

УДК 633.11:581.143.5

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ДЛЯ ИНДУКЦИИ МОРФОГЕННОГО КАЛЛУСОГЕНЕЗА
*BRIOPHYLLUM DAIGREMONTIANUM IN VITRO***

© А.В. Гильмаева, С.Н. Абрамов, В.Ю. Горбунова, Г.А. Геращенко, Н.А. Рожнова

Показан подбор оптимальной концентрации ауксинов и цитокининов для индукции каллусогенеза в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: каланхоэ, каллусогенез, морфогенез, 2,4-Д, ИУК, ауксин, БАП, цитокинины.

Для эффективного воспроизводства и рационального использования растительных ресурсов большое значение имеет знание основных особенностей их размножения. При всем многообразии существующих классификаций систем репродукции растений принято выделять размножение семенами (амфимиксис, или половое размножение, и апомиксис, бесполое размножение) и вегетативное размножение (воспроизводство в ряду поколений посредством андроклинии, вивипарии, столонами и т.д.) [1].

Механизмы различных способов размножения (амфимиксиса, апомиксиса, андроклинии, вивипарии и др.) хотя еще и далеки от понимания, но в основе их лежат явления дифференциации, дедифференциации и редифференциации клеток высших растений и изменение клеточных взаимодействий в составе целостного организма. Все эти явления связывают с функционированием меристематических (стволовых) клеток у растений [2–3]. В связи с этим немалый интерес представляют вопросы изучения возможностей бес-

полого размножения, в частности вивипарии, как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*.

Из-за методических особенностей изучение процессов развития *in vivo* у *Briophyllum daigremontianum* достаточно сложное и трудоемкое. Поэтому были предприняты попытки разработать модельную систему в условиях *in vitro*, а именно – получить каллусы, и уже из этих каллусов, в контролируемых условиях, рассмотреть те или иные пути морфогенеза.

Материалы и методы. Для введения в культуру *in vitro* использовались экспланты, взятые из растений каланхоэ *Bryophyllum daigremontianum*, пропагулы которых находились на стадии глобулярного зародыша [4] (ширина листовой пластинки составляла 17–23 мм, длина – 40–47 мм).

Для приготовления питательных сред использовали реактивы высокой степени очистки (квалификация не ниже «чда»).

В работе использовали среду по прописи Murasige, Skoog, 1962 [5].

ГИЛЬМАЕВА Алина Владиславовна, Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, e-mail: agilmaeva@mail.ru

АБРАМОВ Сергей Николаевич – к.б.н., Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, e-mail: abramov-67@mail.ru

ГОРБУНОВА Валентина Юрьевна – д.б.н., Башкирский государственный педагогический университет им. М. Акмуллы, e-mail: obg-bspu@mail.ru

ГЕРАЩЕНКОВ Григорий Алексеевич – к.б.н., Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: apomixis@anrb.ru

РОЖНОВА Наталья Анатольевна – к.б.н., Институт биохимии и генетики УНЦ РАН, e-mail: apomixis@anrb.ru

Оценка эффективности каллусогенеза производилась на 25-е сутки после инокуляции эксплантов на питательную среду.

Инокулировали экспланты надсеченной стороной на питательную среду. Высаженный материал культивировался при естественном освещении при 22°C и относительной влажности 70–80%.

Результаты и обсуждение. Оптимальную концентрацию фитогормонов ИУК, 2,4-Д и БАП в питательной среде для индукции каллусогенеза определяли эмпирически. Было опробовано 32 варианта среды, различающихся по концентрации 6-бензиламинопурина (БАП), 2,4-дихлорфеноксиуксусной (2,4-Д) и индолилуксусной кислот (ИУК). БАП использовали в концентрациях 0,75; 1,0 и 1,5 мг/л. ИУК использовали в концентрациях 1,0; 1,25; 1,5; 1,75 мг/л. 2,4-Д использовали в концентрациях 0,5; 1; 1,5; 2 мг/л.

Частота индукции каллусогенеза (%) на различных вариантах питательной среды отражена в табл. 1–2.

Таблица 1

Частота индукции каллусогенеза на различных концентрациях ИУК и БАП*

ИУК \ БАП	0,75	1,00	1,25	1,50
1,0	40	80	60	90
1,25	0	70	90	90
1,5	0	0	80	80
1,75	40	40	40	40

Примечание. * В ячейках указана частота индукции каллусогенеза, которую определяли как число полученных каллусов к числу инокулированных эксплантов.

Таблица 2

Частота индукции каллусогенеза на различных концентрациях 2,4-Д и БАП

2,4-Д \ БАП	0,75	1,00	1,25	1,50
0,5	40	40	0	40
1	40	0	0	70
1,5	40	70	0	0
2	0	0	0	40

Примечание. * См. табл. 1.

В результате проведенных экспериментов было установлено, что максимальная эффективность каллусогенеза на питательных средах с БАП и ИУК (~ 80–90%) отмечалась на 25-е сутки культивирования листовых эксплантов *B. daigremontianum* в присутствии 1,0 мг/л ИУК и 1,0 и 1,5 мг/л БАП; 1,25 мг/л ИУК и 1,0 и 1,25 мг/л БАП; 1,5 мг/л ИУК и 1,25 и 1,5 мг/л БАП.

Максимальная эффективность каллусогенеза на питательных средах с БАП и 2,4-Д (~ 70%) отмечалась на 25-е сутки культивирования в присутствии 1 мг/л 2,4-Д и 1,5 мг/л БАП; 1,5 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП. Полученные каллусы имели светло-зеленую либо светло-желтую окраску, среднеплотную консистенцию.

Для вариантов питательных сред, содержащих 1,25 мг/л ИУК и 1,0 мг/л БАП и 1,0 мг/л ИУК и 1,25 мг/л БАП, были также получены достаточно высокие значения каллусогенеза, которые составили 70 и 60% соответственно. На питательной среде, включающей 1,0 и 1,75 мг/л ИУК и 0,75–1,5 мг/л БАП, эффективность каллусогенеза снижалась и составляла в среднем около 40%. Полученные каллусы имели светло-зеленую либо светло-желтую окраску, среднеплотную консистенцию.

На питательных средах с концентрацией фитогормонов: 1,25 мг/л ИУК и 0,75 мг/л БАП; 1,5 мг/л ИУК и 0,75 и 1,0 мг/л БАП – индукции каллусогенеза за время культивирования не наблюдалось, и после усыхания среды данные экспланты повторно не пересаживались.

Для вариантов питательных сред, содержащих 0,5 мг/л 2,4-Д и 0,75, 1,0 и 1,5 мг/л БАП и 1,0 мг/л 2,4-Д и 0,75 мг/л БАП; 1,5 мг/л 2,4-Д и 0,75 мг/л БАП; 2,0 мг/л 2,4-Д и 1,5 мг/л БАП, эффективность каллусогенеза снижалась и составляла в среднем около 40%. Полученные каллусы имели светло-зеленую либо светло-желтую окраску, среднеплотную консистенцию. На остальных вариантах питательной среды, содержащей 2,4-Д, индукции каллусогенеза за время культивирования не наблюдалось, и после усыхания среды данные экспланты повторно не пересаживались.

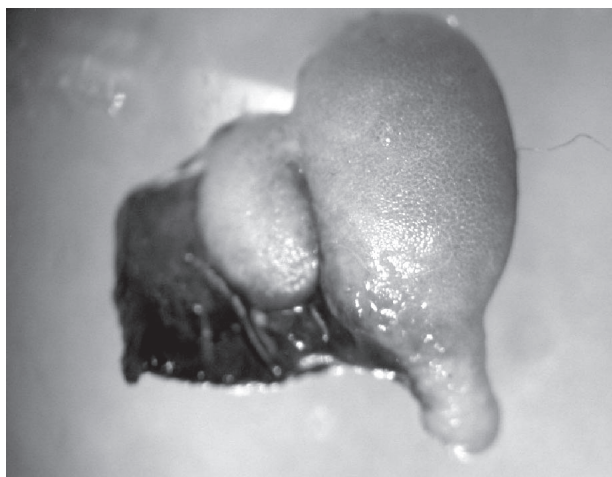


Рис. 1. Каллусная масса, образовавшаяся на экспланте при концентрациях: 1,25 мг/л ИУК и 1,25 мг/л БАП на 25-е сутки (×40)

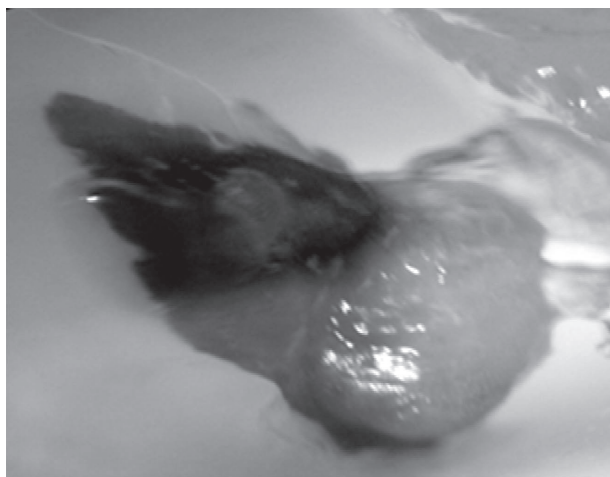


Рис. 2. Каллусная масса, образовавшаяся на экспланте при концентрациях: 1 мг/л ИУК и 1 мг/л БАП на 25-е сутки (×30)

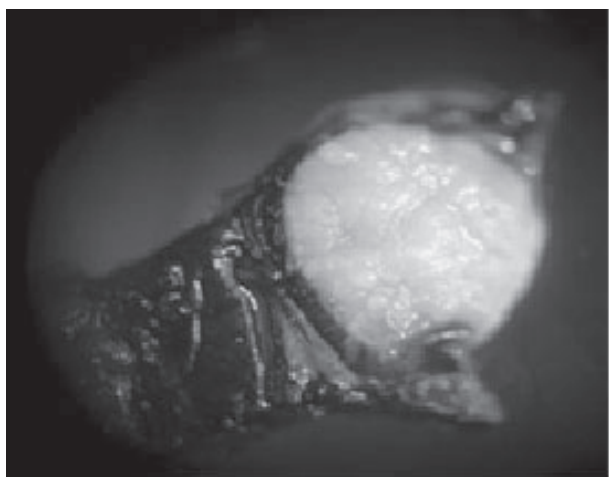


Рис. 3. Каллусная масса, образовавшаяся на экспланте при концентрациях: 1 мг/л 2,4-Д и 0,75 мг/л БАП на 25-е сутки (×40)

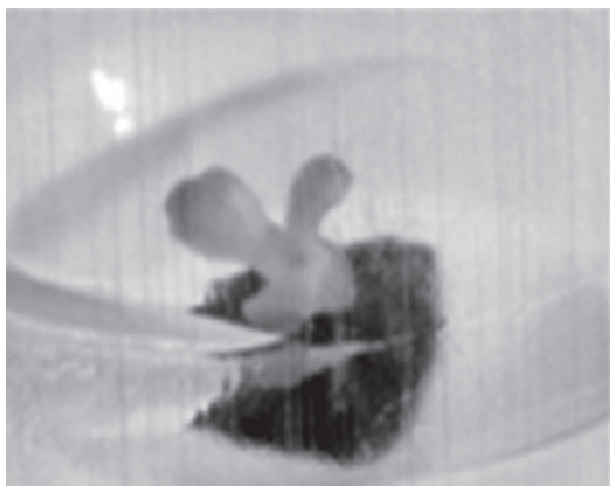


Рис. 4. Фрагмент каллуса, полученного на 40-е сутки при концентрациях 1, 25 ИУК и 1,25 БАП, посаженный для дальнейшего культивирования

Таким образом, среди протестированных вариантов ИУК, 2,4-Д и БАП эмпирическим путем были выявлены эффективные для индукции каллусогенеза *B. daigremontianum* концентрации фитогормонов в питательной среде 1,0 мг/л ИУК и 1,0 и 1,5 мг/л БАП; 1,25 мг/л ИУК и 1,0 и 1,25 мг/л БАП; 1,5 мг/л ИУК и 1,25 и 1,5 мг/л БАП; 1 мг/л 2,4-Д и 1,5 мг/л БАП; 1,5 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП.

Выводы. Эмпирически подобраны оптимальные для индукции каллусогенеза комбинации концентраций фитогормонов:

- 1) 1,0 мг/л ИУК и 1,0 и 1,5 мг/л БАП;
- 2) 1,25 мг/л ИУК и 1,0 и 1,25 мг/л БАП;

- 3) 1,5 мг/л ИУК и 1,25 и 1,5 мг/л БАП;
- 4) 1 мг/л 2,4-Д и 1,5 мг/л БАП;
- 5) 1,5 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л БАП.

Для индукции различных путей морфогенеза на 25-е сутки были взяты фрагменты каллусных масс, полученных на эксплантах *Bryophyllum daigremontianum* при концентрациях фитогормонов: 1,25 мг/л ИУК и 1,25 мг/л БАП; 1,5 мг/л ИУК и 1,5 мг/л БАП. Данные фрагменты посажены на питательные среды с концентрацией фитогормонов: 1,5 ИУК и 0,5 БАП; 2 ИУК и 0,5 БАП.

Каллусы, полученные на комбинациях концентраций фитогормонов 1, 2, 3, оцене-

ны нами как морфогенные (среды с ИУК) (рис. 1, 2, 4), на 4, 5 – неморфогенные (с 2,4-Д) (рис. 3).

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 11_04_97039 р_поволжье_а, № 13_04_01873 и № 13_04_01404).

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов С.Н., Бакирова А.В., Горбунова В.Ю., Герашенков Г.А., Постригань Б.Н. Анализ дифференциации клеток при вивипарии у *Bryophyllum daigremontianum* (Berger) // Мат-лы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 100-летию БашГУ, 2009.
2. Батыгина Т.Б. Эмбриодогения // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / под ред. Т.Б. Батыгиной. СПб.: Мир и семья, 1997. Т. 2. С. 628–634.
3. Батыгина Т.Б. Воспроизведение, размножение и возобновление // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепции / под ред. Т.Б. Батыгиной. В 3 т. СПб.: Мир и семья, 2000. Т. 3. С. 35–39.
4. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2002.
5. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.



OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS FOR THE INDUCTION OF MORPHOGENIC CALLUS FORMATION IN *BRIOPHYLLUM DAIGREMONTIANUM* *IN VITRO*

© A.V. Gilmaeva, S.N. Abramov, V.J. Gorbunova, G.A. Gerashchenkov, N.A. Rozhnova

The focus of this paper is on the optimal auxin and cytokinin concentrations for the induction of callus formation in *in vitro* culture.

Key words: kalanchoe, callusing, morphogenesis, 2,4-D, IAA, auxin, BAP, cytokinins.