

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО СТРЕССА НА РАЗВИТИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЛАВАНДЫ *IN VITRO***

Н.А. ЕГОРОВА, кандидат биологических наук
Институт эфиромасличных и лекарственных растений НААН,
г. Симферополь

Введение

Лаванда узколистая (*Lavandula angustifolia* Mill.) является одним из основных возделываемых на Украине эфиромасличных растений. Широкое применение лаванды связано с присутствием в ее соцветиях эфирного масла, кумаринов, дубильных и других биологически активных веществ. Эфирное масло этого вида используется в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, в керамическом, лакокрасочном, фарфоровом производствах. В медицине его применяют как успокаивающее, ранозаживляющее, спазмолитическое средство, которое рекомендуется при ревматических, желудочных и многих других заболеваниях.

Получение новых высокопродуктивных и пластичных сортов лаванды может быть успешным только при наличии достаточно разнообразного исходного селекционного материала, при этом важную роль играет создание генотипов, устойчивых к абиотическим стрессам, и, в частности, к засухе. Среди современных методов биотехнологии одним из эффективных подходов к решению этой проблемы является клеточная селекция, позволяющая отбирать резистентные клетки и ткани в селективных условиях *in vitro* [5, 6]. В большинстве работ для скрининга устойчивых к водному дефициту форм использовали каллусы, которые культивировали на питательных средах с добавлением ионных или неионных осмотиков – NaCl, маннита, полиэтиленгликоля [1, 5, 9]. При этом исследователи применяли разные схемы селекции и методические подходы, касающиеся длительности действия и моделирования стрессового фактора, целесообразности применения ступенчатой селекции или селективной нагрузки в период морфогенеза [2, 5-7]. Для лаванды аналогичных исследований по клеточной селекции ранее не проводилось, за исключением работы А.М. Sodi с соавторами [10] о влиянии NaCl на рост каллуса лавандина. Имеющиеся публикации касаются в основном вопросов микроразмножения или оптимизации условий каллусогенеза и регенерации растений *in vitro* [8, 11]. Поэтому в задачи данной работы входило изучение закономерностей действия маннита на каллусо- и морфогенез у лаванды с целью разработки методов клеточной селекции на устойчивость к осмотическому стрессу.

Объекты и методы исследования

Материалом для исследований служили ткани и органы лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.) сорта Степная. Для получения каллуса в качестве эксплантов использовали сегменты листьев растений. Приготовление питательных сред, введение в культуру и культивирование проводили с применением традиционных методик, принятых в работах по культуре тканей [4]. Для индукции каллусо- и морфогенеза и культивирования меристем лаванды использовали разработанные ранее модификации среды Мурасиге и Скуга (МС) [3]. Пассирование каллусов осуществляли каждые 30-40 сут., масса трансплантов составляла 90 мг. В опытах по изучению влияния осмотического стресса каллус переносили на среды для каллусогенеза или морфогенеза с добавлением маннита в концентрациях от 1 до 12%. Контролем служило

культивирование на среде без маннита. В конце цикла выращивания определяли ростовой индекс (РИ), который рассчитывали как отношение прироста массы каллуса к массе транспланта, а также частоту морфогенеза. Каллусные культуры культивировали при температуре 26°C, 70%-ой влажности и интенсивности освещения 0,6 тыс. люкс, с 16-часовым фотопериодом. Морфогенные каллусы, меристемы и проростки выращивали при 2-3 тыс. люкс. Полученные регенеранты адаптировали *in vivo* и вначале выращивали в условиях закрытого грунта. При анализе влияния осмотического стресса на развитие меристемных культур проводили субкультивирование меристем исходного сорта и полученных из отобранных устойчивых линий регенерантов на контрольную среду и среду с добавлением 8% маннита.

Все эксперименты были повторены не менее 2-3 раз, а полученные данные обработаны статистически с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. На графиках представлены средние арифметические и доверительные интервалы.

Результаты и обсуждение

В предварительных опытах по клеточной селекции лаванды был использован неморфогенный каллус, из которого после культивирования на среде с 6-10% маннита были отобраны устойчивые линии. При переводе этих линий на среду для индукции морфогенеза появление почек отмечали лишь в единичных случаях, тогда как в контроле морфогенез происходил с частотой до 24,6%. Поэтому в наших дальнейших исследованиях по устойчивости к осмотическому стрессу, наряду с неморфогенным каллусом, был также изучен морфогенный каллус (имеющий зеленые морфогенные участки с начальными этапами развития адвентивных почек).

При культивировании каллуса на среде с маннитом было установлено, что на прирост каллусной биомассы оказывали влияние концентрация осмотика, тип самого каллуса, а также длительность культивирования в селективных условиях. Как видно из представленных на рисунке данных, у неморфогенного каллуса концентрация маннита 2% оказала селективное влияние и достоверное снижение ростового индекса (прирост к контролю составил 64,5%). Концентрация 10% была сублетальной – РИ составил всего $1,5 \pm 0,3$ (в контроле $23,9 \pm 0,6$). При введении в питательную среду 11-12% маннита наблюдалось потемнение и некроз каллуса этого типа.

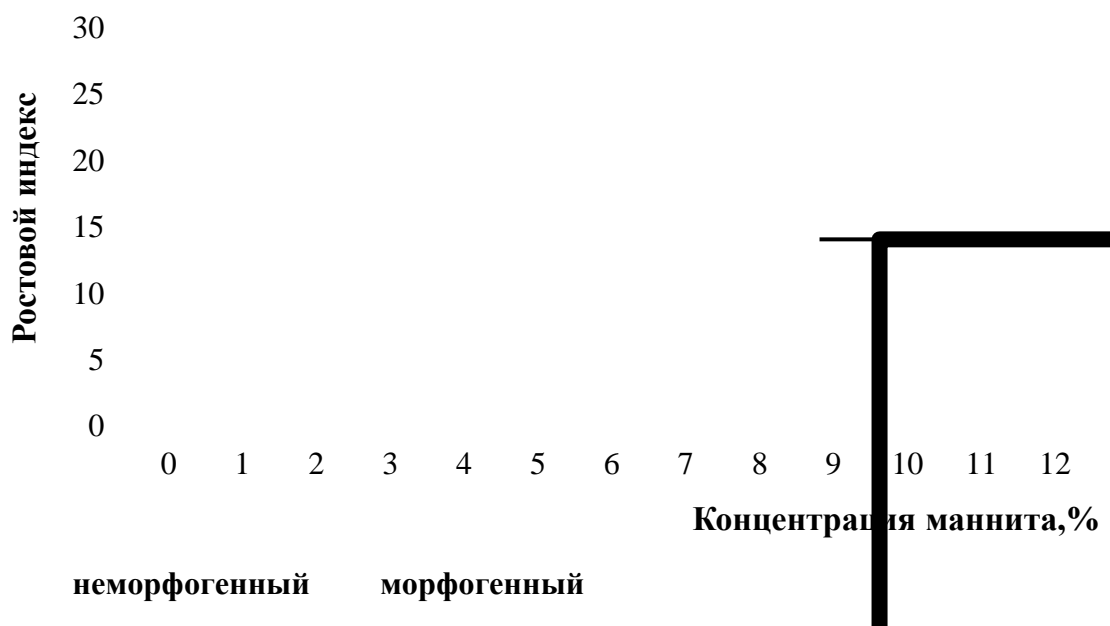


Рис. Влияние концентрации маннита в питательной среде и типа каллуса лаванды на его ростовой индекс

Морфогенные каллусные культуры проявили большую устойчивость к осмотическому стрессу, при этом ростовые индексы и прирост к контролю по сравнению с неморфогенным каллусом были более высокими почти во всех вариантах опыта. Селективная концентрация у морфогенного каллуса была гораздо выше (4%), при этой дозе РИ достоверно снижался и составил 83,7% прироста к контролю. Сублетальная доза маннита, при которой наблюдали минимальный прирост отдельных трансплантов, составила 11%.

После культивирования на питательной среде с 8-10% маннита отбирали хорошо растущие клеточные линии и субкультивировали их на среды с маннитом или без селективного фактора. Показано, что пассирование устойчивых линий на средах с осмотиком было возможно не более трех пассажей. Следует отметить, что на фоне селективного фактора у отобранных линий не было отмечено развития почек и побегов. В дальнейшем эти линии после 1-3 субкультивирований на среду с маннитом переводили на морфогенную среду без осмотика.

Важной проблемой при разработке методов клеточной селекции является индукция морфогенеза у отобранных на селективном фоне линий, так как имеются данные о том, что у резистентных линий может снижаться регенерационная способность, а также жизнеспособность полученных растений [2, 5, 12]. Установлено, что у многих отобранных линий лаванды при переносе на регенерационную среду наблюдали незначительное отрастание каллуса, поэтому сразу после снятия селективной нагрузки их необходимо 3-4 недели культивировать на питательной среде для пролиферации каллуса, и только потом переносить на среду для индукции морфогенеза. Тем не менее, из морфогенных штаммов было выделено несколько устойчивых к манниту линий (№№ 86-12-2; 86-12-23), которые после осмотического стресса хорошо росли на среде для регенерации (РИ до 78% от контроля), и в каллусе происходило развитие адвентивных почек. Из таких устойчивых линий в дальнейшем было получено несколько регенерантов. Следует отметить, что на данном этапе регенерация полноценных растений была возможна только из морфогенных линий, отобранных на среде с маннитом в концентрации не выше 8%. Поэтому, несмотря на возможность получения устойчивых линий лаванды на фоне 9-11% этого осмотика, для дальнейшей клеточной селекции целесообразно использовать для отбора *in vitro* 8%-ю концентрацию селективного фактора, поскольку это максимальная доза, при которой можно успешно проводить регенерацию растений.

Отобранные из устойчивых линий регенеранты лаванды размножали *in vitro*, используя разработанную ранее методику [3]. У многих регенерантов при микроразмножении было отмечено снижение некоторых показателей развития по сравнению с контрольными регенерантами из исходного штамма. Высота микропобегов, количество листьев, число адвентивных побегов и приживаемость *in vivo* у них были в 1,5-2,5 раза ниже. В литературе у некоторых видов растений отмечены аналогичные особенности регенерантов, полученных из устойчивых клеточных линий, свидетельствующие об их более слабом развитии и аномалиях по сравнению с исходными формами [1, 2, 5].

С целью косвенной проверки признака устойчивости на уровне изолированных тканей было проведено культивирование меристем регенерантов, полученных из устойчивых к манниту линий, на питательных средах с маннитом. В таблице представлены данные по сравнительному анализу развития меристем у полученных из устойчивых линий регенерантов (№№ 86-12-16 и 86-12-41), растения № 86-11-К7 (регенерировавшего из исходной контрольной линии) и исходного сорта Степная на среде с 8% маннита. Установлено, что у исходного сорта и регенеранта из контрольной линии на среде с осмотиком все показатели развития меристем снижались в 4-6 раз по сравнению с контрольной средой, а адвентивные побеги вообще не формировались.

Маннит в питательной среде в меньшей степени ингибировал развитие изолированных меристем у отобранных *in vitro* растений, и почти все изученные показатели достоверно не отличались по сравнению со средой без маннита. Данные факты, по-видимому, могут косвенно свидетельствовать о большей осмоустойчивости регенерантов, полученных из каллусных линий при скрининге *in vitro*.

Таблица

Влияние концентрации маннита в питательной среде на развитие меристемных культур лаванды различного происхождения

Происхождение образца	Концентрация маннита в среде, %	Приживаемость меристем, %	Высота побега, мм	Количество узлов, шт.	Количество адвентивных побегов на эксплант, шт.
сорт Степная	0	100,0	21,7±3,2	3,3±0,2	3,7±0,4
	8	18,3±3,7*	5,6±0,3*	1,4±0,1*	0,0*
регенерант № 86-11-К7	0	100,0	19,8±3,0	3,2±0,3	3,3±0,4
	8	15,0±2,5*	6,5±0,3*	1,1±0,1*	0,0*
регенерант № 86-12-16	0	95,4±10,5	15,3±1,2	2,5±0,3	2,9±0,4
	8	72,8±7,5	9,2±0,9*	1,7±0,2	1,8±0,3
регенерант № 86-12-41	0	92,3±9,9	14,4±1,4	3,0±0,4	2,2±0,4
	8	77,5,3±8,2	10,7±1,2	2,0±0,3	1,5±0,3

* различия достоверны по сравнению с контрольной средой при P=0,05

Выводы

Таким образом, при исследовании влияния осмотического стресса на развитие каллусных культур лаванды были определены сублетальные дозы маннита для разных типов каллуса, показана специфика его действия в течение нескольких пассажей и отобраны устойчивые каллусные линии, способные к регенерации растений. Выявлено преимущество использования для селекции *in vitro* морфогенных каллусов, которые не только проявили большую устойчивость к осмотику, но и позволили проводить регенерацию растений. Анализ устойчивости регенерантов к осмотическому стрессу на уровне изолированных меристем подтвердил эффективность такого методического подхода, что свидетельствует о перспективности применения клеточной селекции при создании исходного селекционного материала у лаванды.

Список литературы

1. Аль-Холани Х.А.М. Получение стресс-толерантных растений кукурузы методом клеточной селекции: Автореф. дис... канд. биол. наук. – М., 2010. – 24 с.
2. Белянская С.Л., Шамина З.Б., Кучеренко Л.А. Морфогенез в клонах риса, резистентных к стрессовым факторам // Физиология растений – 1994. – Т. 41, № 4. – С. 573-577.
3. Егорова Н.А. Получение растений-регенерантов в каллусной культуре лаванды и их микроразмножение *in vitro*: Методические рекомендации. – Симферополь, 2008. – 28 с.
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
5. Левенко Б.А. Клеточная селекция растений на устойчивость к стрессовым факторам: Дис... докт. биол. наук. – Киев, 1991. – 41 с.

6. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. – К.: Наук. думка. – 1990. – 280 с.
7. Оценка различных селективных схем для отбора на засухоустойчивость в культуре изолированных тканей пшеницы /Тучин С. В., Архипова Л. Н., Носова Н. Н., Сахаджи Т. Н. // Биологические основы селекции. – Саратов, 1991. – С. 41-48.
8. Dias M.C., Almeida R., Romano A. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'Her through in vitro axillary shoot proliferation // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2002. – V. 68, № 1. – P. 99-102.
9. *In vitro* selection for osmotic tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) / Dragiiska R., Djilianov D., Denchev P., Atanassov A. // Bulg. J. Plant Physiol. – 1996. – V. 22, N 3-4. – P. 30-39.
10. *In vitro* growth pattern of salt-stressed cells of lavandin / Sodi A.M., Serra G., Vitaglino C., Blando F. // Acta Horticulturae. – 1990. – N 280. – P. 459-462.
11. Tsuro M., Koda M., Inoue M. Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC) // Scientia Horticulturae. – 1999. – V. 81, N 3. – P. 331-336.
12. Development of NaCl-tolerant line in *Chrysanthemum morifolium* Ramat. through shoot organogenesis of selected callus line / Zahed Hossain, Abul Kalam Azad Mandal, Subodh Kumar Datta, Amal Krishna Biswas // J. of Biotechnology. – 2007. – V. 129, N 4. – P. 658-667.

Рекомендовано к печати д.б.н. Митрофановой И.В.