

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ**ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА И ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ В КУЛЬТУРЕ КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ ЛАВАНДЫ**

Н.А. ЕГОРОВА, кандидат биологических наук
Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН

Введение

Лаванда, относящаяся к семейству яснотковых (*Lamiaceae*), является одной из основных выращиваемых в Украине эфиромасличных культур. В промышленных масштабах возделывается для получения эфирного масла, которое применяется в медицине, парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, керамическом и лакокрасочном производстве. Лаванда может использоваться как декоративное, медоносное и противозероизное растение.

В последние десятилетия в селекции ряда сельскохозяйственных культур интенсивно внедряются клеточные технологии, позволяющие создавать генетически разнообразный селекционный материал с использованием соматической вариативности, мутагенеза *in vitro*, клеточной селекции [6, 8]. Первым этапом создания таких клеточных технологий является разработка эффективных методик получения каллусных тканей и растений-регенерантов. Индукция морфогенеза в каллусной культуре у большинства видов является достаточно сложной проблемой, она нередко ограничена первыми пассажами и требует кропотливого подбора питательных сред, эксплантов и многих других лимитирующих факторов [2, 5, 6].

В литературе имеется ряд сообщений, касающихся изучения морфогенеза и регенерации растений в каллусной культуре из разных типов эксплантов у некоторых видов лаванды [7, 9, 12]. Исследовано влияние гормонального состава питательной среды на индукцию морфогенеза и образование побегов в каллусе, полученном из листовых эксплантов *Lavandula vera* [12] и *L. latifolia* [10]; сегментов гипокотыля *L. latifolia* и *L. stoechas* [9]. Показана возможность размножения путем соматического эмбриогенеза в каллусе из меристем у видов *L. angustifolia* и *L. latifolia* [11].

Целью данной работы было исследование некоторых закономерностей индукции морфогенеза и растений-регенерантов в каллусной культуре у различных сортов и образцов лаванды (*Lavandula angustifolia* Mill.).

Материалы и методы

Материалом для исследования служили сорта и селекционные образцы лаванды (*L. angustifolia* Mill.) – Степная, Синева, Галлея, № 58-1, № 75-11, № 337-9, № 310-17 и регенерант ‘R 74’. В качестве эксплантов использовали сегменты листьев растений, выращиваемых в условиях закрытого грунта. При введении в культуру, пассировании, приготовлении питательных сред и анализе ростовых процессов использовали традиционные методики, принятые в работах по культуре тканей [5]. Пассирование каллуса осуществлялось каждые 35-40 суток; масса транспланта составляла 90-100 мг. Для индукции морфогенеза каллусы переносили на среды для регенерации и оценивали частоту морфогенеза как количество каллусных трансплантов с почками в процентах от общего числа анализированных.

В качестве базовой питательной среды использовали среду Мурасиге и Скуга (МС), дополненную различными фитогормонами. Культивирование каллусных культур проводилось при 26°C, 70%-ной влажности и 16-часовом фотопериоде с освещенностью 600 люкс, а при индукции морфогенеза – освещенностью 2-3 тыс. люкс. Опыты проводили в 2-кратной повторности, в каждом варианте анализировалось не менее 20 трансплантов.

Полученные данные подвергали статистической обработке согласно общепринятым методам; на рис. 2, 3 представлены средние арифметические и их доверительные интервалы.

Результаты и обсуждение

Результаты наших предыдущих исследований показали, что получение каллусных культур у большинства изученных генотипов лаванды не представляло особой трудности [3]. Была подобрана питательная среда, обеспечивающая индукцию каллуса из листовых эксплантов с частотой до 90-100% и высокий ростовой индекс (до 18-22) при длительном культивировании каллусных тканей в течение 5-8 лет. Формирующаяся каллусная ткань была рыхлой, оводненной, светло-бежевого цвета, без признаков морфогенеза.

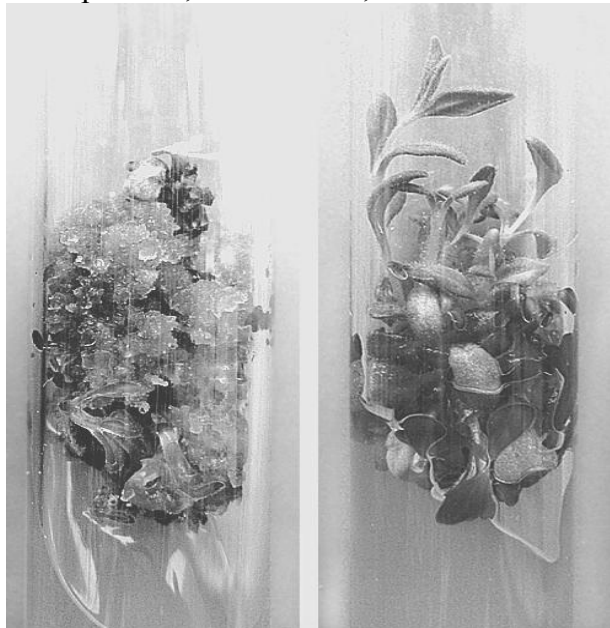


Рис. 1. Индукция морфогенеза (слева) и образование побегов (справа) в каллусной культуре лаванды сорта Степная

Для индукции морфогенеза такие неморфогенные каллусы переносили, начиная с первого пассажа, на питательные среды, содержащие различные фитогормоны (БАП, кинетин, зеатин, НУК, ИУК, ИМК). На некоторых вариантах питательных сред происходила индукция морфогенеза. При этом в светло-бежевом каллусе через 3-4 недели появлялись зеленые меристематические участки с почками, а через 6-8 недель происходило развитие микропобегов (рис.1). При цитологическом анализе среди массы каллусных клеток выявлялись апексы с примордиями, а иногда – зародышеподобные структуры.

Установлено, что индукция морфогенеза в значительной степени зависела от состава питательной среды и происходила, в основном, на средах, дополненных БАП или кинетином. Как видно из данных, представленных на рис. 2, у сорта Степная наибольшая частота морфогенеза отмечалась в присутствии БАП. Повышение концентрации БАП с 0,5 до 1 мг/л вызывало увеличение количества трансплантов с почками. Введение в питательную среду кинетина (1-2 мг/л) у этого сорта было менее эффективно (частота морфогенеза не превышала 16,6%), а добавление зеатина вызывало угнетение пролиферации каллуса при отсутствии признаков морфогенеза (рис. 2).

Дальнейшее увеличение содержания БАП до 2 мг/л не способствовало достоверному повышению частоты морфогенеза. Совместное введение в среду БАП с кинетином (МС14) или БАП и НУК или ИУК (МС 204, 314) приводило к достоверному снижению частоты морфогенеза, по сравнению со средой МС427, вплоть до полного угнетения морфогенеза (МС160).

Проведенные исследования показали значительное влияние на индукцию морфогенеза генотипических особенностей. Из 7 изученных сортообразцов формирование почек и побегов в каллусе было отмечено только у сортов Степная, Синевая и № 75-11, № 337-9, № 310-17 (рис. 3).

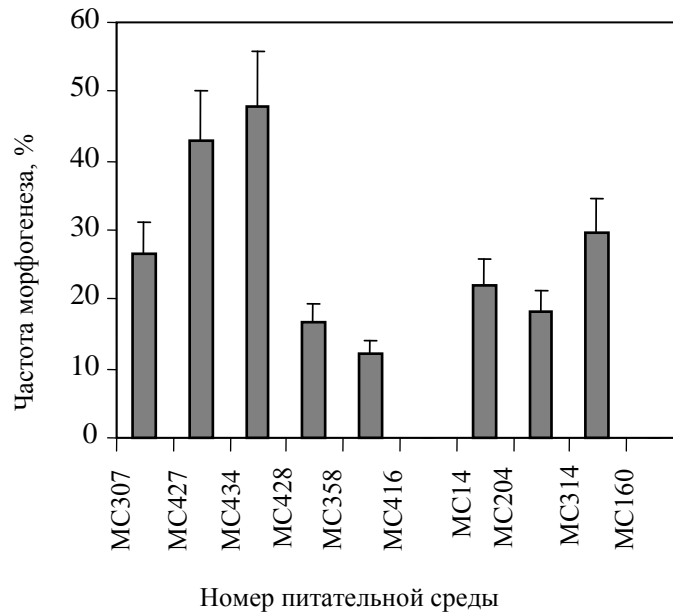


Рис. 2 Влияние состава питательной среды на индукцию морфогенеза в каллусной культуре 1 пассажа лаванды сорта Степная

Гормональные добавки (мг/л) в питательной среде Мурасиге и Скуга: МС307 – БАП (0,5); МС 427 – БАП (1,0); МС434 – БАП (2,0); МС428 – кинетин (1,0); МС358 – К (2,0); МС416 – зеатин (1,0); МС14 – БАП (1,0)+ кинетин (1,0); МС204 – БАП (2,0)+НУК(0,1); МС314 – БАП (2,0)+ИМК(0,5); МС160 – НУК(1,0)+БАП(1,0).

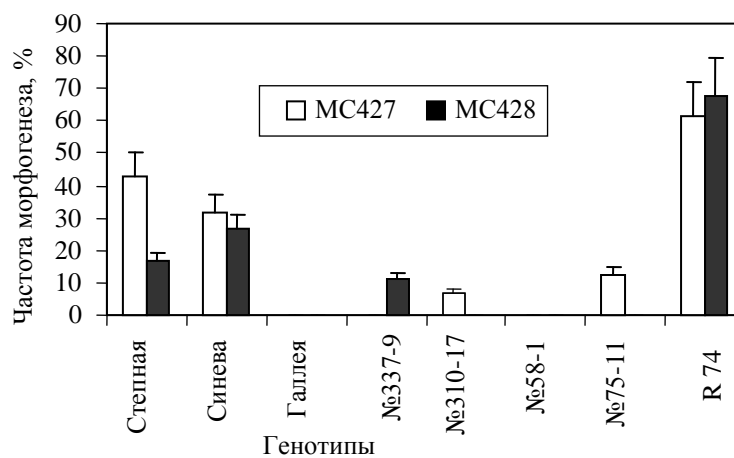


Рис. 3. Влияние генотипа и питательной среды на индукцию морфогенеза в каллусной культуре лаванды (1 пассаж)

Ранее было показано, что для формирования почек и побегов в листовом каллусе *L. vera* необходимо добавление в питательную среду БАП [12], а у вида *L. latifolia* – совместное введение БАП и НУК или ИУК [10]. В наших экспериментах продемонстрировано, что для индукции морфогенеза у *L. angustifolia*, в зависимости от генотипа, необходимо включать в состав питательной среды БАП или кинетин.

Установлено, что при использовании регенеранта в качестве растения-донора происходило значительное увеличение частоты морфогенеза. В частности, у регенеранта 'R 74' (полученного из каллусной культуры сорта Степная) частота индукции морфогенеза в листовом каллусе была выше, чем у исходного сорта и достигала 67,7% (рис. 3). Следует отметить, что у регенеранта, в отличие от сорта Степная, индукция почек в каллусе

происходила почти с одинаковой частотой на средах и с БАП, и с кинетином. Аналогичные данные о повышении регенерационной способности каллусных культур, полученных из растений-регенерантов, по сравнению с исходными сортами, были представлены для подсолнечника [1] и тысячелистника [4].

При анализе морфогенетических потенциалов каллусных тканей лаванды разных пассажей было выявлено снижение частоты индукции морфогенеза с увеличением длительности культивирования. При переносе неморфогенного каллуса на регенерационные среды у сортов Степная и Синева образование почек наблюдали вплоть до 4-5 пассажей, при этом частота морфогенеза уменьшалась до 5-18%. Из каллусов более поздних пассажей индукции морфогенеза при испытанных условиях не наблюдали. Однако, как показали наши исследования, среди различных каллусных штаммов лаванды можно было выделить морфогенные, которые сохраняли высокие регенерационные способности длительное время. В частности, показано, что у каллусных штаммов 'L-126' и 'L-129' в течение трех лет наблюдался активный прирост биомассы и образование почек и побегов. При очень длительном культивировании таких морфогенных штаммов (более 12-15 пассажей) часто наблюдали развитие тератологических побегов, которые трудно укоренялись и приживались при переносе в условия *in vivo*. Тем не менее, при разработке различных клеточных технологий можно использовать такие штаммы для длительной регенерации проростков. В частности, при получении исходного селекционного материала на основе соматоклональной изменчивости можно рекомендовать применение у лаванды перевод неморфогенных каллусов на регенерационные среды вплоть до 5-го пассажа и использование длительно пассируемых морфогенных штаммов, что может существенно повысить вероятность получения соматоклональных вариантов.

Полученные в каллусной культуре лаванды побеги, как правило, не имели корней, поэтому их переводили на среду МС для укоренения с половинной концентрацией солей, сахарозы и 1,0 мг/л ИМК. Частота укоренения варьировала в зависимости от генотипа и пассажа и достигала 60-87%. Укорененные проростки после адаптации *in vivo* переносили в вазоны с землей, а затем в открытый грунт. При анализе растений, полученных из каллусных тканей сорта Синева, было показано, что до 23% регенерантов имели морфологические отклонения по сравнению с исходным сортом. Это проявлялось в изменении цвета и размеров листьев, формы и размера соцветий, появлении утолщенных антоциановых побегов и укороченных междоузлий. Более детальный анализ изменчивости регенерантов, проводимый в полевых условиях, будет предметом отдельного сообщения.

Таким образом, в результате проведенных исследований были изучены некоторые закономерности морфогенеза в каллусной культуре различных сортов и селекционных образцов лаванды узколистной. Показано влияние на индукцию морфогенеза генотипических особенностей, гормонального состава питательной среды и длительности пассирования каллуса. Установлено, что регенерационный потенциал каллусных культур можно повысить при использовании регенерантов в качестве растений-доноров, а также при культивировании выделенных морфогенных штаммов. У полученных *in vitro* растений-регенерантов выявлена варибельность по морфологии, что свидетельствует о перспективности использования разработанных биотехнологических подходов для создания исходного материала в селекции лаванды.

Список литературы

1. Антонова Т.С., Краснянский С.Ф., Чемостникова Т.А., Зозуль Т.Г. Соматический эмбриогенез в каллусе из семядолей незрелых зародышей подсолнечника // Докл. ВАСХНИЛ. – 1991. – № 4. – С. 9-13.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Учебное пособие. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

3. Егорова Н. А. Культура каллусных тканей лаванды // Физиология и биохимия культурных растений. – 2003. – Т. 35. – № 2. – С. 166-171.
4. Егорова Н. А. Культура изолированных тканей тысячелистника *in vitro* // Экосистемы Крыма, их оптимизация и охрана // Тематический сборник научных трудов. – Симферополь: Таврия, 2003. – Вып. 13. – С. 155-160.
5. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
6. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
7. Новикова В.М., Работягов В.Д. Получение растений в культуре изолированных почек амфигаплоида лаванды // Культура клеток растений и биотехнология: Тез. докл. IV Всес конф. – Кишинев: Штиинца, 1983. – С.145.
8. Сидоров В.А. Биология растений. Клеточная селекция. – Киев.: Наукова думка, 1990. – 280 с.
9. Calvo M.C., Segura J. *In vitro* morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* seedlings // Scientia. Hortic. – 1988. –N 36. – P.131-137.
10. Calvo M.C., Segura J. Plant regeneration from cultured leaves of *Lavandula latifolia* Medicus: Influence of growth regulators and illumination conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1989. – 19. – № 1. – P. 33-42.
11. Quazi M.H. *In vitro* multiplication of *Lavandula spp.* // Ann. Bot. – 1980. – 45. – N3. – P.361-362.
12. Tsuru 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* D.C.) // Sci. hort. (Neth.). – 1999. – 81. – N 3. P.331-336.

Рекомендовано к печати д.б.н., проф. Митрофановой О.В.