

УДК 581.14.6:634.738

*Член-корреспондент Е. А. СИДОРОВИЧ, Е. Н. КУТАС, Н. Г. БРЕЛЬ*

## РЕГЕНЕРАЦИЯ IN VITRO ИЗ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

В настоящее время неоспоримо преимущество клонального микро-размножения перед традиционными методами вегетативного и генеративного размножения растений. Разнообразны области его применения: сельское и лесное хозяйство, цветоводство, медицинская и пищевая промышленности. В последнее время намечается тенденция к их расширению: сохранение редких и исчезающих видов растений, охрана окружающей среды.

Основопологающим моментом не только клонального микро-размножения, но и всей методологии культуры клеток и тканей является регенерация растений. Без регенерации теряют смысл исследования по гибридизации протопластов, промышленному клонированию материала с целью быстрого размножения необходимых или трудно размножаемых видов растений.

На основании экспериментальных исследований, полученных нами ранее [1, 2] в результате морфогенетических процессов, протекающих у эксплантов интродуцированных сортов брусники обыкновенной в культуре клеток и тканей, показана принципиальная возможность размножать ее двумя методами: активацией пазушных меристем и через пролиферацию каллуса. Не умаляя значения этих методов для клонального микро-размножения, особый интерес представляет регенерация растений из листовых эксплантов с точки зрения использования ее в системе генетической трансформации с целью получения трансгенных растений с новыми ценными свойствами для дальнейшей селекционной работы, а также для клонального микро-размножения.

В последние годы в работе по геной инженерии метод листовых дисков нашел широкое применение, так как позволяет получить растения-регенеранты непосредственно из мезофильных клеток, минуя стадию каллусообразования. Это исключает возможность появления фено- и генотипической изменчивости клеток. При введении в клетку бактериальных плазмид этим методом удается получить растения-регенеранты непосредственно из трансформированных клеток листовых дисков.

Для многих видов плодовых и ягодных культур, у которых получение протопластов и регенерация растений сильно затруднены, система листовых эксплантов является наиболее приемлемой для включения чужеродных генов.

Поэтому не случайно возможность регенерации растений из эксплантов листа привлекает внимание исследователей, работающих как с плодовыми и ягодными культурами, так и с другими видами.

К настоящему времени регенерированы адвентивные побеги из изолированных листьев некоторых подвоев и сортов яблонь [3—5],

Т а б л и ц а 2. Регенерационный потенциал различных типов эксплантов *Vaccinium vitis-idaea* в зависимости от концентрации гормона в среде и типа экспланта

Сорт	2-иП, мг/л	Тип экспланта					
		целые листья			кусочки листьев		
		верхние	средние	нижние	верхних	средних	нижних
		число регенерантов на один эксплант					
Masovia	5	4,0 ± 2,0	3,5 ± 2,5	4,0 ± 3,0	1,5 ± 0,5	1,0 ± 1,0	1,5 ± 1,5
	15	5,5 ± 2,5	5,0 ± 3,0	5,5 ± 3,5	2,0 ± 2,0	2,0 ± 2,0	2,0 ± 2,0
	25	3,0 ± 2,0	3,5 ± 2,5	3,5 ± 2,5	1,0 ± 1,0	1,0 ± 1,0	1,0 ± 1,0
Erntedank	5	6,5 ± 3,5	5,5 ± 2,5	5,5 ± 3,5	3,0 ± 3,0	2,5 ± 2,5	2,5 ± 2,5
	15	12,5 ± 2,5	12,0 ± 3,0	12,5 ± 2,5	6,5 ± 2,5	6,0 ± 3,0	5,5 ± 3,5
	25	2,5 ± 1,5	3,0 ± 2,0	2,5 ± 1,5	0,5 ± 0,5	1,0 ± 1,0	1,0 ± 1,0
Koralle	5	2,0 ± 1,0	2,0 ± 1,0	2,5 ± 1,5	0,5 ± 0,5	1,0 ± 1,0	1,0 ± 1,0
	15	3,5 ± 1,5	3,5 ± 2,5	3,0 ± 2,0	1,5 ± 1,5	1,0 ± 1,0	1,0 ± 1,0
	25	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5	1,0 ± 1,0	0,5 ± 0,5

Наибольший выход регенерантов на один эксплант получен у целых листьев при добавлении в питательную среду 2-иП в количестве 5 и 15 мг/л (табл. 2). У кусочков листьев этот показатель значительно ниже. Максимальное число регенерантов на один эксплант (12,5) отмечено у сорта Erntedank у целых листьев при содержании 15 мг/л 2-иП в питательной среде, у кусочков листьев этот показатель ниже (6,5).

Как показал сравнительный анализ регенерационной способности целых листьев и кусочков листа, целые листья обладали большей регенерационной способностью по сравнению с кусочками листа. В большинстве случаев кусочки листа некротизировали. Можно думать, что при использовании в качестве эксплантов кусочков листа нарушается функциональная целостность листа как органа, а при механическом повреждении экспланта происходит его сильное фенольное окисление, что вызывает некроз экспланта (следует отметить, что интродуцированные сорта брусники богаты фенольными соединениями, что особенно затрудняет работу с ними в культуре *in vitro*). Все это, с нашей точки зрения, приводит к снижению регенерационного потенциала в случае использования кусочков листа по сравнению с целыми листьями, хотя не исключена возможность (такие данные имеются в литературе для других видов растений) достичь лучших результатов по их регенерации при использовании листовых дисков (табак, томаты и др.).

В результате проведения анатомических исследований первые признаки проявления регенерационной активности в эксплантах были отмечены к концу второй недели культивирования, т. е. через 13 дней. Высокими меристематическими потенциалами обладали клетки субэпидермального слоя мезофилла адаксиальной стороны листа в зоне центральной жилки у основания листовой пластинки. Менее активными были клетки в средней и верхней частях листа.

На наш взгляд, одной из причин активной регенерации побегов у основания листовой пластинки является высокая активность меристематической ткани (из которой образуется почка, дающая начало побегу), обусловленная направленностью транспорта ассимилятов в растении. Общеизвестно, что транспорт ассимилятов осуществляется от верхушки к основанию листа даже в случае его отделения от побега. При этом происходит увеличение содержания сахаров и других веществ по направлению от более тонких боковых жилок к средней жилке и черешку листа, что в свою очередь способствует обильной регенерации побегов у основания листовой пластинки.

винограда [6], хурмы [7], малины и ежевики [8], груши [9], других видов растений [10—14].

Однако вопросы регенерации растений из изолированных листьев интродуцированных сортов брусники обыкновенной практически не изучены. Имеются лишь отдельные сообщения, в которых отмечен факт образования адвентивных почек на листовых эксплантах голубики высокой [15] — растения, принадлежащего к тому же роду, что и брусника.

Цель настоящей работы заключалась в получении регенерантов из эксплантов листа интродуцированных сортов брусники обыкновенной в связи с решением задач клонального микроразмножения и генной инженерии.

В качестве объектов исследования использовали регенеранты трех интродуцированных сортов брусники обыкновенной, полученные нами в культуре *in vitro* методом активации пазушных меристем [1, 2].

Эксплантами служили целые листья и их кусочки из верхней, средней и нижней частей микропобега. Экспланты помещали на модифицированную питательную среду Woody Plant Medium (WPM), содержащую половинную норму макро- и микросолей, с добавлением следующих компонентов, мг/л: мезоинозит — 100, аденин сульфат — 80, глицин — 2, тиамин — 1, пиридоксин — 1, никотиновая кислота — 1, сахараза — 30, агар — 7; pH 4,0. Из регуляторов роста в питательную среду включали изопентениладенин в диапазоне концентраций 5—25 мг/л.

Культивирование проводили при интенсивности освещения 4000 лк, температуре 25°C, фотопериоде 16 ч. Число повторений в каждом варианте равно 10. Количество эксплантов, давших регенеранты, выражали в процентах к общему числу посаженных, учитывая среднее число побегов на один эксплант. Цифровой материал сведен в табл. 1 и 2.

Как показали результаты экспериментальных исследований, регенерация побегов у эксплантов зависела от типа экспланта, количества изопентениладенина в питательной среде и сортовых особенностей материала.

Относительно высокую способность к регенерации проявили целые листья независимо от их местоположения на побеге у всех исследованных сортов при содержании изопентениладенина (2-иП) 5 и 15 мг/л (табл. 1). Например, для сорта Masovia этот показатель был равен 77,1—76,2%. У кусочков листьев процент эксплантов, регенерировавших побеги, резко снизился и составил 10,1—7,4 (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Процент эксплантов *Vaccinium vitis-idaea*, регенерировавших побеги в зависимости от концентрации гормона в среде и типа экспланта

Сорт	2-иП, мг/л	Тип экспланта					
		целые листья			кусочки листьев		
		верхние	средние	нижние	верхних	средних	нижних
Masovia	5	77,1	77,0	76,2	10,1	9,2	7,4
	15	70,2	70,1	69,0	8,2	5,3	3,9
	25	17,5	16,3	16,0	1,1	0,0	1,2
Erntedank	5	48,5	49,0	49,5	5,3	4,1	5,1
	15	50,0	48,9	50,4	2,7	1,3	3,4
	25	28,5	28,0	27,6	0,0	0,0	1,5
Koralle	5	46,5	47,0	46,6	4,2	4,3	5,0
	15	38,0	37,3	38,5	3,5	2,9	0,0
	25	25,6	24,7	24,0	1,0	0,0	0,0

П р и м е ч а н и е. На большинстве кусочков наблюдали некроз независимо от концентрации 2-иП в среде.

Тот факт, что регенерация побегов происходила непосредственно из клеток мезофилла листа, минуя стадию образования каллуса, дает нам основание полагать, что полученный таким образом материал идентичен материнскому, т. е. сохранена его сортовая принадлежность, что особенно важно при клональном микроразмножении. Кроме того, метод прямой регенерации интродуцированных сортов брусники обыкновенной из мезофильных клеток листа может быть использован в целях генетической трансформации.

Таким образом, показана принципиальная возможность получения растений-регенерантов интродуцированных сортов брусники обыкновенной, обладающих высоким содержанием фенольных соединений, непосредственно из ткани листа.

Разработанный метод прямой регенерации побегов из мезофильных клеток листа у интродуцированных сортов брусники обыкновенной позволит исключить возникновение фено- и генотипической изменчивости растительных клеток, возможной при культивировании каллуса.

Благодаря разработанному методу при введении в клетку бактериальных плазмид реально получить растения-регенеранты интродуцированных сортов брусники обыкновенной непосредственно из трансформированных клеток листовой ткани.

### Summary

Regeneration of *Vaccinium vitis-idaea* L. introduced varieties from leaf tissue in vitro is discussed. The approach designed for direct stem regeneration from leaf mesophyll cells excludes the possibility for pheno- and genotypic variability contrary to those occurring during callus cultivation. It also allows maintenance of variety quality that is extremely important during clonal microreproduction.

### Литература

1. Сидорович Е. А., Кутас Е. Н. // Докл. АН БССР. 1991. Т. 35, № 4. С. 362—364.
2. Сидорович Е. А., Кутас Е. Н. // Весці АН Беларусі. Сер. біял. навук. 1993. № 2. С. 38—42.
3. Welande M. // J. Plant Physiol. 1988. Vol. 132, N 6. P. 738—744.
4. James D. J., Passey A. J., Rugini E. // J. Plant Physiol. 1988. Vol. 132, N 2. P. 148—154.
5. Fasolo E., Zimmerman R. H., Fordham I. // Plant Cell. Tissue and Organ Cult. 1989. Vol. 16, N 2. P. 75—87.
6. Stamp J. A., Colby S. M., Meredith C. P. // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 1990. Vol. 22, N 2. P. 127—133.
7. Mazzolani G. // Plant Tissue Cult. Lett. 1988. Vol. 5, N 1. P. 6—10.
8. Высоцкий В. А., Упадышев М. Г. // Физиол. раст. 1992. Т. 39, вып. 3. С. 584—591.
9. Меркулов С. М., Бартиш И. В., Глеба Ю. Ю. // Физиол. и биохим. культурных растений. 1993. Т. 25, № 4. С. 375—379.
10. Grand M. H., Lineberger R. D. // Plant Sci. 1988. Vol. 57, N 2. P. 173—179.
11. Reddy K. R., Bahadur B. // Curr. Sci. (India). 1989. Vol. 58, N 3. P. 152—154.
12. Юркова Г. Н., Сирант Л. В., Труханов В. А. // Цитол. и генет. 1989. Т. 23, № 1. С. 68—69.
13. Lai N., Ahuja P. // Plant Cell Repts. 1989. Vol. 8, N 8. P. 493—496.
14. Vijs S. P., Sood A., Sharma M. // Curr. Sci. 1986. Vol. 55, N 21. P. 1100—1101.
15. Callow P., Haghghi K., Giroux M., Hancock J. // HortScience. 1989. Vol. 24, N 2. P. 374—375.

Центральный ботанический сад  
АН Беларуси

Поступило 03.05.95