

УДК 581.14.6:634.738

Е. Н. КУТАС, А. А. ГОРЕЦКАЯ, А. А. ВЕЕВНИК, В. В. ТИТОК

МОРФОГЕНЕЗ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ СОРТОВ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ, БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ И РОДОДЕНДРОНА ЖЕЛТОГО В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, e-mail: E.Kutas@cbg.org.by

(Поступила в редакцию 30.01.2014)

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 микроэлементов, витаминов, углеводов, гормональных добавок), а также от pH среды, условий культивирования и целого ряда других факторов. Подтверждением тому могут служить многочисленные экспериментальные исследования.

Согласно результатам исследований М. Д. Шора и Н. Д. Папазяна [1], полученным при изучении процессов морфогенеза в культуре изолированных тканей роз на пяти средах, различающихся концентрацией макроэлементов 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 бензиламинопурина и нафтилуксусной кислоты в условиях 16-часового фотопериода.

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 и др. [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 – НУК. Побегообразование отмечено на среде Мурасиге-Скуга, содержащей 2 мг/л бензиладенина.

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

Изучение морфогенеза интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого на различных модификациях питательных сред позволит определить оптимальный состав питательной среды для протекания этого физиологического процесса в условиях *in vitro*.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили интродуцированные сорта голубики высокой (Elizabeth), брусники обыкновенной (Ammerland, Red Pearl), рододендрона желтого (*Rhododendron luteum* Sweet). Эксперименты были поставлены на трех типах питательных сред (MS, WPM, Андерсена), представленных 9 различными модификациями (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Состав питательных сред для изучения морфогенеза интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого

Компонент, мг/л	Модификация среды								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Соли и витамины по MS	+	–	½	+	–	–	–	–	–
Соли и витамины по WPM	–	+	–	–	–	–	–	+	–
Соли и витамины по Андерсону	–	–	–	–	+	+	+	–	+
Мезоинозит	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Аденин сульфат	–	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; ½ – половинная доза компонента в среде.

В качестве эксплантов использовали микрочеренки интродуцированных сортов голубики высокой (Elizabeth), брусники обыкновенной (Ammerland, Red Pearl), рододендрона желтого (*Rhododendron luteum*), введенных в стерильную культуру, а также эпикотиль, гипокотиль, семядоли, корешок, листья ювенильных проростков рододендрона желтого, полученных нами ранее в асептических условиях на модифицированной питательной среде Андерсена. Стерильные экспланты высаживали на питательные среды: Мурасиге-Скуга, WPM и Андерсена 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.

Результаты и их обсуждение. По истечении четырех недель культивирования из одного микрочеренка образовалось в среднем от 1 до 13 микропобегов в зависимости от состава питательной среды (табл. 2). У эксплантов рододендрона желтого (эпикотиль, гипокотиль, 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, эпикотиль, гипокотиль, семядолей, листьев), полученных из свежесобранных семян. У эксплантов, вычленившихся из пророщенных 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

Т а б л и ц а 2. Побегообразование у интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого в зависимости от состава питательной среды

Номер модификации среды	Количество регенерантов на один эксплант, шт.			
	Elizabeth	Ammerland	Red Pearl	Rhododendron luteum
1	4,5±1,2	4,7±1,8	4,2±1,0	4,5±1,3
2	3,5±1,4	3,2±1,0	3,7±1,2	4,2±1,0
3	1,1±1,0	1,3±1,0	1,8±0,2	1,3±1,0
4	1,2±1,3	2,9±1,1	3,2±1,1	3,1±1,7
5	3,6±1,2	3,1±1,3	3,0±2,1	2,1±1,2
6	1,3±1,1	0,7±0,1	1,0±0,3	0,6±0,1
7	1,4±1,0	1,6±1,1	1,2±0,1	1,5±1,0
8	7,0±1,0	10,0±1,0	11,5±2,1	6,0±1,7
9	9,0±1,0	12,0±2,0	13,0±2,0	7,0±2,2

Т а б л и ц а 3. Морфогенез у рододендрона желтого в зависимости от состава питательной среды

Номер модификации среды	Количество регенерантов на один эксплант, шт.						
	кallус, мг	побеги, шт.	Источник эксплантов				
			корешок	гипокотиль	эпикотиль	семядоли	листья
1	30,7±3,1	1,0±0,0	+	+	+	+	+
2	165,6±3,8	10,0±3,0	++	++	++	++	++
3	130,0±3,2	9,0±1,0	++	++	++	++	++
4	210,0±3,0	16,0±1,0	+++	+++	+++	+++	+++
5	110,5±16,1	13,0±2,0	+++	+++	+++	+++	++++
6	40,8±1,4	2,0±1,0	+	+	+	+	+
7	85,0±2,5	7,0±2,0	+	+	+	+	+
8	119,0±1,7	8,0±2,0	++	++	++	++	++
9	305,0±6,1	19,0±3,0	+++	+++	+++	+++	+++

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

его пассирования на питательную среду другого состава. Таким образом, индукция каллусогене- за, 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 рододендрона желтого на средах: WPM и Андерсена двух модификаций (№8, 9, см. табл. 1). В данном случае в основе морфогенеза рододендрона желтого 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, 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 [6].

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 тому 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 рододендрона желтого 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) (табл. 1).

Как показал анализ результатов экспериментальных исследований, полученных по изучению морфогенеза интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого, на девяти модификациях питательных сред, различающихся по содержанию макро- и микросолей, гормональных добавок, лучшими для морфогенеза изученных растений 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 (табл. 1). На средах 8-й и 9-й модификаций в сравнении с таковыми 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7-й получено максимальное количество побегов на эксплант от 6 до 13 в зависимости от сорта и вида растения (табл. 2).

Заключение. Лучшими для морфогенеза интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной и рододендрона желтого 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. Показана принципиальная возможность регенерации рододендрона желтого двумя методами: 1) путем активации пазушных меристем, 2) через пролиферацию каллуса и последующее образование из него регенерантов.

Литература

1. Шор М. Ф., Папазян Н. Д. Изучение процессов морфогенеза в культуре изолированных тканей роз. 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. 1987. Деп. в ВИНТИ 19.01.87, №382–387.
3. Budagovskaya H. V., Kara A. N., Kotov A. A. // Plant Physiol. 1990. Vol. 79, N2, pt. 2. P. 7.
4. Gupta S. C., Chandra N. // Indian. J. Plant. Physiol. 1985. N2. P. 145–150.
5. Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. М., 1975.
6. Skoog F., Miller C. O. // Indian. J. Plant. Physiol. 1957. N11. P. 118–123.
7. Christopher T., Prolaram B., Rajam M. V., Subhash K. // Indian. J. Exp. Biol. 1987. Vol. 25, N5. P. 349–350.
8. Маковейчук А. Ю. // Второй съезд Всесоюз. об-ва физиологов растений: материалы Междунар. науч. конф. Минск, 24–29 сентября, 1990 г. Мн., 1990. С. 58.
9. Mohamed M. A., Alsadon A. A. // Biologia Plantarum. 2011. Vol. 55, N2. P. 370–374.
10. Sharaf A. R. N., Hamidoghli Y., Zakizadeh H. // Horticulture, Environment and Biotechnology. 2011. Vol. 52, N3. P. 298–302.

E. N. KUTAS, A. A. GORETSKAY, A. A. VEYEVNIK, V. V. TITOK

MORPHOGENESIS OF INTRODUCED SPECIES OF BLUEBERRY HIGH, COWBERRY, RHODODENDRON YELLOW, DEPENDING ON THE COMPOSITION OF THE CULTURE MEDIA

Summary

The morphogenesis of introduced species of blueberry high, cowberry, rhododendron yellow to various modifications of culture media, determine the optimal medium for the flow of the process were studied. The principal possibility of regeneration of introduced species of blueberry high cowberry by activation of axillary meristems, rhododendron yellow by two ways: 1) the activation of axillary meristems, 2) a proliferation of callus and the subsequent formation of his shoots are presented.