

АДВЕНТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ВИШНИ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

В работе проанализирована способность микрорастений вишни к адвентивной регенерации в зависимости от генотипа, типа экспланта, способа культивирования экспланта, состава питательных сред, условий культивирования. Был отработан результативный метод адвентивной регенерации вишни.

Адвентивная регенерация является одним из способов микрклонального размножения растений в культуре *in vitro*. Почки, возникшие непосредственно из тканей и клеток эксплантов растений, обычно их не образующих, называются адвентивными [1]. Адвентивные (придаточные) почки образуются не из первичных апикальных, а из вторичных, боковых и раневых меристем или в результате дедифференциации клеток (чаще паренхимных) «постоянных» тканей [2]. У многих видов растений их образование может быть индуцировано высоким отношением цитокининов к ауксинам в питательной среде [3].

Регенерация адвентивных побегов, корней или эмбриоидов из соматических растительных клеток экспланта может происходить через непрямую регенерацию — образование каллуса и формирование побегов, или через «прямую» регенерацию, когда клетки экспланта становятся способными к регенерации без формирования каллусных тканей [1]– [4].

Способность микрорастений вишни к адвентивной регенерации может зависеть от генотипа, типа экспланта, способа культивирования экспланта, состава питательных сред, условий культивирования.

Адвентивные побеги могут образовываться на эксплантах листьев, черешков, корней и других органов растений различных видов плодовых и ягодных культур [1], [5]–[18].

Для регенерации побегов плодовых косточковых культур, таких как вишня, черешня, персик, абрикос, из исходных эксплантов (целых листьев и их сегментов) используются различные среды: Мурасиге-Скуга (МС), Ллойда и Мак Коуна (WPM), Драйвера и Куниюки (DKW), Курена и Лепуавра (QL) [7]–[13]. Для экспериментов по адвентивной регенерации вишни и черешни чаще всего используется среда Ллойда и Мак Коуна для древесных растений – Woody Plant Medium (WPM), дополненная различными стимуляторами роста [7], [8], [10]. Из цитокининов в основном используют 6-бензиламинопурин (6-БАП), тидиазурон (TDZ), из ауксинов — α -нафтилуксусную кислоту (НУК) [8], [13], β -индолил-3-масляную кислоту (ИМК) [7], [12], 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) [10]. Важно отметить, что в литературе нет единого мнения ни об эффективности применения определенных типов сред и фитогормонов, ни о типе экспланта, ни о способе культивирования эксплантов для достижения эффективной адвентивной регенерации у косточковых культур.

В настоящее время возрос интерес к методам культуры тканей и клеток в связи с возможностью применения новых клеточных технологий в растениеводстве. Использование методов генной инженерии позволяет решить ряд проблем в селекции растений. Для многих современных сортов растений возможности генной инженерии ограничены как отсутствием эффективных методов регенерации, так и небольшим набором сортов, для которых проведено изучение регенерационной способности в культуре *in vitro*. Поэтому отбор новых генотипов, способных обеспечить высокую регенерацию в культуре *in vitro*, является важным этапом в работах по генетической трансформации и клеточной селекции растений.

Род *Prunus* является одним из наиболее сложных в плане получения эффективной адвентивной регенерации в культуре *in vitro*. Проблема получения регенерантов у представителей косточковых культур актуальна, но ею занимаются лишь немногие научно-исследовательские учреждения в мире [5], [7]–[13], [15]. В связи с этим цель данной работы состояла в поиске и разработке результативных методов адвентивной регенерации вишни.

Растительный материал. Объектами исследований являлись четыре сорта вишни различного происхождения: два сорта вишни обыкновенной (*C. vulgaris* Mill.) — Владимирская (номер по каталогу ВИР: к-5331), Еникеевка (к-38000); сорт вишни обыкновенной с доминированием признаков черешни (*C. avium* (L.) Moench) — Память Учителя (к-10613) и сорт Алмаз (к-34131), созданный на основе межвидовой гибридизации *C. vulgaris* \times *C. maackii*. Микро-растения этих сортов сохраняются в коллекции *in vitro* Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства имени Н. И. Вавилова на среде Мурасиге-Скуга (МС), дополненной 6-бензиламинопурином (БАП), в концентрации 0,5 мг/л при 16 часовом фотопериоде и температуре 22 ± 2 °С.

Регенерация адвентивных побегов вишни. Изучение способности к адвентивной регенерации различных сортов вишни проводилось с использованием шести вариантов питательных сред, подобранных по литературным источникам (табл. 1).

В качестве эксплантов использовали различные части микрорастений: целые листья, с нанесёнными на них поперечными надрезами вдоль центральной жилки листа (рис. 1,а), сегменты листьев (три сегмента из каждого листа)

Питательные среды для адвентивной регенерации вишни

Вариант среды	Минеральная основа	Фитогормоны, мг/л		Агар, г/л	Сахар, г/л	Ссылки
		цитокинины	ауксины			
I	МС	2 БАП	0,1 ИМК	7	30	[16]
II	МС	0,1 ТДЗ	–	7	30	[17]
III	МС	2 БАП 0,5 ТДЗ	0,2 2,4-Д	7	30	[18]
IV	МС	1 ТДЗ	0,2 2,4-Д	7	30	[18]
V	WPM	2 БАП	1 НУК	7	30	[7]
VI	WPM	1 ТДЗ	0,05 НУК	4,5	20	[8]

Примечания. WPM — Woody Plant Medium, среда Ллойда и Мак Коуна для древесных растений. ТДЗ — тидиазурон. 2,4-Д — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота. ИМК — β-индолил-3-масляная кислота. НУК — α-нафтилуксусная кислота.

(рис. 1,б), черешки листьев и сегменты корней. В опытах использовали верхушечные, полностью сформированные листья микро-растений трёхнедельного возраста (первые три-четыре листа). Листовые экспланты всех типов культивировали двумя способами: абаксиальной и адаксиальной к среде. В каждую чашку Петри помещали по 20–35 сегментов листьев, по 30 сегментов черешков листьев, по 40–50 сегментов корней и по 10–15 целых листовых эксплантов. Все типы эксплантов культивировали без пересадки на свежие регенерационные среды; т. е. регенеранты формировались на исходных средах. Учёт результатов опыта проводили через 1,5 месяца после закладки экспериментов. Эксперименты проводили в двух-трёх повторностях, используя по 40–126 эксплантов в каждом варианте опыта для каждого сорта. Полученные данные были проанализированы в программе Statistica 6.0 методом однофакторного дисперсионного анализа (модуль ANOVA).

Микроразмножение и укоренение побегов-регенерантов вишни и перенос их в условия *in vivo*. Через 1,5 месяца после закладки экспериментов, регенеранты вишни были срезаны с эксплантов и перенесены на среды для микро-размножения: МС + 0,5 мг/л БАП.

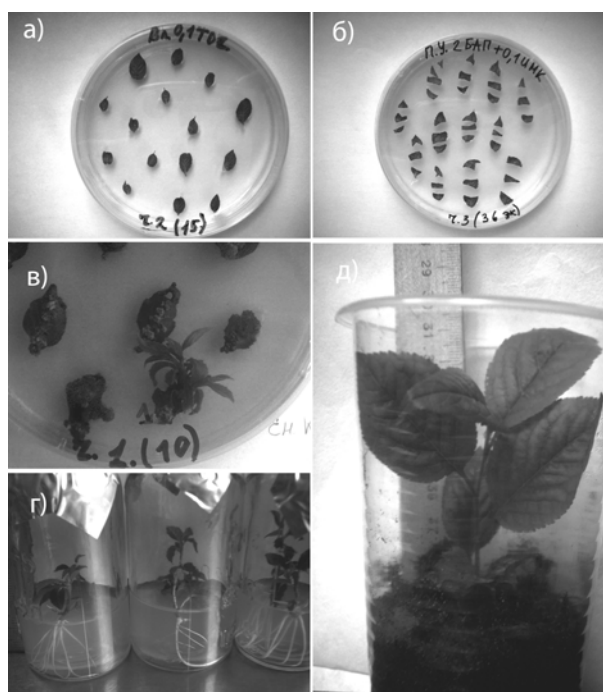


Рис. 1. Адвентивная регенерация вишни. Исходные экспланты: а — целые листья микро-растений; б — сегменты листьев; в — формирование адвентивных побегов у сорта Еникеевка из листовых эксплантов на среде V; г — укоренённые растения-регенеранты; д — адаптация растений-регенерантов к условиям *in vivo*

После этапа микроразмножения побеги-регенеранты вишни длиной от 1 см и более переносили на среду для укоренения: МС с половинным составом солей, дополненной 1 мг/л ИМК, и (или) на среде МС с половинным составом солей без гормонов.

Для переноса укоренённых микрорастений вишни в условия *in vivo*, использовали индивидуальные прозрачные пластиковые стаканы объёмом 0,5 л (высотой 14 см), наполовину заполненные простерилизованным грунтом (торфяная земля — песок в соотношении 3 : 1).

Экспериментальные результаты и их обсуждение

Регенерация адвентивных побегов вишни. После одной-двух недель культивирования эксплантов на регенерационных средах I, II, V и VI наблюдали разрастание тканей эксплантов и каллусообразование. Начало появления адвентивных почек на исходных листовых эксплантах наблюдалось на 15–20-й день после начала культивирования на средах I, V и VI. На среде II листовые экспланты формировали каллус, но не образовывали регенеранты; на этой среде единственный регенерант сформировался на сегменте корня сорта Память Учителя. На средах III–IV отмечен наиболее высокий процент некротизации эксплантов (40–100%); адвентивной регенерации на этих средах добиться не удалось.

Адвентивные побеги чаще всего появлялись в верхушечной зоне целых листовых эксплантов и преимущественно на базальных сегментах листа микрорастений. В вариантах опыта, где в качестве эксплантов использовались целые листья (с поперечными надрезами вдоль центральной жилки листа, культивируемые адаксиальной поверхностью к среде), регенеранты появлялись на адаксиальной поверхности листовой пластинки и росли внутрь регенерационной среды. В опытах по адвентивной регенерации из листовых эксплантов наблюдалась единичная и множественная регенерация побегов. Один листовой эксплант мог иметь несколько зон — от одной до трёх, в каждой зоне — от одного до шести растений-регенерантов.

Влияние сред и типа эксплантов на способность сортов вишни к адвентивной регенерации. В результате изучения способности микрорастений вишни к адвентивной регенерации на разных средах были выявлены существенные различия между вариантами опытов — частота регенерации на среде VI для всех сортов была значительно выше, чем на средах I и II (табл. 2, рис. 2). Наиболее высокая частота адвентивной регенерации отмечена у изученных сортов вишни на среде VI для сортов Алмаз, Владимирская, Память Учителя, Еникеевка (13,8; 7,5; 16,0; 32,1% соответственно), при использовании в опыте целых листовых эксплантов (табл. 3). Низкий процент адвентивной регенерации (0,5–5,4%) отмечен для трёх сортов: Владимирская, Память Учителя, Алмаз на среде V, при использовании в опыте сегментов листьев. Исключение составил сорт Еникеевка, который имел одинаково высокую регенерацию на обеих средах: V и VI, когда в эксперименте были использованы целые листовые экспланты (табл. 3, рис. 1,б) и низкую регенерацию в случае культивирования сегментов листьев на тех же средах. На среде I адвентивная регенерация отмечена только у сорта Еникеевка (2,7% при использовании в качестве эксплантов целых листьев и 1,5% — при использовании в качестве эксплантов сегментов листьев) (табл. 3).

Таблица 2

Оценка влияния среды на эффективность адвентивной регенерации сортов вишни по результатам однофакторного дисперсионного анализа

Вариант среды	Процент регенерации $\bar{x} \pm m_x$	95% доверительный интервал, процент регенерации		Число измерений
		от	до	
I (МС+БАП)	0,57 ± 1,44	-2,303	3,449	22
II (МС+ТДЗ)	0,09 ± 1,69	-3,278	3,466	16
V (WPM+БАП)	4,84 ± 1,95	0,947	8,736	12
VI (WPM+ТДЗ)	11,44 ± 1,80*	7,830	15,041	14

Примечание. * — существенные различия (уровень значимости $p \leq 0,05$).

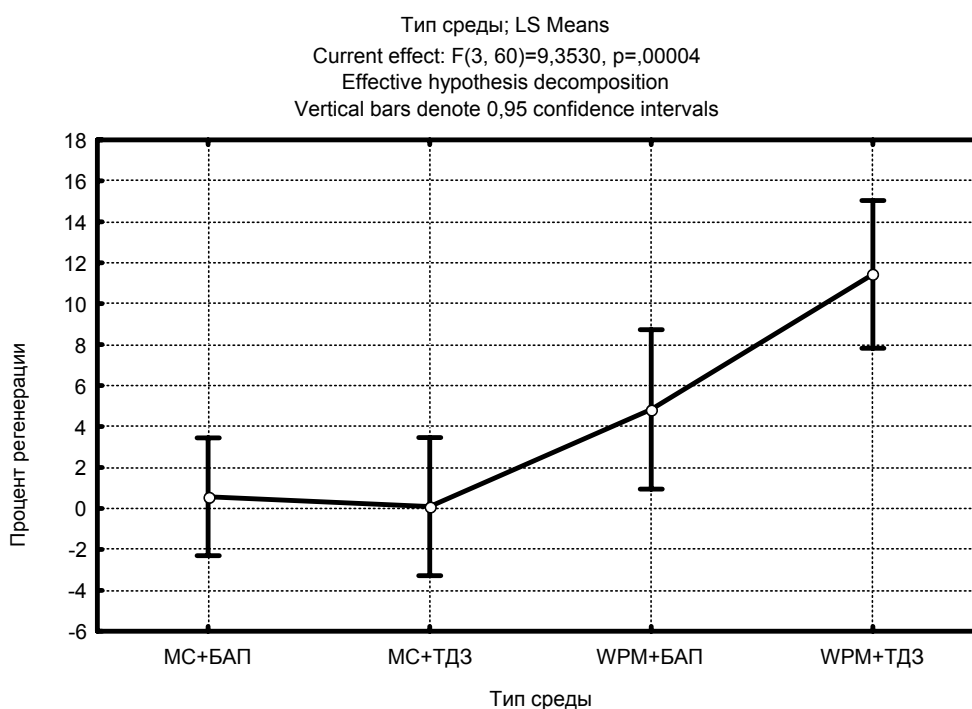


Рис. 2. Оценка влияния среды на эффективность адвентивной регенерации сортов вишни по результатам однофакторного дисперсионного анализа

Существенное влияние на адвентивную регенерацию вишни оказывал тип экспланта. При использовании целых листовых эксплантов и сегментов листьев адвентивная регенерация побегов отмечена у всех изученных сортов. Низкий (0–0,9%) уровень адвентивной регенерации отмечен при использовании в качестве эксплантов сегментов корней на средах II, VI. При использовании черешков листьев регенерации не получено ни для одного сорта. Во второй повторности опыта на среде V у трех сортов — Алмаз, Владимирская, Еникеевка — было отмечено образование адвентивных корней при использовании листовых эксплантов. Наиболее высокая частота регенерации была получена для всех сортов при использовании в качестве эксплантов целых листьев, культивируемых адаксиальной поверхностью к среде, по сравнению с другими типами эксплантов (табл. 4, рис. 3).

Таблица 3

Оценка эффективности адвентивной регенерации у сортов вишни на средах I, II, V, VI (средние значения)

Сорт	Процент регенерации (доверительный интервал)											
	Среда I (БАП + ИМК)			Среда II (TDZ)			Среда V (БАП + НУК)			Среда VI (TDZ + НУК)		
	листья (адакс.)	сегменты листьев (адакс.)	сегменты корней	листья (адакс.)	сегменты листьев (адакс.)	сегменты корней	листья (адакс.)	сегменты листьев (абакс.)	сегменты корней	листья (адакс.)	сегменты листьев (абакс.)	сегменты корней
Владимирская	0	0	0	0	0	0	0	0,5 (0–2)	0	7,5 (3–13)	1,9 (0–7)	0
Еникевка	2,7 (0,4–6)	1,5 (0,2–3)	0	0	0	0	33,3 (19–49)	3,5 (0,9–7)	0	32,1 (23–41)	4 (0,7–9)	0,9 (0–3)
Память Учителя	0	0	0	0	0	0,8 (0–3)	0	0,7 (0–3)	0	16 (9–25)	0	0
Алмаз	–	–	–	–	–	–	4,8 (0,4–13)	5,4 (2–10)	0	13,8 (8–21)	13,9 (7–23)	0

Примечания. Способ культивирования листовых эксплантов: (адакс.) — адаксиальной поверхностью на среду, (абакс.) — абаксиальной поверхностью на среду. (–) — данные отсутствуют.

Таблица 4

Оценка влияния типа экспланта на адвентивную регенерацию вишни по результатам однофакторного дисперсионного анализа

Тип экспланта	Процент регенерации $\bar{x} \pm m_x$	95% доверительный интервал, процент регенерации		Число измерений
		от	до	
Лист адакс.	6,85 ± 1,06*	4,743	8,953	27
Лист абакс.	0,00 ± 3,19	–6,314	6,314	3
Сегменты адакс.	0,29 ± 1,43	–2,530	3,117	15
Сегменты абакс.	2,65 ± 1,43	–0,170	5,477	15
Сегменты корня	0,11 ± 1,03	–1,920	2,141	29
Черешки	0,00 ± 0,99	–1,964	1,964	31

Примечание. * — существенные различия (уровень значимости $p \leq 0,05$).

Укоренение и акклиматизация адвентивных растений-регенерантов вишни. В результате проведённых экспериментов было получено 87 регенерантов четырёх сортов вишни, из них 46% микропобегов были способны к укоренению (рис. 1,2). Наиболее высокий процент укоренения побегов-регенерантов вишни отмечен для сорта Алмаз (61%).

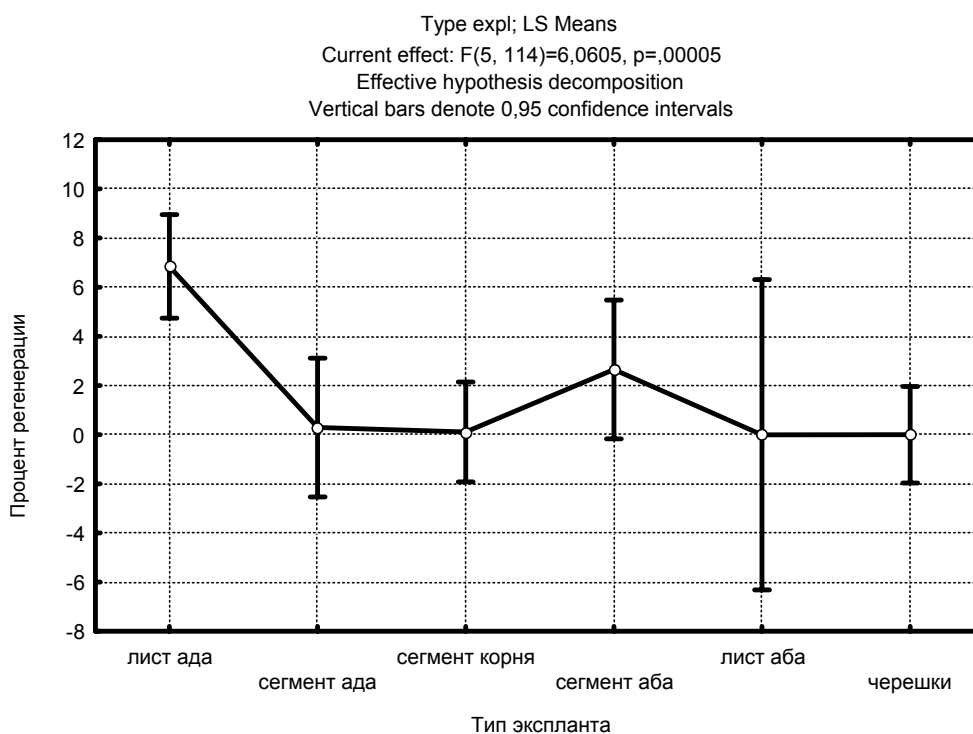


Рис. 3. Оценка влияния типа экспланта на адвентивную регенерацию вишни по результатам однофакторного дисперсионного анализа

В настоящее время осуществляется перенос адвентивных растений-регенерантов из стерильных условий в тепличные (рис. 1, д). Адвентивные растения-регенеранты, прошедшие период адаптации к нестерильным условиям, будут перенесены в теплицу для дальнейшего сравнительного изучения регенерантов и контрольных растений, полученных методом микроразмножения пазушными почками. В результате данной работы была изучена способность к адвентивной регенерации сортов вишни различного происхождения в зависимости от состава сред, типа эксплантов, способа и условий культивирования. Сравнительное изучение будет проведено с использованием комплекса методов: анализа морфологических признаков; цитологического анализа числа хромосом и использование молекулярно-генетических методов (RAPD анализ). Такой комплексный подход позволит в дальнейшем оценить генетическую стабильность адвентивных регенерантов вишни.

* * *

По результатам проведённых исследований можно сделать следующие выводы:

- Эффективность адвентивной регенерации вишни как способа микрোকлонального размножения растений зависит от состава питательных сред, сортовых особенностей, т. е. генотипа растений и типа экспланта.
- Наиболее высокая частота адвентивной регенерации у изученных сортов вишни отмечена на среде VI (WPM + 1 мг/л ТДЗ + 0,05 мг/л НУК), при исполь-

зовании целых листовых эксплантов, помещенных адаксиальной поверхностью на среду.

- Использование в качестве эксплантов черешков листьев и сегментов корней не является результативным для адвентивной регенерации вишни; в этих экспериментах частота регенерации не превышает 1%.

- Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать сорт Еникеевка, имеющий относительно высокую частоту адвентивной регенерации (33%), для использования в опытах по генетической трансформации вишни.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ССЫЛКИ

1. Сорокина И. К., Старичкова Н. И., Решетникова Т. Б., Гринь Н. А. Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей: Учебное пособие. 2002. С. 45.
2. Батыгина Т. Б., Васильева В. Е. Размножение растений: Учебник. СПб., 2002. С. 232.
3. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений: Учебник. СПб., 2003. С. 227.
4. De Klerk G.-J. Arnholdt-Schmitt B., Lieberei R. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects // *Biologia Plantarum*. Vol. 39. № 1. 1997. P. 53–66.
5. Долгов С. В., Фирсов А. П., Бурьянов Л. И. Разработка методов регенерации и генетической трансформации вишни *Cerasus vulgaris* // Новые методы биотехнологии растений. Пушино, 1993. С. 18.
6. Индукция морфогенеза и тканевая селекция плодовых и ягодных культур / Под ред. В. Е. Перфильева: Методические рекомендации / ВНИИ генетики и селекции плодовых растений им. И. В. Мичурина, 1996. С. 73.
7. Tang H., Ren Z., Reustle G., Krzczal G. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars // *Scientia Horticulturae*. 2002. Vol. 93. P. 235–244.
8. Bhagwat B., David Lane W. In vitro shoot regeneration from leaves of sweet cherry (*Prunus avium*) «Lapins» and «Sweetheart» // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Netherlands. 2004. Vol. 78. P. 173–181.
9. Gentile A., Monticelli S., Damiano C. Adventitious shoot regeneration in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] // *Plant Cell Reports*. 2002. Vol. 20. P. 1011–1016.
10. Takashina T., Nakano H., Kato R. Efficient plant regeneration culture from leaf explants of in vitro-grown sweet cherry // *Acta Horticulturae: XXVI International Horticultural Congress: Genetics and Breeding of Tree Fruits and Nuts*. P. 622.
11. Burgos L., Albuquerque N. Ethylene inhibitors and low kanamycin concentrations improve adventitious regeneration from apricot leaves // *Plant Cell Reports*. 2003. Vol. 21. P. 1167–1174.
12. Hammatt N., Grant N. J. Shoot regeneration from leaves of *Prunus serotina* Ehrh. (black cherry) and *P. avium* L. (wild cherry) // *Plant Cell Reports*. 1998. Vol. 17. P. 526–530.
13. Grant Neil J., Hammatt Neil. Adventitious shoot development from wild cherry (*Prunus avium* L.) leaves // *New Forests*. Netherlands. 2000. Vol. 20. P. 287–295.
14. James D. E., Possey A. J., Malhotro S. B. Organogenesis in callus derived from stem and leaf tissues of apple and cherry rootstocks // *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 1984. Vol. 3. № 4.
15. Jones O. P., Jacqueline A. Gayner and Watkins R. Plant regeneration from callus tissue cultures of the cherry rootstock Colt (*Prunus avium* × *P. pseudocerasus*) and the apple rootstock M. 25 (*Malus pumila*) // *The Journal of Horticultural Science*. England, 1984. Vol. 59. № 4. P. 463–467.
16. Graham J., Lasi L., Millam S. Genotype-specific regeneration from a number of *Rubus* cultivars // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 1997. Vol. 48. P. 167–173.
17. Сковородников Д. Н. Особенности клонального микроразмножения *in vitro* и ускорение селекции новых ремонтантных форм малины. // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Брянск, 2004. С. 20.

ЕСТЕСТВОЗНАНИЕ

18. *Passey A. J., Barrett K. J., James D. J.* Adventitious shoot regeneration from seven commercial strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa Duch.*) using a range of explant types // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Netherlands. 2003. Vol. 21. P. 397–401.

V. Rogovaia, L. Novikova, T. Gavrilenko

***IN VITRO* ADVENTITIOUS REGENERATION OF SOUR CHERRY**

The ability of sour cherry micro-plants towards adventitious regeneration has been studied depending on the genotype, explant type and culturing conditions. The efficient method for adventitious shoot regeneration of sour cherry has been developed.