

УДК 58.085

ВЛИЯНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНИНОВ И АУКСИНОВ В СРЕДЕ НА ОБРАЗОВАНИЕ ПОБЕГОВ И КОРНЕЙ ТАБАКА И ГОРОХА *IN VITRO*

© М.Н. Агеева, А.А. Брилкина

Подобраны среды для эффективного образования побегов из листовых эксплантов табака и гороха *in vitro*. Наиболее оптимальной средой для получения побегов для табака является МС, содержащая 1 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК, для гороха – МС с добавлением 1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л НУК. Образование корней отмечено только для табака на средах, содержащих НУК в сочетаниях с кинетином или 2-иП.

Ключевые слова: органогенез, цитокинины, ауксины, горох, табак, *in vitro*, корень, побег.

В современном мире введение различных генов в растения для создания организмов, синтезирующих различные целевые белки, используется как в практике сельского хозяйства, так и в научных целях. Для эффективной трансформации растений необходимо разрабатывать питательные среды, обеспечивающие максимально продуктивное образование побегов и корней у эксплантов. Традиционно для этого используют сочетания различных цитокининов и ауксинов, позволяющие добиться необходимых результатов. Вещества цитокининовой природы стимулируют клеточное деление и дифференцировку, регенерацию проростков из соматических эмбриоидов или стеблевых почек, активируют рост боковых побегов, снимают апикальное доминирование ауксинов, активируют работу РНК-полимераз, образование РНК и синтез белков. Ауксины стимулируют процессы растяжения клетки, влияют на поступление в клетки воды, энергетический обмен, обеспечивают взаимодействие между разными органами [1]. Целью наших исследований стало изучение влияния цитокининов и ауксинов на образование побегов и корней *in vitro* для растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) и гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Альбумен.

Материалы и методы исследования.

Индукция образования побегов на листовых эксплантах проводилась на среде Мурасиге-Скуга (МС) [2] с содержанием различных цитокининов (6-бензиламинопуридин (БАП), 6-фурфуриламинопуридин (кинетин) и изопентиладенин (2-иП)) и ауксинов (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д), α -нафтил-уксусная кислота (НУК)). Цитокинины и ауксины присутствовали в среде в концентрациях 1 и 0,1 мг/л соответственно. В качестве эксплантов для образования побегов табака использовались квадратные кусочки листа площадью 0,3–0,6 см², в то время как для гороха использовались целые листья. По предварительным данным образования побегов гороха на кусочках листьев не наблюдалось. Были проведены гистологические исследования пути образования побегов и корней на программно-аппаратном комплексе (микроскоп Meiji Techno MT5300L/SP со встроенной фотокамерой и персональным компьютером с программным обеспечением Vision Capture).

Результаты и их обсуждение. Для эксплантов табака на средах МС, дополненных 6-БАП/НУК или 2-иП/НУК, наблюдалось образование 4–12 или 3–7 побегов соответствен-

АГЕЕВА Мария Николаевна, Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: ageyevemaria@gmail.com

БРИЛКИНА Анна Александровна – к.б.н., Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, e-mail: annbril@mail.ru

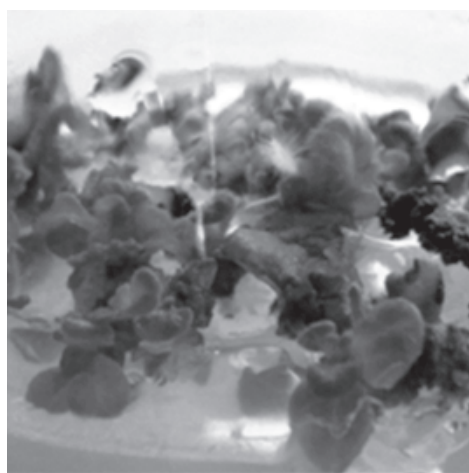
Образование побегов на средах с различными типами цитокининов и ауксинов

	6-БАП 2,4-Д	Кинетин 2,4-Д	2-иП 2,4-Д	6-БАП НУК	Кинетин НУК	2-иП НУК
Табак						
Процент образования побегов	88,0	0	46,0	100,0	0	100,0
Количество побегов на эксплант	3–12	0	1–3	4–12	0	3–7
Количество корней на эксплант	0	0	0	0	0–2	0–3
Горох						
Процент образования побегов	30,0	37,5	30,0	28,3	36,7	30,0
Количество побегов на эксплант	1–2	1–2	1–2	1	1	1
Количество корней на эксплант	0	0	0	0	0	0

но для 100% эксплантов (табл., рис. 1, *а*). Такой же состав питательной среды для получения регенерирующих побегов трансгенных растений табака применяла Е.Г. Семенюк [3].

На средах с 6-БАП и 2-иП, но с ауксином 2,4-Д побеги образовывались для 88% (по 3–12 побегов) и 46% (по 1–3) эксплантов соответственно. Появление первых побегов табака происходило на всех описанных выше средах через 1–2 недели после помещения на питательную среду с фитогормонами. На среде МС, дополненной кинетином/НУК и кинетином/2,4-Д, появление побегов табака не отмечалось.

На средах, дополненных кинетином/НУК, 33,3% случаев растения давали 1–2 корня на эксплант, а 2-иП/НУК – в 50% случаев, в то время как на средах, содержащих 2,4-Д, корнеобразования не происходило. Но формирование побегов и корней на среде с 2-иП/НУК происходило в разных точках экспланта, поэтому не было получено полноценных растений. Таким образом, наиболее оптимальной средой для получения побегов на листовых эксплантах табака является МС, содержащая 1 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК. Побеги, полученные на данной среде и пересаженные



а



б

Рис. 1. Образование побегов табака на среде МС, дополненной 1 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК (*а*), и побегов гороха на среде МС, дополненной 1 мг/л 2-иП и 0,1 мг/л НУК (*б*)

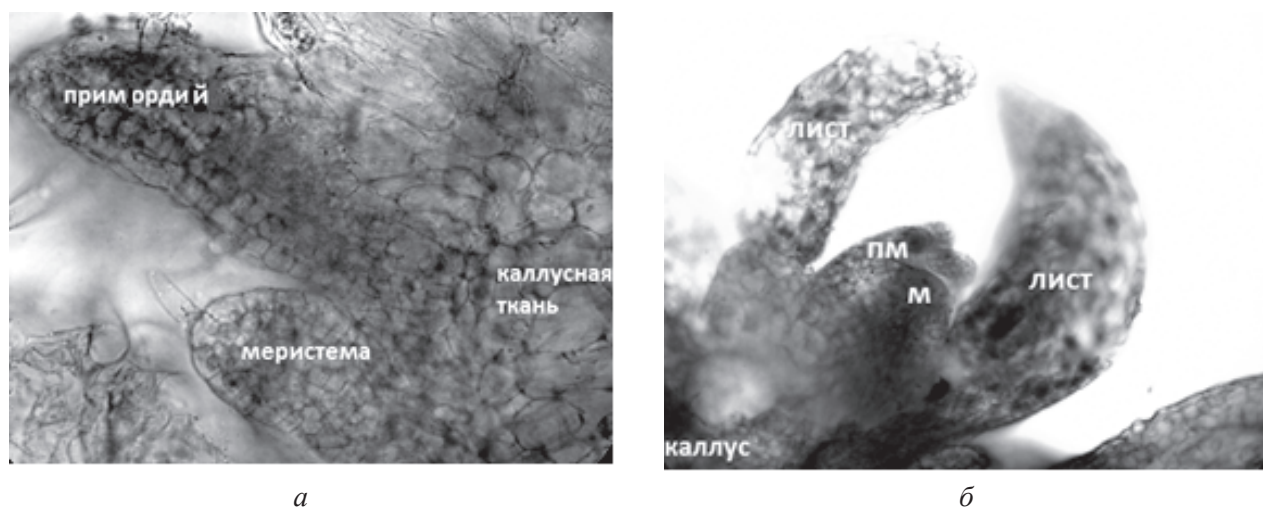


Рис. 2. Гистологические срезы побегов табака на среде МС, дополненной 1 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК (а), и побегов гороха на среде МС, дополненной 1 мг/л 2-иП и 0,1 мг/л НУК (б) (пм – примордий, м – меристема)

на среду МС без фитогормонов формировали корни и целые растения, которые затем успешно высаживались в грунт.

В отличие от табака листовые экспланты гороха давали по одному побегу в 28,3–36,7% случаев на средах с НУК, содержащих различные цитокинины (см. табл., рис. 1, б). Статистически достоверных различий между образованием побегов на средах, содержащих используемые цитокинины в сочетании с НУК, не выявлено при $p < 0.05$. Если среды дополняли 2,4-Д вместо НУК, то 30–37,5% эксплантов давали по 1–2 побега (различия статистически не значимы при $p < 0.05$). Но размеры образованных побегов на средах с 2,4-Д меньше, чем на средах с НУК. Первые побеги из листовых эксплантов гороха, так же, как и в случае с табаком, появлялись на 1–2 неделе инкубации на среде МС с фитогормонами. Так же, как и в нашей работе, более успешная регенерация растений гороха была получена С.В. Бобковым [4] из каллусов, полученных из изолированных пыльников гороха, на среде MSB с 4 мг/л БАП и 1 мг/л НУК, чем на среде, содержащей 2,4-Д. Образование корней для эксплантов гороха так же не наблюдалось. Для корнеобразования у растений гороха М.Н. Сащенко и Т.П. Жужжалова [5] использовали МС, дополненную 1,5 мг/л НУК, а С.В. Бобков [6] получил эффективный ризигенез на среде MSB с 0,25 мг/л НУК и 0,25 мг/л ИМК.

Для выяснения возможного пути органогенеза был проведен микроскопический анализ срезов, сделанных в точке роста почки на листовых эксплантах табака и гороха (рис. 2). Было отмечено формирование однополюсной структуры, тесно связанной с калусной тканью, что позволяет сделать вывод о формировании побегов и корней путем непрямого органогенеза.

Таким образом, наиболее оптимальной средой для получения побегов на листовых эксплантах табака является МС, содержащая 1 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л НУК. Также можно отметить, что на средах с различными ауксинами, содержащими кинетин, образование побегов табака не происходит. Для гороха наиболее эффективной средой для получения побегов из листовых эксплантов является МС с 1 мг/л кинетина и 0,1 мг/л НУК, т.к. на данной среде образуется большее количество крупных побегов. Предполагаемый путь образования побегов и корней – не прямой органогенез. В дальнейшем планируется продолжение работы по подбору сред для данных растений для укоренения полученных побегов растений табака и гороха.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений: учебник. М.: Абрис, 2011. 783 с.

2. Murashige, T., Skoog. F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.

3. Семенюк Е.Г. Экспрессия рекомбинантных антител к ферритину человека в растительных системах: дис. ... канд. биол. наук. Пушино, 2003. 148 с.

4. Бобков С.В. Культура изолированных пыльников гороха // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2010. № 6. С.19–21.

5. Сащенко М.Н., Жужжалова Т.П. Особенности размножения гороха в культуре *in vitro* // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. 2012. Т. 3, № 2. С. 41–45.

6. Бобков С.В. Регенерация растений в культуре изолированных пыльников гороха *Pisum sativum* L. // Инновационные направления современной физиологии растений. 2013. С. 184.



FORMATION OF TOBACCO AND PEA SHOOTS AND ROOTS CULTIVATED *IN VITRO* ON MEDIA WITH DIFFERENT CYTOKININS AND AUXINS

© M.N. Ageeva, A.A. Brilkina

Culture media were selected for efficient *in vitro* formation of tobacco and pea shoots using leaf explants. Root formation for tobacco plants was carried out on media supplemented with NAA and kinetin or 2iP. The most optimal medium for shoot and root formation in tobacco plants was MS with 1 mg*l⁻¹ BAP and 0.1 mg*l⁻¹ NAA, and MS with 1 mg*l⁻¹ kinetin and 0.1 mg*l⁻¹ NAA in pea plants.

Key words: cytokinins, auxins, pea, tobacco, *in vitro*, root, shoot.