

УДК 581.143.6

ИНДУКЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Юлия Викторовна Хорошкова

аспирант

yuhoroshkova@yandex.ru

Светлана Александровна Муратова

кандидат биологических наук, профессор

smuratova@yandex

Мичуринский государственный аграрный университет

г. Мичуринск, Россия

Аннотация. В статье рассмотрены вопросы индукции морфогенеза из изолированных тканей растений. Представлены методы регенерации растений из изолированных тканей путем органогенеза и эмбриогенеза. Дан обзор исследований, показывающих влияние генотипа, регуляторов роста, типа экспланта и других факторов на частоту регенерации адвентивных побегов.

Ключевые слова: культура тканей растений, морфогенез, каллус, частота регенерации.

Теоретической основой разработки методик восстановления целых организмов из изолированных соматических клеток растений лежит концепция тотипотентности растительных клеток. Каждая клетка растений содержит весь набор генов и теоретически, при создании надлежащих условий, способна сформировать целое растение. На практике, лишь одна клетка из 400–1000 штук становится на путь регенерации. Поэтому некоторые исследователи говорят о негативном влиянии концепции тотипотентности растительной клетки на стратегию исследовательской работы с культурой клеток и тканей растений [12]. В реальных условиях далеко не каждый орган или участок ткани растения, в особенности многолетних древесных культур проявляет тотипотентность *in vitro* [16]. Способность к регенерации в значительной степени определяется генотипическими особенностями растения, типом и физиологическим состоянием изолированного экспланта. Процесс индукции того или иного типа морфогенеза регулируется на клеточном, тканевом и организменном уровнях [1–5, 9].

Получить растения–регенеранты в культуре изолированных тканей можно несколькими путями: культивируя зиготические зародыши (эмбриогенез), путем инициации адвентивных побегов из каллуса (непрямая регенерация) или непосредственно из клеток экспланта (прямая регенерация) с последующим их укоренением или путем формирования из соматических клеток зародышеподобных структур, которые при дальнейшем пассировании способны развиваться в полноценное растение (соматический эмбриогенез) [3, 8].

При разработке методик клонального микроразмножения наиболее часто инициируют развитие побегов из уже существующих меристем пазушных почек, как наиболее стабильных в генетическом отношении структур, тогда как для получения новых генотипов растений наиболее часто используют каллусные культуры. Каллус представляет собой недифференцированную массу делящихся клеток, образующихся на изолированных эксплантах в условиях *in vitro* или в местах поранения органов растений в условиях *in vivo*. В каллусе накапливаются питательные вещества необходимые для регенерации анатомических структур

или утраченного органа. Доказано, что интенсивность каллусообразования и регенерации *in vitro* можно повысить, увеличивая раневую поверхность изолированного органа. В то время как целые экспланты могут быть невосприимчивы к экзогенным регуляторам роста. В частности, для повышения эффективности регенерации из листовых тканей, рекомендуется делать надрезы на листовых пластинках или брать высежки листьев. Фрагментация молодых листьев на 14 секций повышала частоту адвентивного органогенеза *Malus* [29]. Поперечные надрезы эксплантов *Torenia fournieri* значительно увеличили образование почек в пределах площади радиусом 0,5 см от места поранения [20]. Эффективным способом повышения эффективности каллусообразования и регенерации стало применение ультразвукового излучения для нанесения микроповреждений на листовые экспланты [6, 7].

Морфогенетический потенциал неодинаков и в разных областях листовых пластинок. Так, наиболее морфогенными зонами листьев каладиума были зона соединения листовой пластинки с черешком и край высежки листа. В зоне соединения листовой пластинки с черешком эмбриогенные структуры появлялись непосредственно в эпидермальном и субэпидермальном слое [9]. При этом условия культивирования определяли пути реализации морфогенетического потенциала каладиума. В отсутствии освещения формировались только соматические зародыши. На свету проходили разные морфогенетические процессы: органогенез, непрямой и прямой соматический эмбриогенез [9]. Выявлена зависимость регенерационной способности от размера экспланта и его ориентации на поверхности питательной среды [13].

Наличие экзогенных регуляторов роста в питательной среде и их соотношение является важнейшим фактором, определяющим переход каллуса от пролиферации к органогенезу. При высоком соотношении экзогенных гормонов цитокинин / ауксин происходит образование микропобегов, при низком – индуцируется корнеобразование, а при среднем – происходит пролиферация каллуса. Эта закономерность была впервые установлена Скугом и Миллером [25] при культивировании каллуса сердцевинной паренхимы стебля табака и легла в

теоретическую основу регуляции регенерации растений из каллуса. Оптимальные для каждого процесса концентрации регуляторов роста варьируют в зависимости от вида растения, типа и физиологического состояния экспланта и других факторов. Сложный органогенный ответ, когда из одного экспланта одновременно формируются каллус, побеги, корни и соматические эмбриониды является следствием клеточной гетерогенности эксплантов [24].

Разрабатываемые в последние десятилетия технологии с использованием тонких слоёв клеток (thincelllayers, TCL), полученных за счёт поперечных или продольных срезов небольших эксплантов, основаны на управление процессами морфогенеза путём оптимизации условий культивирования [26, 28]. Этот подход успешно применяли для клонирования ирисов, гладиолусов, роз, пеларгоний, петуний, тополей и ряда хвойных [18, 24, 27].

В значительной степени влияют на эффективность регенерации условия культивирования эксплантов. По мнению многих исследователей интенсивность освещения и продолжительность фотопериода имеет большое значение для индукции органогенеза [10, 11, 14, 17, 19]. Снижение интенсивности освещения до 1–1,5 клк или отсутствие освещения на начальных этапах культивирования эксплантов стимулировало процесс адвентивного побегообразования у ряда культур [15, 23]. стимулировало адвентивное побегообразование у листовых дисков иссопа. Показано, что для некоторых видов декоративных растений отсутствие освещения на начальных этапах культивирования эксплантов стимулирует процесс адвентивного побегообразования [15, 23].

Температура также оказывает большое влияние на рост и регенерацию изолированных органов и тканей растений. Например, есть данные, что предварительная стратификация эксплантов луковичных культур путем их охлаждения, улучшает их регенерационную способность при культивировании на питательных средах [11]. Каллус *Begonia venosa* Skan., индуцированный из эксплатов соцветий на питательной среде, дополненной 0,5 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК культивировали при температуре 21°C [22]. Снижение температуры до 17°C замедляло индукцию и рост каллуса, тогда как повышение до 25°C

вызывало его некроз [22]. Экспланты из чешуй луковиц гиацинта, культивируемые при температуре 15–20°C, формировали многочисленные микропобеги *in vitro*, тогда как экспланты, культивируемые при 25°C формировали единичные побеги [21].

Для многих многолетних культур работы по усовершенствованию хозяйственно–ценных генотипов методами биотехнологии до сих пор крайне немногочисленны. Это связано в первую очередь именно с трудностями индукции морфогенеза из клеток и тканей, в особенности прошедших длительное культивирование *in vitro*. Этим обусловлена актуальность работы по разработке эффективных методов культивирования и регенерации адвентивных побегов из изолированных соматических тканей садовых культур.

Список литературы:

1. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений. СПб.: Изд–во С.–Петербур. ун–та, 2002. 232 с.
2. Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro*. Эмбриодогенез у покрытосеменных растений // Ботанический журнал. 1978. Т. 63. № 1. С. 87–111.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе: учебное пособие. М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. 160 с.
4. Бутенко Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений // Гормональная регуляция онтогенеза растений. М.: Наука, 1984. С. 42–54.
5. Бутенко Р.Г., Яковлева З.М. Контролируемый органогенез и регенерация целого растения в культуре недифференцированной ткани // Изв. АН СССР. Сер. Б. 1962. № 2. С. 230–241.
6. Влияние ультразвука на каллусообразование и регенерацию адвентивных побегов из изолированных соматических тканей ягодных и плодовых растений / С.А. Муратова, Р.В. Папихин, М.Л. Дубровский, Ю.В. Хорошкова, И.А. Сурайкина // Наука и Образование. 2020. Т. 3. № 4. С.152.

7. Влияние ультразвукового облучения на образование каллуса и органогенез клонового подвоя яблони в условиях *in vitro* / С.А. Муратова, Р.В. Папихин, М.Л. Дубровский, Ю.В. Хорошкова // Коняевские чтения. Сборник научных трудов VII Международной научно–практической конференции. 2020. С.143–145.
8. Катаева Н. В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
9. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологических систем получения и сохранения декоративных и плодовых культур /И.В. Митрофанова // Труды Никитского ботанического сада. 2009. Том 131. С. 9–22.
10. Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа получения и сохранения многолетних садовых культур. К.: Аграрная наука, 2011. 344 с.
11. Митрофанова О.В., Иванова Н.Н. Получение безвирусных клонов луковичных цветочных культур // Бюлл. Гос. Никит. ботан. сада. 1987. Вып. 62. С. 37–41.
12. Моисеева Н.А. Молекулярные и клеточные механизмы морфогенеза в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М.: Наука, 1991. С. 166–185.
13. Муратова С.А., Соловых Н.В., Терехова В.И. Индукция морфогенеза из изолированных соматических тканей растений: монография. Мичуринск: Изд–во Мичуринского госагроуниверситета, 2011. 107 с.
14. Способы получения безвирусных садовых культур / Р.В. Папихин, С.А. Муратова, М.Л. Дубровский, И.Б. Кирина, Е.В. Комарова // Наука и Образование. 2020. Т. 3. № 1. С.87.
15. Basal S.K. Ornamental Plants and Biotechnology // Jaipur: BookEnclave, 2007. VIII. 308 p.
16. Bonga J.M., Klimaszevska K.K., P. von Aderkas Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers // Plant. Cell Tiss. Organ. Cult. 2010. V.100. P.

241–254.

17. Dittmer C., Oertel C. Der Aufbauvirus freier Pelargoni endurch Meristem kultur, Wärmebehandlung und Virusverlust // Tag.–Ber. Akad. Landwirsch. Berlin: Wiss. DDR. 1980. N 184. S. 425–430.

18. Gill R., Gerrath J., Saxena P. K. High–frequency direct embryogenesis in thin layer cultures of hybrid seed geranium (*Pelargonium*) // Can. J. Bot. 1992. Vol. 71. P. 408–413.

19. Murashige T. Manipulation of organ culture in plant tissue cultures // Botanical Bulletin Academia Sinica. 1977. Vol. 18. P. 1–24.

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

21. Pierik R.L.M., Steegmans H.H.M. Effect of auxins, cytokinins, gibberellins, abscisic acid and ethephon of hyacinth // Physiologia Plantarum. 1975. Vol. 34. P. 14–17.

22. Pierik R.L.M., Tetteroo T.A.A. Vegetative propagation of *Begonia venosa* Skan in vitro from inflorescence explants // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1987. № 10. P. 135–142.

23. Plant biotechnology in ornamental horticulture / L.Yi, P.Yan– Binghamton [et al.]: Hawort, 2006. XIX. 528 p.

24. Rout G. R., Mohapatra A., Jain S. M. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects // Biotechnology Advances. 2006. Vol. 24. P. 531–560.

25. Skoog F., Miller C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro* // SympSocExp Biol. 1957. Vol. 11. P. 118–131.

26. Teixeira da Silva J. A. Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology // African J. of biotech. 2003. Vol. 2. P. 683–691.

27. Teixeira da Silva J. A., Tran Thanh Van K., Biondi S. Thin cell layers: developmental building blocks in ornamental biotechnology // Floricultural and ornamental biotechnology. 2007. Vol. 1. P. 1–13.

28. Tran Thanh Van K. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers // International review of Cytology. 1980. Vol. 32. P. 291–311.

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

UDC 581.143.6

INDUCTION OF MORPHOGENESIS IN PLANT TISSUE CULTURE

Yulia V. Khoroshkova

postgraduate

yuhoroshkova@yandex.ru

Svetlana A. Muratova

Candidate of Biological Sciences, Professor

smuratova@yandex

Michurinsky State Agrarian University

Michurinsk, Russia

Annotation. Problems of morphogenesis' induction from isolated tissues of plants were discussed. An overview method of plant regeneration from isolated tissues by organogenesis and embryogenesis are presented. A review of studies showing the influence of genotype, growth regulators, type of explant, and other factors on the frequency of adventitious shoot regeneration.

Key words: plant tissue culture, morphogenesis, callus, regeneration frequency.