 2,4-Д 1,0	лист	100,0±0,0	1,2±0,1	-	-
		стебель	100,0±0,0	1,2±0,4	-	-
		меристема	100,0±0,0	2,4±0,1	9,8±4,7	1,5±0,5
МС 58	БАП 1,0+ НУК 0,5	лист	100,0±0,0	1,0±0,0	-	-
		стебель	95,0±5,0	1,0±0,0	-	-
		меристема	95,0±5,0	1,6±0,1	15,0±5,0	5,2±0,2

Пассирование в течение шести пассажей каллусных тканей листового и стеблевого происхождения на среде МС 160 обеспечивало интенсивный прирост массы каллуса, ростовой индекс в отдельных вариантах опыта достигал 15–20.

В первичном каллусе стеблевого и листового происхождения в данном эксперименте не наблюдали индукции морфогенеза. Морфогенные очаги были выявлены только в каллусной ткани меристемного происхождения. Морфогенный каллус был зернистым, рыхлым и имел зеленую окраску. В морфогенных зонах наблюдали образование темных зеленых точек, из которых развивались почки, а затем формировались небольшие побеги (2–7 мм).

В первичном каллусе индукция морфогенеза с частотой 9,8–20,5% наблюдалась на средах различного фитогормонального состава. На питательной среде, содержащей 1,0 мг/л кинетина (МС 21), индукция морфогенеза

отмечалась в единичных случаях. При совместном использовании БАП и 2,4-Д частота морфогенеза составила 9,8%, а количество развивающихся почек 1,5 шт./пробирку. Добавление к БАП 0,5 мг/л НУК (МС 58) увеличило частоту морфогенеза до 15%, а количество формирующихся почек до 5,2 шт./пробирку. Изменение соотношения концентраций регуляторов роста — БАП и НУК (МС 160) — способствовало повышению частоты морфогенеза до 20,5%, причем количество почек составило 4,0 шт./на пробирку.

Дальнейшее культивирование морфогенного каллуса на средах различного состава показало, что морфогенный потенциал каллусных тканей полыни эстрагон сохраняется до пятого пассажа.

Введение на среду МС 160 различных типов эксплантов других селекционных образцов (№бр.17, №7р.1) также способствовало индукции каллусо- и морфогенеза. Частота каллусогенеза колебалась от 71% до 100%, в зависимости от генотипа и типа экспланта. Интенсивность каллусообразования у этих образцов была приблизительно одинаковой: из листа и стебля она составила 1,0–1,1 балла, а из меристем — 2,0 балла. При изучении морфогенетической способности первичной каллусной ткани было установлено, что у №бр.17 и №7р.1, также как и у №5р.24, индукция морфогенеза наблюдается при использовании каллусной ткани меристемного происхождения.

Частота индукции морфогенеза была максимальной у образца №7р.1 и составила 73,3%, у образцов №5р.24 и №бр.17 этот показатель ниже (16,7%) (рис.). Количество почек в каллусе, полученном из меристем образцов №5р.24 и №бр.17, также было меньше и не превышало 3,3 шт./пробирку, а у №7р.1 — 4,9 шт./пробирку.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что индукция каллусо- и морфогенеза у полыни эстрагон зависела от генотипа и типа экспланта. Частота образования каллуса в зависимости от генотипа, экспланта и питательной среды варьировала от 0% до 100%, при этом интенсивность его прироста составила 1,0–2,4 баллов. Показано, что в первичной каллусной ткани наблюдалась индукция морфогенеза с частотой

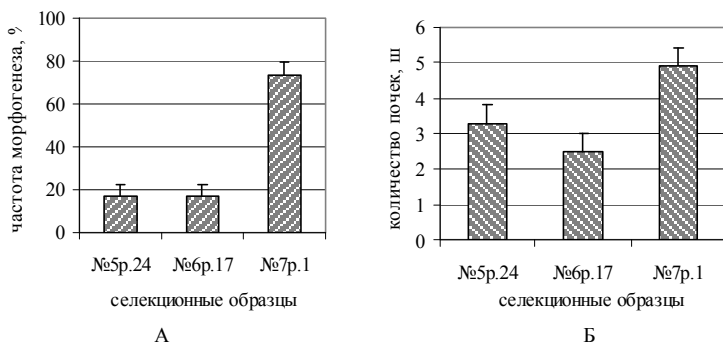


Рис. Влияние генотипа на частоту индукции морфогенеза (А) и количество почек (Б) в каллусе меристемного происхождения полыни эстрагон

от 9,8% до 73,3%. Максимальная частота морфогенеза отмечалась у селекционного образца №7р.1. Из 3-х изученных типов эксплантов (лист, стебель, меристема) морфогенетическими способностями на испытанных питательных средах обладали только каллусные ткани полученные из меристем.

#### Литература

1. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. — К.: Наук. Думка. — 1980. — 488 с.
2. Мельничук М. Д. Биотехнология растений. Пособие. / М.Д. Мельничук, Т.В. Новак, В.А. Кунах. — К.: Поліграф Консалтинг, 2003. — 520 с.
3. Спринчану Е. К. Размножение в культуре *in vitro* полыни лимонной путем индукции образования почек тканями первичного экспланта и каллуса / Е. К.Спринчану, Р.Г. Бутенко // Физиология и биохимия культурных растений. — 1991. — Т.23, №3. — С. 295–301.
4. Хорт Т. П. Дикорастущие полыни Крыма в природе и культуре / Т.П. Хорт, И.Е. Логвиненко // Бюллетень Никитского ботанического сада. — 1987. — Вып.62. — С. 68–73.
5. Kumar Pradeep S. Effect of amino acid and growth regulators on indirect organogenesis in *Artemisia vulgaris* L. / S. Pradeep Kumar, B.D. Ranjitha Kumari // Asian Journal of Biotechnology. — 2010. — V.2, N1. — P. 37–45.
6. Zia M. Hormonal regulation for callogenesis and organogenesis of *Artemisia absintium* L. / M. Zia, Riaz-ur-Rehman, M. F. Chaudhary // African Journal of Biotechnology. — 2007. — Vol.6 (16). — P. 1874–1878.

#### Резюме

Исследована индукция каллусогенеза и морфогенеза в культуре *in vitro* полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.). Показана зависимость этих процессов от генотипа, состава питательной среды и типа экспланта.

Досліджено індукцію калусогенезу та морфогенезу в культурі *in vitro* полину естрагон (*Artemisia dracunculus* L.). Показано залежність цих процесів від генотипу, складу живильного середовища та типу експланта.

Callusogenesis and morphogenesis induction of *Artemisia dracunculus* L. *in vitro* were researched. It was showed dependence of these processes from genotype, medium composition and explant type.

#### КИЩЕНКО Е.М.

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,  
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: iicb@iicb.kiev.ua

### ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА $\beta$ -ГЛЮКУРОНИДАЗЫ ПОД КОНТРОЛЕМ 35S И MII ПРОМОТОРОВ В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

В генноинженерной биотехнологии растений актуальной остается проблема обеспечения высокоэффективной экспрессии рекомбинантных генов. В некоторых случаях, конститутивная сверхэкспрессия нежелательна,