

ВЕСЦІ

Scientific Periodicals NASB (online-access)
<http://si.bas-net.by/7107/Pages/mainNAS.asp>

НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК 2013 № 2

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2013 № 2

ЗАСНАВАЛЬНИК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ

Часопіс выдаецца са студзеня 1956 г.
Выходзіць чатыры разы ў год

ИЗВЕСТИЯ НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ 2013 № 2

Серия биологических наук
на русском, белорусском и английском языках
Комп'ютарная вёрстка А. У. Новік

Здадзена ў набор 11.03.2013. Падпісана ў друк 08.04.2013. Выхад у свет 25.04.2013. Фармац 60 × 84 1/8. Папера афсетная.
Друк лічбавы. Ум. друк. арк. 14,88. Ул.-выд. арк. 16,4. Тыраж 88 экз. Заказ 78.
Кошт нумару: індывідуальная падпіска – 38 400 руб., ведамасная падпіска – 95 316 руб.

Рэспубліканскае ўнітарнае прадпрыемства «Выдавецкі дом «Беларуская навука». ЛІ № 02330/0494405 ад 27.03.2009.
Вул. Ф. Скарыны, 40. 220141, Мінск. Пасведчанне аб рэгістрацыі № 395 ад 18.05.2009.

Надрукавана ў РУП «Выдавецкі дом «Беларуская навука».

1

© Выдавецкі дом «Беларуская навука».
Весці НАН Беларусі. Серыя біялагічных навук, 2013

PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS

BIOLOGICAL SERIES 2013 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

**МОРФОГЕНЕЗ СЕЛЕКЦИОННЫХ ГИБРИДОВ (СЕМ. VACCINIACEAE S.F.GRAY)
В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

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

(Поступила в редакцию 04.10.2012)

Введение. Вопросу морфогенеза в культуре клеток и тканей посвящена обширная литература. Ее анализ позволяет прийти к выводу, что морфогенез – сложный и многофакторный процесс, зависящий от типа и физиологического состояния экспланта, состава питательной среды, т. е. компонентов, содержащихся в ней (макро- и микросолей, витаминов, углеводов, гормональных добавок), а также от pH среды, условий культивирования и целого ряда других факторов. Подтверждением этому могут служить многочисленные экспериментальные исследования.

Согласно результатам исследований М. Ф. Шора и Н. Д. Папазяна [1], полученным при изучении процессов морфогенеза в культуре изолированных тканей роз на пяти средах, различающихся концентрацией макросолей и комбинацией гормональных добавок, реализация морфогенеза заключалась в развитии побегов из пазушных почек и формировании каллуса на срезах стебля и черешка листа. Наиболее интенсивное развитие побегов было отмечено на среде Мурасиге-Скуга полного минерального состава с добавлением 1 мг/л НУК.

Из публикации Т. А. Вилор с соавт. [2] следует, что морфогенетические процессы, протекающие у подсолнечника в культуре *in vitro*, находятся в зависимости от типа питательной среды и экспланта. Ими установлено, что лучше всего каллус формировался на средах Эриксона и Мурасиге-Скуга из апикальной меристемы стебля, а на среде Уайта – из листа. Образование побегов с корнями авторы наблюдали только из апикальной меристемы.

О роли ауксинов и цитокининов в регуляции морфогенеза свидетельствуют экспериментальные исследования, проведенные Н. V. Budagovskaya et al. [3]. В качестве эксплантов использовали листья и верхушки молодых побегов злаков, выращенных в асептических условиях, а также листья взрослых растений, культивируемых в полевых условиях. Авторы приходят к выводу, что каллусы лучше образуются на эксплантах, взятых от взрослых растений, выращенных в поле, при содержании в среде 1 мг/л бензиладенина и 1,2 мг/л нафтилуксусной кислоты (НУК). Побегообразование отмечено на среде Мурасиге-Скуга, содержащей 2 мг/л бензиладенина.

S. C. Guta и N. Chandra [4] изучали влияние различных регуляторов роста бензиламинопурина (БАП), индолилуксусной кислоты (ИУК), гибберелловой кислоты (ГК) на морфогенез различных типов эксплантов табака: кусочки листа без центральной жилки, изолированные из 2–4 верхних листьев; отрезки междоузлий, изолированные второго верхнего междоузлия; полоски ткани эпидермиса с несколькими примыкающими слоями клеток, изолированные из молодых междоузлий. Экспериментальные данные позволили авторам прийти к выводу, что ГК в концентрации 0,5 мг/л стимулировала формирование почек только на эксплантах кусочков листа; кинетин и НУК способствовали образованию вегетативных почек на эксплантах стебля, а кинетин – на эксплантах листа.

Цель исследования – подбор оптимального состава питательных сред для индукции морфогенеза у селекционных гибридов сем. *Vacciniaceae* S.F. Gray.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали гибриды четырех комбинаций: 1) *Vaccinium vitis-idaea* × *Oxycoccus palustris*, 2) *V. vitis-idaea* × *O. macrocarpus* (var. *Stivens*), 3) *V. vitis-idaea* × *V. palustris*, 4) *V. vitis-idaea* × *V. uliginosum* (селекции

О.В. Морозова). Эксплантами служили микрочеренки регенерантов перечисленных гибридов, а также эпикотиль, гипокотиль, семядоли, корешок, листья ювенильных проростков, полученных нами ранее в асептических условиях на модифицированной питательной среде Андерсена.

Стерильные экспланты высаживали на три питательные среды: Мурасиге-Скуга, WPM и Андерсена девяти модификаций (табл. 1) в колбы одинакового объема по 15 мл среды в каждой. Высаженный материал культивировали при температуре 26 °С, влажности воздуха 56 %, фотопериоде 16 ч, освещенности 4000 лк. Повторность опытов трехкратная. Учитывалось количество побегов на эксплант (шт.), каллусообразование (мг) спустя 45 дней с момента высадки эксплантов на питательную среду. Статистическая обработка данных проведена исходя из 20 эксплантов на повторность. Экспериментальные данные сведены в табл. 2–3. В них приведены средние арифметические и их стандартные ошибки.

Т а б л и ц а 1. Состав питательных сред для изучения морфогенеза селекционных гибридов (сем. *Vacciniaceae*)

Компонент, мг/л	Модификация среды								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Соли и витамины по MS	+	–	1/2	+	–	–	–	–	–
Соли и витамины по WPM	–	+	–	–	–	–	–	+	–
Соли и витамины по Андерсену	–	–	–	–	+	+	+	–	+
Мезоинозит	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Аденинсульфат	–	80	80	80	80	40	60	80	80
Тиамин	0,4	–	–	0,4	–	0,1	0,1	0,4	0,1
Пиридоксин	–	–	–	0,4	–	–	–	–	–
Индолилуксусная кислота	1,0	5,0	–	2,0	2,0	1,5	2,5	4,0	4,0
Гибберелловая кислота	–	4,0	–	–	–	–	–	–	–
Нафтилуксусная кислота	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Бензиламинопурин	–	–	–	–	–	2,0	–	–	–
Изопентениладенин	10	10	2,0	5,0	4,0	–	10	15	15
Сахароза, г/л	20	20	20	30	30	20	20	30	30
Агар, г/л	9	9	9	9	9	9	9	9	9
pH	4,8	4,8	4,8	4,8	4,0	4,0	4,0	4,8	4,8

П р и м е ч а н и е. Знак (+) – компонент присутствует в среде; знак (–) – компонент отсутствует в среде; 1/2 – половинная доза компонента в среде.

Т а б л и ц а 2. Побегообразование у селекционных гибридов в зависимости от состава питательной среды

Номер модификации среды	Количество регенерантов на эксплант, шт.			
	<i>Vaccinium vitis-idaea</i> × <i>Oxycoccus palustris</i>	<i>V. vitis-idaea</i> × <i>O. macrocarpus</i> (var. <i>Sivens</i>)	<i>V. vitis-idaea</i> × <i>V. palustris</i>	<i>V. vitis-idaea</i> × <i>V. uliginosum</i>
1	8,6±1,3	7,8±1,9	8,2±1,1	7,5±1,4
2	7,6±1,4	7,3±2,1	7,7±1,3	7,2±1,2
3	2,1±1,2	2,4±1,0	2,8±0,2	2,3±1,1
4	3,2±1,4	4,9±1,1	4,2±1,3	5,1±1,8
5	5,6±1,3	5,1±1,4	5,0±2,1	4,3±1,2
6	1,2±1,1	0,8±0,1	1,2±0,4	0,7±0,1
7	1,4±1,7	1,8±1,1	1,3±0,1	1,7±1,0
8	14±2,0	13±1,0	14,5±2,1	13,6±1,8
9	17±1,0	15±2,0	16,0±2,0	15,1±2,3

Т а б л и ц а 3. Морфогенез у селекционных гибридов в зависимости от состава питательной среды на примере *Vaccinium vitis-idaea* × *Oxycoccus palustris*

Номер модификации среды	Количество регенерантов на один эксплант, шт.						
	каллус, мг	побеги, шт.	Источник эксплантов				
			корешок	гипокотиль	эпикотиль	семядоли	листья
1	42,7±4,1	1,0±0,0	+	+	+	+	+
2	176,6±3,9	13,0±2,0	++	++	++	++	++
3	140,0±4,2	10,0±1,0	++	++	++	++	++
4	220,0±3,5	24,0±3,0	+++	+++	+++	+++	+++
5	116,7±17,1	17,0±2,0	+++	+++	+++	+++	++++
6	45,9±1,5	2,0±1,0	+	+	+	+	+
7	90,0±2,0	6,0±1,0	+	+	+	+	+
8	129,0±1,5	9,0±1,0	++	++	++	++	++
9	310,0±7,0	22,0±2,0	+++	+++	+++	+++	+++

П р и м е ч а н и е. Знак (+) – морфогенез низкий; знак (++) – средний; знак (+++) – высокий.

Результаты и их обсуждение. По истечении четырех недель культивирования из одного микрочеренка образовалось в среднем от 1 до 8 микропобегов в зависимости от состава питательной среды (табл. 2). У остальных эксплантов (эпикотилия, гипокотилия, семядолей, корешка, листьев) через 5–6 недель культивирования образовался органогенный каллус с последующей регенерацией из него вегетативных побегов. При этом следует отметить, что образование органогенного каллуса и дальнейшая регенерация побегов характерны для эксплантов (корешка, эпикотилия, гипокотилия, семядолей, листьев), полученных из свежесобранных семян, а для эксплантов, полученных из семян, прошедших стратификацию, побегообразование происходило непосредственно из ткани экспланта, минуя стадию каллусообразования. Логично предположить, что это может быть связано с неодинаковым протеканием физиологических, биохимических, цитологических и других процессов у эксплантов из свежесобранных и стратифицированных семян, а также с разным содержанием эндогенных фитогормонов в них. Вероятно, все вместе взятое послужило основой для регенерации побегов из каллуса без предварительного его пассирования на питательную среду другого состава. Иными словами, индукция каллусогенеза, а затем побегообразование происходили на среде одного и того же состава.

Из табл. 3 следует, что самым высоким морфогенетическим потенциалом обладают все без исключения экспланты на двух средах: WPM и Андерсена двух модификаций (№ 8, 9, см. табл. 1). В данном случае в основе морфогенеза лежит способность клеток эксплантов дедифференцироваться, т. е. терять свою прежнюю специализацию и превращаться в каллусные клетки. Превращение специализированных клеток в каллусные связано с индукцией клеточного деления, способность к которому клетки потеряли в процессе дифференциации [5].

Согласно теории Скуга и Миллера [6], процесс морфогенеза начинается от перехода клетки к инициации организованного развития и является результатом изменения баланса между фитогормонами. Ими было установлено, что превышение содержания ауксина над цитокинином в среде вызывает индукцию корней; обратное соотношение, т. е. превышение цитокинина над ауксином, приводит к образованию почек и стеблевых побегов.

Можно полагать, что различия между клетками и тканями по содержанию эндогенных фитогормонов определяют разный характер их поведения в изолированной культуре и неодинаковые потребности в компонентах среды.

Каллусные клетки (за исключением ауксин- и цитокининнезависимых опухолевых клеток) не могут сами синтезировать фитогормоны в достаточных количествах, необходимых для индукции процессов морфогенеза, поэтому нуждаются в экзогенных регуляторах роста. Каллусные клетки только при определенном соотношении цитокининов и ауксинов в среде могут перейти к организованному росту и формированию побегов. Это соотношение для каждого вида растения устанавливается экспериментальным путем. Подтверждением этому могут служить много-

численные исследования, касающиеся регуляции морфогенеза в культуре клеток и тканей с помощью определенного соотношения ауксинов и цитокининов в питательной среде [7–10].

Нашими исследованиями показано, что для образования регенерантов селекционных гибридов четырех комбинаций из каллусной ткани в питательную среду необходимо добавлять цитокинины и ауксины в следующих соотношениях: 2,5 : 1 (среда № 4), 2 : 1 (среда № 5), 3,75 : 1 (среда № 8 и № 9).

Как показал анализ результатов экспериментальных исследований, полученных по изучению морфогенеза селекционных гибридов четырех комбинаций на девяти модификациях питательных сред, различающихся по содержанию макро- и микросолей, гормональных добавок, лучшими для морфогенеза изученных гибридов оказались среды 8-й и 9-й модификаций, содержащие в своем составе макро- и микроэлементы по WPM и Андерсону, а также гормональные добавки: 4 мг/л ИУК и 15 мг/л изопентениладенина (табл. 1). На средах 8-й и 9-й модификаций в сравнении с таковыми 1-й, 2-й, 3-й, 4-й, 5-й, 6-й и 7-й получено максимальное количество побегов на эксплант от 13 до 17 в зависимости от комбинации гибрида (табл. 2). На основании изучения морфогенетических процессов, протекающих у эксплантов на различных модификациях питательных сред, показана принципиальная возможность регенерации селекционных гибридов двумя методами: 1) путем активации пазушных меристем, 2) через пролиферацию каллуса и последующее образование из него регенерантов.

Заключение. В результате исследования, проведенного по изучению процессов морфогенеза селекционных гибридов (сем. Vacciniaceae) на различных модификациях питательных сред, определен оптимальный состав питательной среды для протекания этого процесса. Показана принципиальная возможность регенерации селекционных гибридов двумя методами: 1) путем активации пазушных меристем, 2) через пролиферацию каллуса и последующее образование из него побегов. Лучшими для морфогенеза изученных гибридов оказались среды 8-й и 9-й модификаций, содержащие в своем составе макро- и микроэлементы по WPM и Андерсену, а также гормональные добавки: 4 мг/л индолилуксусной кислоты и 15 мг/л изопентениладенина.

Литература

1. Шор М. Ф., Папазян Н. Д. Изучение процессов морфогенеза в культуре изолированных тканей роз / Рос. акад. наук, Ин-т физиологии растений. М., 1989. Деп. в ВИНТИ 19.04.89, № 2572-889.
2. Вилор Т. А., Гапоненко А. К., Мелконова Н. М. Выбор оптимальной питательной среды для подсолнечника / Рос. акад. наук, Ин-т физиологии растений. М., 1987. Деп. в ВИНТИ 19.01.87, № 382 – 387.
3. Budagovskaya H. V., Kara A. N., Kotov A. A. // Plant Physiol. 1990. Vol. 79, N 2, pt. 2. P. 7.
4. Gupta S. C., Chandra N. // Indian. J. Plant. Physiol. 1985. N 2. P. 145–150.
5. Бутенко П. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. М., 1975.
6. Skoog F., Miller C. O. // Indian. J. Plant. Physiol. 1957. N 11. P. 118–123.
7. Christopher T., Prolaram B., Rajam M. V., Subhash K. // Indian. J. Exp. Biol. 1987. Vol. 25, N 5. P. 349–350.
8. Маковейчук А. Ю. Эмбриогенез как модель коррелятивного взаимодействия фитогормонов // Второй съезд Всесоюз. Об-ва физиологов растений. материалы Междунар. науч. конф., Минск, 24–29 сент. 1990 г. Мн., 1990. С. 58.
9. Mohamed M. A., Alsdon A. A. // Biologia Plantarum. 2011. Vol. 55, N 2. P. 370–374.
10. Sharaf A. R. N., Hamidoghli Y., Zakizadeh H. // Horticulture, Environment and Biotechnology. 2011. Vol. 52, N 3. P. 298–302.

E. N. KUTAS, I. N. MALACHOVA, A. A. GORETSKAY

THE MORPHOGENESIS OF SELECTION HYBRIDS (VACCINIACEAE S.F. GRAY) *IN VITRO* CULTURE

Summary

The results of experimental research concerning the influence of culture medium on the morphogenesis of the selection hybrids *in vitro* culture are exposed.