

ВЕСЦІ **НАЦЫЯНАЛЬнай** **АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ**

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК 2012 № 2

ИЗВЕСТИЯ **НАЦИОНАЛЬНОЙ** **АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ**

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2012 № 2

ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 1956 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

PROCEEDINGS **OF THE NATIONAL ACADEMY** **OF SCIENCES OF BELARUS**

BIOLOGICAL SERIES 2012 N 2

FOUNDER IS THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

The Journal has been published since January 1956

Issued four times a year

УДК 581.14.6:634.738

Е. Н. КУТАС, И. Н. МАЛАХОВА, А. А. ГОРЕЦКАЯ, М. В. ГАРАНИНОВА

**РЕГЕНЕРАЦИЯ СЕЛЕКЦИОННЫХ ГИБРИДОВ (СЕМ. VACCINIACEAE S. F. GRAY),
МИНУЯ СТАДИЮ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ НА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ**

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail: vinogradova-kira@tut.by

(Поступила в редакцию 09.06.2011)

Введение. Регенерация растений из ткани листа представляет большой интерес с точки зрения ее использования в системе генетической трансформации с целью получения трансгенных растений с новыми ценными свойствами для дальнейшей селекционной работы, а также для клонального микроразмножения.

Метод листовых дисков, применяемый в последние годы в работе по генной инженерии, позволяет получить регенеранты непосредственно из мезофильных клеток, минуя стадию каллусообразования. Это исключает возникновение широконаблюдаемой при культивировании каллуса фено- и генотипической изменчивости растительных клеток.

При введении в клетку бактериальных плазмид с использованием в качестве векторов Ti- и Ri-плазмиды агробактерий и культивирования их с дисками листа удается получить растения-регенеранты непосредственно из трансформированных клеток ткани листа.

Для многих видов плодовых, ягодных и декоративных растений, у которых получение протопластов и регенерация растений вызывает большие затруднения, использование эксплантов листа является альтернативой для включения чужеродных генов, несущих такие положительные признаки, как устойчивость к гербицидам, вирусам, насекомым и целый ряд других, способствующих улучшению питательной ценности за счет повышения качества белка кормовых и пищевых растений, их сахаристости, крахмалистости. Поэтому не случайно возможность регенерации растений из эксплантов листа привлекает внимание исследователей, работающих как с плодовыми и ягодными культурами [1, 2], так и с другими видами [3, 4].

К настоящему времени получены регенеранты из листовых эксплантов яблони [5], груши [6], малины и ежевики [7], сахарной свеклы [8] и других растений [9–20].

Однако вопросы прямой регенерации растений из листьев селекционных гибридов, представителей семейства Vacciniaceae S. F. Gray, минуя стадию каллусообразования на питательной среде, до сих пор не изучены.

Цель настоящего исследования заключалась в получении регенерантов из эксплантов листа у селекционных гибридов, представителей сем. Vacciniaceae S. F. Gray.

Материалы и методы исследования. В качестве эксплантов использовали листья регенерантов гибридов (селекции О. В. Морозова) трех комбинаций: 1) *Vaccinium vitis-idaea* × *Oxycoccus palustris*, 2) *Vaccinium vitis-idaea* × *Oxycoccus macrocarpus* (var. *Stivens*), 3) *Vaccinium vitis-idaea* × *Vaccinium palustris*, полученных в культуре *in vitro* на питательной среде Андерсена [21]. В опыт брали 4–5 верхних листьев с хорошо развитых побегов, находившихся на среде для размножения в течение 4 недель. Листья помещали на агаризованную питательную среду абаксиальной (нижней) стороной.

В качестве питательной среды использовали базовую среду Андерсена (А) двух модификаций: А – содержащую полную норму макро- и микросолей и 1/2 А, содержащую половинную дозу их. Обе модификации питательной среды были дополнены изопентениладенином (2-иП)

в концентрациях 5, 15, 25 мг/л. Культивирование эксплантов осуществляли при интенсивности освещения 4000 лк, температуре 25 °С, фотопериоде 16 ч. Число посаженных эксплантов для каждой комбинации гибридов составляло 20. Количество эксплантов, образовавших регенеранты, выражали в процентах к общему числу посаженных. Количество регенерантов на один эксплант определяли как среднее из количества эксплантов, регенерировавших побеги. Повторность опытов трехкратная. Статистическая обработка данных проведена исходя из 20 эксплантов на повторность. Экспериментальные данные сведены в табл. 1. В ней приведены средние арифметические и их стандартные ошибки.

Т а б л и ц а 1. Регенерация побегов из листа у селекционных гибридов в зависимости от концентрации 2-иП и состава питательных сред

Вид	Среда	2-иП, мг/л	Число эксплантов			Количество регенерантов на эксплант, шт.
			посажённых, шт.	регенерировавших побеги		
				шт.	%	
1) <i>Vaccinium vitis-idaea</i> × <i>Oxycoccus palustris</i> .	А	5	20	4	20	1 ± 0
		15	20	5	25	5 ± 4
		25	20	7	35	10 ± 8
	1/2 А	5	20	0	0	0
		15	20	2	10	5 ± 3
		25	20	9	45	8 ± 6
2) <i>Vaccinium vitis-idaea</i> × <i>O. macrocarpus</i> (var. <i>Stivens</i>)	А	5	20	1	5	2 ± 0
		15	20	3	15	3 ± 2
		25	20	2	10	11 ± 2
	1/2 А	5	20	0	0	0
		15	20		12	5 ± 3
		25	20	2	10	7 ± 1
3) <i>V. vitis-idaea</i> × <i>V. palustris</i>	А	5	20	1	5	2 ± 0
		15	20	0	0	0
		25	20	4	20	1 ± 0
	1/2 А	5	20	4	20	1 ± 0
		15	20	2	10	1 ± 0
		25	20	6	30	3 ± 1

П р и м е ч а н и е. А – среда Андерсена, содержащая полную норму макро- и микросолей; 1/2 А – среда Андерсена, содержащая половинную норму макро- и микросолей. То же для табл. 2.

Результаты и их обсуждение. Анализ экспериментального материала, представленного в табл. 1, показал, что регенерация побегов зависела от комбинации гибрида, состава питательной среды и концентрации цитокинина в ней. Относительно высокую способность к регенерации проявили листья гибрида первой комбинации (1) *Vaccinium vitis-idaea* × *Oxycoccus palustris*) на обоих типах питательных сред. Максимальное число эксплантов, регенерировавших побеги у данного гибрида, составило 45 % на среде 1/2 А и 35 % на среде А при концентрации 2-иП 25 мг/л в обеих средах. Минимальное число эксплантов (5 %) регенерировавших побеги, отмечено у гибридов второй (2) *Vaccinium vitis-idaea* × *O. macrocarpus* (var. *Stivens*) и третьей комбинаций (3) *V. vitis-idaea* × *V. palustris*) на среде Андерсена при концентрации 5 мг/л 2-иП. Максимальное количество регенерантов на эксплант отмечено у двух гибридов: 1) *Vaccinium vitis-idaea* × *Oxycoccus palustris* (10 ± 8 шт.) и 2) *Vaccinium vitis-idaea* × *O. macrocarpus* (var. *Stivens*) (11 ± 2 шт.) на среде Андерсена при концентрации 25 мг/л 2-иП (табл. 1).

Представляло интерес проследить, оказывает ли влияние на регенерационную способность листа физиологическое состояние побега, из которого отбирали листья для опыта.

В эксперименте в соответствии с методикой, описанной выше, использовали листья гибрида комбинации *Vaccinium vitis-idaea* × *Vaccinium uliginosum* с побегов 4-недельного возраста без корней и 8-недельного с корнями. Результаты эксперимента представлены в табл.2.

Таблица 2. Регенерационная способность гибрида комбинации *Vaccinium vitis-idaea* × *Vaccinium uliginosum* в зависимости от физиологического состояния экспланта

Тип экспланта	Среда	2-иП, мг/л	Число эксплантов			Количество регенерантов на эксплант, шт.
			посаженных, шт.	регенерировавших побеги		
				шт.	%	
Листья с неукорененных регенерантов	А	5	20	7	35	2 ± 0
		15	20	13	65	6 ± 3
		25	20	14	70	10 ± 6
	1/2 А	5	20	1	10	3 ± 1
		15	20	12	60	6 ± 4
		25	20	8	40	9 ± 5
Листья с укорененных регенерантов	А	5	20	1	5	0
		15	20	2	10	4 ± 3
		25	20	4	20	2 ± 0
	1/2 А	5	20	0	0	0
		15	20	0	0	0
		25	20	4	20	2 ± 1

Анализ цифрового материала табл. 2 дает возможность заключить, что регенерация побегов из ткани листа находилась в зависимости от его физиологического состояния.

Так, листья, отобранные с неукорененных побегов, превосходили по количеству регенерантов на эксплант листья, отобранные с укорененных побегов, независимо от типа среды и содержания 2-иП в ней. Этот факт свидетельствует о влиянии физиологического состояния экспланта селекционного гибрида на регенерационный процесс, протекающий в нем. Можно предположить, что на регенерационной способности тех и других листьев сказался различный гормональный статус, обусловленный в одном случае отсутствием корней у побегов, а в другом – их наличием. Это дает основание считать, что для регенерации селекционного гибрида *Vaccinium vitis-idaea* × *Vaccinium uliginosum* из ткани листа следует отбирать листья с неукорененных побегов, так как они обладают большей регенерационной способностью.

Заключение. На основании результатов экспериментальных исследований, полученных по изучению прямой регенерации селекционных гибридов непосредственно из ткани листа, минуя стадию каллусообразования на питательной среде, определен оптимальный состав питательной среды, необходимый для данного процесса. Это позволяет рекомендовать питательную среду Андерсена, содержащую полную норму макро- и микросолей, дополненную изопентениладенином в концентрации 25 мг/л для регенерации изученных нами комбинаций селекционных гибридов, минуя стадию каллусообразования на питательной среде.

Литература

1. James D. J. // Biotechnology and Genetic Engineering. 1987. Vol. 2. P. 33–41.
2. Юркова Г. Н., Сирант Л. В., Труханов В. А. // Цитология и генетика. 1989. Т. 23, № 1. С. 68–69.
3. Gamage N., Nakanishi T. // Acta Horticulturae. 2000. Vol. 1. P. 231–236.
4. Hoffman M., Preil W. // Gartenbauwissenschaft. 1987. Vol. 52, N 4. P. 145–148.
5. Fasolo F., Zimmerman R. H., Fordham I. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1989. Vol. 16, N 2. P. 75–78.
6. Hedrich C. M. // Acta Horticulture. 1977. N 78. P. 177–179.
7. Высоцкий В. А., Упадышев М. Г. // Физиол. растен. 1992. Т. 39, вып. 3. С. 584–591.
8. Detrer C., Tetu T., Sangwan R. S., Sangwan-Norreel B. C. // J. Exp. Bot. 1988. Vol. 39, N 204. P. 917–926.
9. Ellen G., Ahmadi H., Labavitch J. // Acta Horticulturae. 1997. Vol. 1, N 447. P. 243–246.

10. *Jouira H., Bigot C., Dorion N.* // *Acta Horticulturae*. 2000. Vol. 2. P. 520–523.
11. *Liu G., Bao M.* // *Plant Cell Rep.* 2003. Vol. 21. P. 640–644.
12. *Chaturvedi H., Sharma A. K., Agha B. Q. et al.* // *Indian Journal of Biotechnology*. 2004. Vol. 3, N 2. P. 203–208.
13. *Laskar M. A., Lungdoh J. P., Buam J. J., Sylem D.* // *Indian Journal of Biotechnology*. 2005. Vol. 4, N 2. P. 257–260.
14. *Seetharam Y. N., Aravind B., Gururaj C. et al.* // *Indian Journal of Biotechnology*. 2002. Vol. 1, N 4. P. 401–404.
15. *Митрофанова И. В.* // *Интродукция растений*. 2000. № 1. С. 157–158.
16. *Высоцкий В. А., Алексеенко Л. В.* // *Сб. науч. работ ВСТИСП. М., 2005. Т. XII. С. 330–336.*
17. *Anis M., Shahzad A.* // *Propagation of Ornamental Plants*. 2005. Vol. 5, N 3. P. 119–123.
18. *Sivanesan I., Lee Y. M., Song Y. J., Jeong B. R.* // *Propagation of Ornamental Plants*. 2007. Vol. 7, N 4. P. 210–215.
19. *Kanchanapoom K., Buntin N.* // *Journal of Science and Technology*. 2009. Vol. 31, N 6. P. 587–590.
20. *Zhao Y. X., Hui Y. Y., Li F. W., Li P. Z.* // *African Journal of Biotechnology*. 2010. Vol. 9, N 26. P. 4022–4024.
21. *Anderson W. C.* // *Plant Prop. Soc.* 1975. Vol. 25. P. 1929–1935.

E. N. KUTAS, I. N. MALACHOVA, A. A. GORETSKAY, M. V. GARANINOVA

**THE REGENERATION OF SELECTION HYBRIDS (VACCINIACEAE S. F. GRAY)
WITHOUT OF STAGE CALLUSING ON NUTRITION MEDIUM**

Summary

The results of experimental research concerning on direct regeneration of the selection hybrids of leaf tissue are exposed.