

УДК 634.11: 58.085: 58.039

**ВЛИЯНИЕ УЛЬТРАЗВУКА НА КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЕ И
РЕГЕНЕРАЦИЮ АДВЕНТИВНЫХ ПОБЕГОВ ИЗ
ИЗОЛИРОВАННЫХ СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ ЯГОДНЫХ И
ПЛОДОВЫХ РАСТЕНИЙ**

Муратова Светлана Александровна

кандидат биологических наук, профессор

smuratova@yandex.ru

Папихин Роман Валериевич

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

Дубровский Максим Леонидович

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

Хорошкова Юлия Викторовна

аспирант

Сурайкина Ирина Анатольевна

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. Изучено влияние предварительной обработки ультразвуком высечек листьев плодовых и ягодных культур на интенсивность каллусообразования и регенерацию адвентивных побегов. Выбор оптимальных параметров ультразвуковой обработки стимулировал процесс образования каллуса на листовых дисках и увеличивал частоту регенерации адвентивных побегов.

Ключевые слова: плодовые и ягодные культуры, регенерация, листовые диски, каллус, адвентивные побеги, ультразвуковое излучение.

Разработка эффективных способов индукции морфогенеза из изолированных соматических тканей лежит в основе всех биотехнологических приемов, направленных на получение растений с измененным в лучшую сторону генотипом [4, 12]. Высокая эффективности регенерации адвентивных побегов из изолированных соматических тканей необходимое и обязательное условие для достижения успеха. Важнейшими факторами, ответственными за эффективность морфогенеза, можно назвать генотип растения-донора, минеральный и гормональный состав среды регенерации и физиологическое состояние экспланта [1, 3, 7]. После того, как подобраны подходящие экспланты и оптимальная по минеральному, углеводному и гормональному составу среда прибегают к дополнительным стимулирующим воздействиям.

Известно, что регенерация часто происходит в месте среза экспланта. Некоторые экспланты нечувствительны к обработке регуляторами роста, если они не разделены на части или не повреждены. Большинство исследователей, работающих с плодовыми и ягодными культурами, рекомендуют делать надрезы на листовых пластинках или брать высежки листьев. Поскольку для растения *in vivo* каллус – это группа клеток, возникающая при травмах и защищающая место поранения (раневого паренхима), в которой накапливаются питательные вещества для регенерации анатомических структур или утраченного органа, то интенсивность каллусообразования *in vitro* можно повысить, увеличивая раневую поверхность изолированного органа. Целые органы перед культивированием разрезают на сегменты или делают насечки острым скальпелем. Фрагментация молодых развернутых листьев растений рода *Malus* Mill. на 14 секций повышала способность листовых тканей к образованию адвентивных побегов и эмбриоподобных структур [10, 16]. Поперечные надрезы эксплантов *Torenia fournieri* значительно увеличили образование почек в пределах площади радиусом 0,5 см от места поранения [14]. Больше всего адвентивных побегов на листовых эксплантах *Vaccinium corymbosum* образовалось на месте точек повреждения [11]. Park и Son [15] отмечали, что листья, срезанные с культивируемых *in vitro* побегов *Populus*

nigra и *P. maximowiczii*, образовывали адвентивные побеги или корни на своей внешней поверхности, в зависимости от регуляторов роста в среде. Тем не менее, если листья прокалывали иглой в нескольких позициях (пять проколов было оптимальным), регенерация происходила в области перфораций. Авторы предположили, что поранение листовых пластинок способствовало передвижению эндогенных гормонов к местам поранений и повышало уровень промоторов, необходимых для запуска процесса регенерации. Очевидно, что поранение эксплантов способствует и поступлению экзогенных регуляторов роста в культивируемые ткани растений.

Одним из перспективных способов обработки растительных тканей в культуре *in vitro* является ультразвук (УЗ) [13]. Физико-химическое действие ультразвука на биологические объекты, связано с тем что УЗ-облучение повышает проницаемость клеточных мембран и усиливает диффузные процессы, изменяет концентрацию водородных ионов в тканях, вызывает расщепление высокомолекулярных соединений, ускоряет обмен веществ [2, 5, 8, 9]. Применение УЗ-излучения требуемых параметров позволяет нанести микроповреждения и обеспечить более интенсивное поступление фитогормонов в ткани растений.

В связи с этим, целью наших научных исследований являлось изучение влияние УЗ-излучения на процессы каллусообразования и морфогенеза в культуре листовых эксплантов ягодных и плодовых культур для разработки эффективных приемов повышения частоты регенерации адвентивных побегов из листовых дисков и каллуса в культуре *in vitro* с использованием ультразвукового излучения.

Методы и объекты исследований

Биологическими объектами исследования служили изолированные листовые ткани культивируемых *in vitro* растений ежевики (сорт Честер Торнлесс), лимонника китайского, сливы (сорт Стартовая), клоновых подвоев яблони селекции Мичуринского ГАУ.

Для облучения эксплантов использовали ультразвуковую установку

УЗДН-2Т с цилиндрическим металлическим излучателем, частота УЗ-излучения – 22 кГц. Время воздействия – 60 с. служили высечки четырех-пяти верхних листьев с хорошо развитых побегов со среды размножения. Каждый лист нарезали поперечно центральной жилке на 2-3 фрагмента площадью 0,5-1,0 см². Использовали основания листовых пластинок с черешками и средние части листовых пластинок. Листовые высечки предварительно нарезали в количестве 25-30 шт. на вариант и в стерильных условиях перед каждым облучением помещали в металлическую насадку излучателя с 10 мл жидкой среды MS с добавлением 5,0 мг/л 2,4-Д. После обработки УЗ экспланты переносили в культуральные сосуды на питательную среду.

В работе использовали следующие варианты мощности УЗ: 0,69; 1,15; 2,67; 4,66; 6,38; 8,0; 10,01; 12,55; 14,1 Вт/см² и контрольные варианты (К1 – без ультразвуковой обработки, без насечек; К2 – без ультразвуковой обработки и с насечками поперечно центральной жилке).

После облучения листовые диски помещали на питательную среду регенерации на основе питательной среде MS [11] с добавлением витаминов по Мурасиге-Скугу, 30 г/л глюкозы, 5,0 мг/л 6-БАП и 0,5 мг/л ИУК. В опытах по регенерации листовые диски культивировали в темноте при температуре 24°C. Эксперименты продолжались в течение 3-3,5 месяцев (3 пассажа по 4-5 недель каждый). Регенерировавшие побеги срезали с листовых дисков и доращивали по стандартной схеме клонального микроразмножения растений.

Результаты и их обсуждение

Наши исследования показали, что при культивировании целых листовых пластинок каллус образуется только на срезах черешков. Нанесение дополнительных поранений как скальпелем (вариант К2), так и обработкой ультразвуком достаточной мощности, у большинства генотипов существенно повышало частоту каллусообразования.

В результате проведенных исследований было установлено, что УЗ-воздействие мощностью от 1,15 до 14,1 Вт/см² в течение 60 с приводит к микроповреждениям тканей растений, в результате чего активизируется

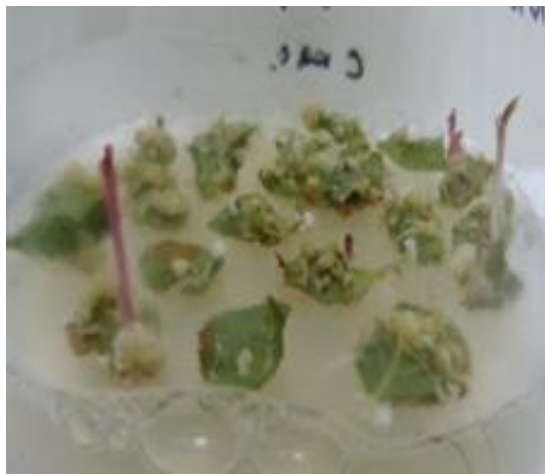
процесс каллусообразования по всей листовой пластинке. Интенсивность каллусообразования возрастала с увеличением мощности УЗ, при этом увеличивалось и количество дисков с некротическими участками, возникающими вследствие повреждения растительных клеток УЗ-воздействием. Эффект УЗ обработки зависел от морфофизиологических особенностей растений, определяемых генотипом, и физиологического состояния экспланта. При использовании очень молодых, нежных листьев требовалось более щадящее воздействие, поскольку чрезмерное повреждение изолированных органов растений приводило к некрозу тканей и угнетало ростовые и регенерационные процессы.

Существенной активизации процесса каллусогенеза достигли при работе с листовыми эксплантами лимонника китайского. Нанесение на листовые высежки поперечных насечек скальпелем (контроль 2) лишь незначительно усилило интенсивность каллусообразования по сравнению с эксплантами без дополнительных поранений листовой пластинки (контроль 1), в то время как повреждение листовых дисков УЗ облучением в вариантах от 2,67 до 14,1 Вт/см² привело к значительному повышению интенсивности каллусообразования. В вариантах с озвучиванием эксплантов в 2-2,5 раза увеличилось число образовавшихся каллусов, и в 2-4 раза возрос сырой вес каллусной массы.

Микроповреждения листовых пластинок при оптимальных параметрах УЗ-воздействия способствовали повышению частоты регенерации адвентивных побегов сливы, клоновых подвоев яблони, ежевики. Например, частота регенерации адвентивных побегов ежевики возросла с 28,6% в контроле до 46,2% при мощности УЗ 1,15 Вт/см² и от 38,5 до 40,9% при мощности УЗ от 2,67 до 5,6 Вт/см². Наибольшая частота регенерации побегов клоновых подвоев яблони, существенно выше значений контроля К1, отмечена в вариантах с мощностью УЗ-обработки 4,66 и 5,6 Вт/см² (рис. 1, 2). Применение УЗ стимулировало и ускоряло процесс органогенеза. Также существенно, в 1,5-3 раза, увеличилось число побегов-регенерантов на каждом листовом диске.



K1



K2



B3



B6

Рисунок 1 - Каллусообразование и регенерация адвентивных побегов на листовых пластинках клонового подвоя яблони 15-2-2 при их обработке УЗ-излучением: K1 – контроль 1 (без УЗ-обработки, без насечек); K2 – контроль 2 (без УЗ-обработки с насечками поперечно центральной жилке); B3 – 4,66 Вт/см²; B6 – 8,0 Вт/см²

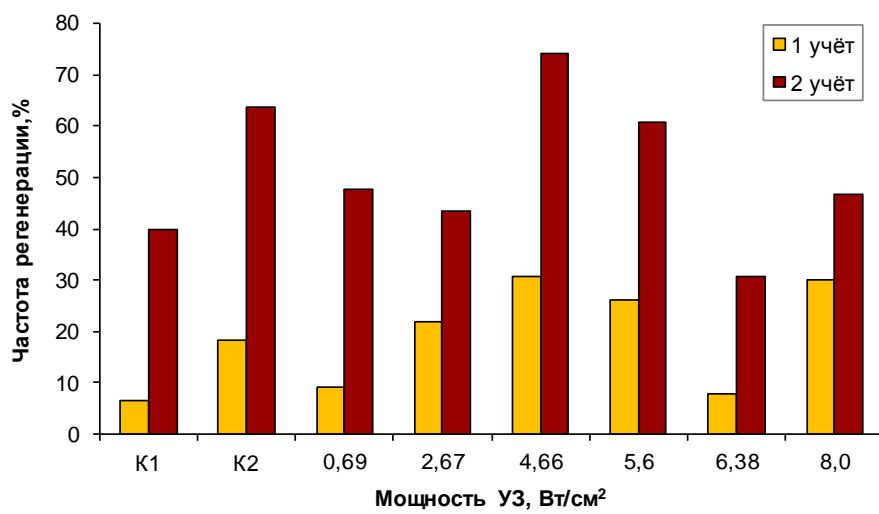


Рисунок 2 - Эффективность регенерации из каллуса листового происхождения клонового подвоя яблони 15-2-2 при разной мощности УЗ-обработки

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено что предварительная обработка эксплантов ультразвуком. мощностью от 1,15 до 14,1 Вт/см² в течение 60 с приводит к микроповреждениям растительных тканей, в результате чего активизируется процесс каллусообразования по всей листовой пластинке. Оптимальные режимы воздействия ультразвуком на 15-20% повышают частоту регенерации из каллуса и в 1,5-3 раза увеличивают число адвентивных побегов.

Исследования выполнены в рамках проекта №5-МУ-19(02) при финансовой поддержке Управления образования и науки Тамбовской области и Совета молодых ученых и специалистов Тамбовской области.

Список литературы:

1. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: учебное пособие / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Голямина, И.П. Ультразвук. Маленькая энциклопедия / И.П. Голямина. – М.: Советская энциклопедия, 1979. – 400 с.
3. Григорьева, Л.В. Влияние регуляторов роста при микроклональном размножении смородины черной / Л.В. Григорьева, Н.А. Куликова, О.Г. Гиченкова // Известия нижевожского агроуниверситетского комплекса: Наука и высшее профессиональное образование. – № 3 (51). – Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2018. – С. 50-55.
4. Григорьева, Л.В. Современные способы размножения ягодных культур / Л.В. Григорьева, О.Г. Гиченкова, Н.А. Куликова // Приоритетные векторы развития промышленности и сельского хозяйства: Материалы I междунар. науч.-практ. конф. – Т. 2. – Макеевка: ГОУ ВПО Донбасская аграрная академия, 2018. – С. 40-43.
5. Кирина, И.Б. Биохимическая оценка плодов голубики высокой и барбариса в условиях Тамбовской области / И.Б. Кирина, Д.М. Брыксин, И.А. Иванова // Проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса

юга России: сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Победы и 40-летию инженерного факультета. - Махачкала, 2015. - С. 144-148.

6. Кирина, И.Б. Некоторые материалы для ведения Красной книги Тамбовской области / И.Б. Кирина // Сб.: Разнообразие и устойчивое развитие агробиоценозов Омского Прииртышья: материалы Национальной научно-практической конференции, посвященной 90-летию ботанического сада Омского ГАУ. - Омск: ФГБОУ ВО Омский ГАУ, 2017. - С. 57-60.

7. Оценка способности к укоренению подвойных форм яблони в условиях *in vitro* / Н.Л. Чурикова, Д.О. Горлов, С.А. Муратова [и др.] // Сборник научных трудов, посвященный 85-летию Мичуринского государственного аграрного университета Сборник научных трудов. В 4-х томах. – Мичуринск, 2016. – С. 271-277.

8. Способы получения безвирусных садовых культур / Р.В. Папихин, С.А. Муратова, М.Л. Дубровский [и др.] // Наука и Образование. - 2020. – Т. 3. - № 1. - С. 87.

9. Эльпинер, И.Е. Ультразвук. Физико-химическое и биологическое действие / И.Е. Эльпинер. – М.: Гос. изд-во физ.-мат. лит., 1963. – 420 с.

10. Dubrovsky, M.L. Analysis of the karyotype of the russian apple tree clonal rootstocks bred at the Michurinsk State Agrarian University / M.L. Dubrovsky, R.V. Papikhin // Amazonia Investiga. - 2019. - Т. 8. - № 21. - С. 688-698.

11. *In vitro* shoot regeneration on leaf tissue from micropropagated highbush blueberry / P. Callow, K. Haghghi, M. Giroux, J. Hancock // Hort. Science – 1988. – V. 23 – P. 807-808.

12. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – V.15, №13. – P. 473-497.

13. Muratova, S.A. The effect of ultrasound irradiation on induction of callus formation and morphogenesis from the leaf discs of apple clonal rootstocks / S.A. Muratova, R.V. Papikhin // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2018. -

V.10 (10). - P. 2592-2596.

14. Norizaku, T. Effects of wounding on adventitious bud formation in *Torenia fournieri* stem segments cultured *in vitro* / T. Norizaku, S. Tanimoto, H. Harada // J. Exp. Bot. – 1985. – V. 36 – P. 841-847.

15. Park, Y.G. In vitro organogenesis and somatic embryogenesis from punctured leaf of *Populus nigra* x *P. maximowiczii* / Y.G. Park, S.H. Son // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1988. – V. 15 – P. 95-105.

16. Welander, M. Plant regeneration from leaf and stem segments of shoots raised *in vitro* from mature apple trees / M. Welander // J. Plant Physiol. – 1988. – V. 132. – P. 738-744.

UDC 634.11: 58.085: 58.039

**THE EFFECT OF ULTRASOUND IRRADIATION ON CALLUS
FORMATION AND REGENERATION OF ADVENTITIOUS SHOOTS
FROM ISOLATED LEAF TISSUES OF HORTICULTURAL CROPS**

Muratova Svetlana Aleksandrovna

Candidate of Biological Sciences, Professor

Papikhin Roman Valeriyevich

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor

Dubrovsky Maksim Leonidovich

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor

Khoroshkova Yulia Victorovna

postgraduate student

Suraykina Irina Anatolyevna

Candidate of Agricultural Sciences, Associate Professor

Michurinsk State Agrarian University

Michurinsk, Russia

Abstract. The influence of ultrasound pretreatment of leaves disks of fruit and berry crops on the intensity of callus formation and regeneration of adventitious shoots was studied. Choosing optimal parameters of ultrasound treatment stimulated the process of callus formation on the leaf disks, and increased the frequency of regeneration of adventive shoots of horticultural crops.

Key words: horticultural crops, regeneration, leaf discs, callus, adventive shoots, ultrasound irradiation.