

УДК 581.1

## ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ АДВЕНТИВНОГО ОРГАНОГЕНЕЗА У РАЗЛИЧНЫХ СОРТОВ ГРУШИ

В. А. ЛЕБЕДЕВ, В. Н. ДЕМЕНКО, С. В. ДОЛГОВ

(Кафедра плодводства)

**Проводили исследования индукции соматического эмбриогенеза груши. Опыты показали, что индукция соматического эмбриогенеза зависит от сорта, состава питательной среды, типа экспланта. Большая регенерационная способность отмечена у сорта Бураковка, Память Яковлева, подвоя ГП № 217. Чаще регенерация отмечалась на среде NN с тизуроном.**

Решение многих вопросов традиционной селекции, технологий возделывания сельскохозяйственных растений в настоящее время становится возможным, применяя методы биотехнологии, в частности, генной инженерии. Непременным условием получения трансгенных растений является адвентивный органогенез из соматических тканей. Индукция соматического эмбриогенеза является ключевым шагом в применении техники генной инженерии, а также начальным и очень важным этапом в получении «искусственных семян». Последнее может принципиально изменить понятие питомник.

Индукция соматического эмбриогенеза — явление многоплановое и зависит от способности специализированных соматических клеток превратиться в биполярную структуру.

Для различных типов плодовых растений показано значительное влияние генотипа, состава питательной среды, типа эксплантов и его происхождения, условий культивирования на данный процесс. Работы по регенерации груши проводились на ограниченном числе зарубежных сортов европейской селекции. Современный сортимент груши центральной

зоны России представлен сортами, в создании которых участвовала груша уссурийская. Многие зарубежные исследователи в качестве эксплантов использовали генеративные ткани, что недопустимо при целенаправленной селекции и дальнейшем вегетативном размножении. Анализируя существующую литературу по данному вопросу можно сделать следующий вывод: несмотря на возможность использовать в практической работе данные существующих авторов, в работе с такими трудными гетерозиготными плодовыми культурами необходимо проводить полномасштабные исследования для каждого конкретного случая. Наши исследования показали, что на процесс соматического эмбриогенеза влияют следующие факторы: генотип, химический состав питательной среды, тип экспланта.

Цель данной работы — поиск условий регенерации адвентивных побегов ряда сортов и подвоев груши российской селекции.

### Материал и методика

В качестве объекта исследований были использованы сорта и подвоя груши (*Pyrus communis* L.), культиви-

вируемые *in vitro*. Культуру груши поддерживали на питательной среде 1-2 мг/л БАП, 0,2 мг/л ИМК, 0,3 мг/л ГК, 20 г/л сахарозы и 7 г/л агара (в зависимости от сорта) [1]. Укоренение побегов груши проводили на аналогичной среде с уменьшенным вдвое содержанием  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , содержащей 0,5 мг/л ИМК, 10 г/л сахарозы и 7 г/л агара.

Для экспериментов по регенерации были использованы листья с укорененных растений, на которые наносили несколько надрезов и помещали адаксиальной стороной на поверхность питательной среды для регенерации в чашке Петри (по 8-15 в каждую).

Регенерацию проводили на питательной среде МС [2], NN [3], N6 [4] с добавлением ТДЗ, БАП, НУК, ГК, 100 мг/л мезоинозита, 100 мг/л гидролизата казеина и 7 г/л агара. рН среды до автоклавирования и добавления агара доводили до 5,6-5,8. Регуляторы роста растений и гидролизат казеина стерилизовали фильтрованием и добавляли в среду после автоклавирования.

Растения выращивали при следующих условиях: фотопериод — 16/8 ч, температура — 23~25°C, освещенность 3000-3500 лк и пересаживали каждые 6 недель. В экспериментах по регенерации экспланты культивировали в полной темноте при 23°C в течение 9 недель.

### Результаты и обсуждение

Генотип — один из наиболее важных факторов, влияющих на органогенез. Поэтому свои исследования по регенерации адвентивных побегов груши из соматических тканей мы начали с оценки морфологического потенциала сортов груши различного генетического происхождения, которые возделываются в средней полосе европейской части России.

В этом эксперименте мы использовали стандартную питательную среду, применяющуюся в других исследованиях по регенерации груши, а именно: минеральные соли по МС, 20 г/л сахарозы, 5 мг/л ТДЗ, 0,5 мг/л НУК, 0,1 мг/л ГК. Всего протестировали 9 сортов и 2 подвоя. Результаты представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1

**Влияние генотипа на регенерацию адвентивных побегов груши из листовых эксплантов**

Сорт	Регенерация, %	Поб./эксп.
Надежда	6,7±3,3	1,0±0,0
Чижовская	0	—
Москвичка	0	—
Лада	0	—
Академическая	7,1±3,8	1,0±0,0
Бураковка	28,6±7,8	1,4±0,2
Память Яковлева	23,3±6,7	1,0±0,0
Осенняя Яковлева	0	—
Космическая	3,7±3,7	1,0±0,0
ГП № 217	15,6±3,4	1,2±0,2
ГП № 218	9,1±5,2	1,0±0,0

В целом, при данных условиях эксперимента, сорта груши обладали довольно низкой частотой регенерации, а некоторые не регенерировали побеги вообще. Первые проростки в эксплантах появились после 30 дней культивирования. Такая частота регенерации является явно недостаточной для проведения генетической трансформации и получения трансгенных растений груши. Поэтому с целью повышения частоты образования побегов провели ряд экспериментов по определению оптимальных условий их регенерации, для чего отобрали сорта с наибольшим регенерационным потенциалом — Бураковку, Память Яковлева и подвой ГП № 217 и сорт Москвичка, не давший побегов в предварительных экспериментах. Изучали влияние минеральных солей, кон-

центрации сахарозы и регуляторов роста.

Для исследования влияния минерального состава среды на регенерацию мы использовали среды с полным или половинным содержанием макросолей по МС, среду NN и сре-

ду №6. Эти питательные среды широко используются в экспериментах по регенерации груши и яблони. В качестве эксплантов использовали листья (Л) и черешки (Ч). Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

**Влияние минерального состава среды на регенерацию адвентивных побегов груши**

Вариант		Сорт					
среда	тип экспланта	Бураковка		Память Яковлева		ГП № 217	
		% регенерации	поб./экспл.	% регенерации	поб./экспл.	% регенерации	поб./экспл.
М6	Л	7,4±3,7	1,0±0,0	6,7±6,7	1,0±0,0	3,8±1,9	1,0±0,0
	Ч	19,0±0,9	1,0±0,0	15,0±5,0	1,0±0,0	—	—
NN	Л	71,4±7,8	2,0±0,2	13,3±0,0	1,0±0,0	13,0±3,2	1,0±0,0
	Ч	57,1±6,8	2,0±0,3	0	—	0	—

П р и м е ч а н и е. Среда содержала 20 г/л сахарозы, 5 мг/л ТДЗ, 0,5 мг/л НУК, 0,1 мг/л ГК.

В эксперименте использовались также варианты с сортом Москвичка, но ни в одном варианте регенерации не наблюдалось.

Табл. 2 позволяет сделать вывод о несомненном преимуществе среды NN в частоте регенерации побегов над всеми остальными вариантами (ни на среде V<sub>2</sub> макро МС, ни на №6 регенерации не наблюдалось вообще). Самое обильное образование каллуса также наблюдалось на среде NN, в меньшей степени — на среде с половинным содержанием макросолей МС, еще в меньшей — на среде МС и на среде №6 каллус практически не регенерировал. Среда NN также оказалась лучше и по числу побегов для Бураковки.

Причина этого может заключаться в значительно более низком содержании минеральных солей в среде NN по сравнению с МС (2,2 и 4,5 г/л соответственно). Улучшение регенерации при снижении концентрации минеральных солей в среде также наблюдалось у черемухи [5] и у сои [6]. Это можно объяснить раз-

личным осмотическим давлением, которое влияет на доступность минеральных элементов питания, регуляторов роста, их метаболизм и активность при различных рН.

Важную роль при регенерации может также иметь соотношение аммонийного и нитратного азота, неодинаковое для различных генотипов [7]. Возможно, этим можно объяснить отсутствие регенерации как побегов, так и каллуса на среде №6, которая отличается по этому показателю от среды NN (1:4 и 1:2 соответственно).

Углеводы в питательной среде выполняют две функции — они являются источником углерода, а также осморегуляторами. Показано, что наиболее эффективным углеводом для регенерации является сахароза [8, 9] Мы использовали пять различных концентраций сахарозы — 10, 20, 30, 40 и 50 г/л. Результаты эксперимента представлены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что регенерация на 10 г/л не происходило совер-

## Влияние концентрации сахарозы на регенерацию адвентивных побегов груши

Вариант		Сорт			
среда	тип экспланта	Бураковка		ГП № 217	
		% регенерации	поб./экспл.	% регенерации	поб./экспл.
10 г/л	Л	0	—	0	—
	Ч	0	—	0	—
20 г/л	Л	16,7±4,2	1,0±0,0	6,0±3,4	1,0±0,0
	Ч	50,0±21,7	1,1±0,1	0	—
30 г/л	Л	37,5±0,0	1,3±0,2	24,0±3,9	1,2±0,1
	Ч	45,8±15,0	1,0±0,0	0	—
40 г/л	Л	12,5±7,2	1,0±0,0	12,0±3,4	1,0±0,0
	Ч	25,0±7,2	1,2±0,2	5,0±2,5	1,0±0,0
50 г/л	Л	16,7±8,3	1,0±0,0	8,0±1,9	1,2±0,2
	Ч	12,5±7,2	1,0±0,0	2,5±2,5	1,0±0,0

П р и м е ч а н и е. Использована среда NN, содержащая 5 мг/л ТДЗ, 0,5 мг/л НУК, 0,1 мг/л ГК.

шенно, незначительная наблюдалась на 20 г/л, а максимум регенерации — при концентрации 30 г/л, затем регенерация снижалась с увеличением концентрации. Влияние сахарозы также сказывалось на количестве и характеристиках каллуса. Максимум образования каллуса наблюдался при 20-40 г/л, при 10 и 50 г/л количество каллуса снижалось, причем при 10 и 20 г/л каллус имел рыхлую структуру и кремовую окраску, в то время как при 30-50 г/л каллус имел белую окраску и плотную структуру. В ряде работ с грушей было показано, что влияние концентрации сахарозы сильно зависит от генотипа [10]. В наших экспериментах ни в одном варианте не наблюдалось регенерации сорта Москвичка.

Регуляторы роста растений играют одну из ключевых ролей в регенерации. Для большинства видов плодовых деревьев инициация каллуса и индукция побегов происходит на одной и той же среде, которая содержит ауксины и цитокинины. В эксперименте мы сравнивали два наиболее широко используемых для

регенерации побегов из соматических тканей древесных культур цитокинина — БАП и ТДЗ, производное фенилмочевины. Результаты представлены в табл. 4.

Тип цитокинина оказал существенное влияние на регенерацию: в вариантах с БАП регенерации побегов не происходило, а с ТДЗ оптимальным оказался вариант с 3 мг/л ТДЗ и 0,5 мг/л НУК. Кроме того, на средах с содержанием БАП не происходило образование каллуса — незначительное количество каллуса наблюдалось только в варианте 5 мг/л БАП с 1 мг/л НУК.

Преимущество производных фенилмочевины над БАП по цитокининовой активности показано на целом ряде древесных культур — яблоне [11], груше [10, 12], черешне и черемухе [5]. Вместе с тем применение ТДЗ может вызывать и ряд негативных побочных эффектов, например, витрификацию [13]. В наших экспериментах иногда появлялись витрифицированные побеги, но неизвестно, связано ли это с ТДЗ или с другими причинами. После пере-

**Влияние различных цитокининов (ТДЗ и БАП)  
на регенерацию адвентивных побегов груши**

Среда	Сорт					
	Бураковка		Память Яковлева		ГП № 217	
	% регене- рации	поб./экспл.	% регене- рации	поб./экспл.	% регене- рации	поб./экспл.
3 ТДЗ, 0,5 НУК	13,3±3,3	1,0±0,0	16,7±3,3	1,0±0,0	17,8±4,4	1,4±0,2
1 ТДЗ, 0,5 НУК	10,0±5,8	1,0±0,0	0	—	4,2±2,2	1,0±0,0
0,5 ТДЗ, 1 НУК	6,7±3,3	1,0±0,0	0	—	2,2±2,2	1,0±0,0
5 БАП, 1 НУК	0	—	0	—	0	—
5 ТДЗ, 0,25 НУК	0	—	0	—	0	—

П р и м е ч а н и е. Использована среда NN, содержащая 30 г/л сахарозы и 0,1 ГК.

носа таких проростков на среду для размножения через 2~3 субкультурирования витрификация исчезала, а укоренение таких побегов требовало больше времени, чем обычно, что также отмечалось для клена [14].

В качестве ауксина мы использовали НУК, которая более стабильна в культуре ткани. НУК является наиболее предпочтительным ауксином из-за ее синергетического эффекта с цитокининами на индукцию побегов [15].

Влияние ориентации эксплантов изучали в вариантах с их размещением адаксиальной (верхней) и абаксиальной (нижней) поверхностью листа на питательную среду. Результаты эксперимента представлены в табл. 5.

Ориентация оказала существенное влияние только на сорт Бураковки — регенерация заметно снизилась, когда со средой контактировала нижняя сторона листа.

Литературные данные, касающиеся вопроса влияния ориентации на

Т а б л и ц а 5

**Влияние ориентации листовых эксплантов  
на регенерацию адвентивных побегов груши**

Вариант		Сорт					
ориен- тация	тип экс- планта	Бураковка		Память Яковлева		ГП № 217	
		% регене- рации	поб./экспл.	% регене- рации	поб./экспл.	% регене- рации	поб./экспл.
Адакс. стор. на питат. среду	Л	33,3±3,0	1,7±0,5	16,7±3,3	1,0±0,0	17,8±4,4	1,2±0,2
	Ч	0	0	13,3±6,7	1,0±0,0	20,0±5,0	1,1±0,1
Абакс. стор. на питат. среду	Л	9,1±9,1	1,7±0,7	23,3±3,3	1,0±0,0	20,0±7,7	1,2±0,1
	Ч	0	—	13,3±3,3	1,0±0,0	25,0±5,0	1,0±0,0

П р и м е ч а н и е. Использована среда NN, содержащая 30 г/л сахарозы, 3 мл/л ТДЗ, 0,5 мг/л НУК, 0,1 мг/л ГК.

**Влияние предварительной обработки эксплантов  
на регенерацию адвентивных побегов груши**

Вариант		Сорт			
обработка эксплантов	тип экс- планта	Бураковка		ГП № 217	
		% регенерации	поб./экспл	% регенерации	поб./экспл
Нахождение в воде	Л	15,6±2,2	1,0±0,0	24,4±5,9	1,2±0,1
	Ч	15,0±5,0	1,0±0,0	20,0±5,0	1,2±0,2
Нахождение в жид. NN	Л	24,4±8,0	1,1±0,1	40,0±11,5	1,1±0,1
	Ч	45,0±5,0	1,3±0,1	20,0±0,0	1,1±0,1

П р и м е ч а н и е. Использована среда NN, содержащая 30 г/л сахарозы, 3 мг/л ТДЗ, 0,5 мг/л НУК, 0,1 мг/л ГК.

регенерацию, противоречивы — для различных древесных культур оптимальной была ориентация различными сторонами экспланта [16, 17]. Как предполагают, увеличение частоты регенерации при помещении листьев на среду адаксиальной стороной может быть связано с увеличением кислородного обмена, так как устьица расположены абаксиально. Другой причиной может являться то, что столбчатая паренхима на верхней стороне листа более эффективно транспортирует питательные вещества и регуляторы роста в эксплант [17].

Также оценивали влияние на регенерацию предобработки эксплантов. До помещения на среду экспланты находились в воде или жидкой среде NN без регуляторов роста 50-60 мин. Результаты эксперимента представлены в табл. 6.

Нахождение в жидкой среде для регенерации оказало существенное влияние и на частоту регенерации, и на количество побегов на эксплант сорта Бураковка. Данные наших экспериментов по груше отличаются от результатов, полученных на яблоне, где различий между подобными предобработками не наблюдалось.

После оптимизации ряда факторов, имеющих важное влияние на

регенерацию — минерального состава среды, концентрации сахарозы, регуляторов роста растений и предварительной обработки эксплантов, мы вновь провели оценку морфогенетического потенциала всех сортов и подвоев, но уже по новой методике регенерации. Результаты эксперимента представлены в табл. 7.

Т а б л и ц а 7

**Влияние оптимизации условий регенерации на способность продуцировать адвентивные побеги у различных генотипов груши**

Сорт	Регенера- ция, %	Поб./эксп.
Надежда	96,7±3,3	3,3±0,3
Чижовская	93,3±6,7	1,9±0,2
Москвичка	80,0±5,8	1,8±0,2
Лада	31,1±4,4	1,1±0,1
Академическая	4,4±4,4	1,0±0,0
Бураковка	100,0±0,0	5,4±0,5
Память Яковлева	75,0±7,2	1,4±0,1
Осенняя Яковлева	93,3±3,8	1,9±0,1
Космическая	73,3±6,7	2,7±0,3
ГП № 217	47,5±5,4	1,2±0,1
ГП № 218	53,3±7,7	1,4±0,1

П р и м е ч а н и е. Использована среда NN, 30 г/л сахарозы, 3 мг/л ТДЗ, 0,5 мг/л НУК, 0,1 мг/л ГК. До помещения на среду экспланты находились в жидкой среде NN.

## Заключение

Сравнение данных табл. 7 с результатами, полученными при первоначальных условиях регенерации, показывает, что для большинства сортов регенерация резко выросла. Исключением является сорт Академическая, который практически не изменил частоты регенерации. Это может говорить о том, что данные условия культивирования эксплантов не оптимальны для этого сорта. Увеличение частоты регенерации у большинства сортов свидетельствует о том, что разработанная нами методика регенерации в целом подходит для сортов груши различного генетического происхождения.

Помимо увеличения частоты регенерации и числа побегов на эксплант, оптимизация условий привела также к более раннему появлению побегов на регенерирующих эксплантах. Если при первоначальных условиях первые побеги появлялись после 30 дней культивирования, то при оптимизированных условиях — на 15-20-й день.

Нами отмечено, что весь морфогенный потенциал эксплантов груши реализуется в основном в первые шесть недель культивирования, а затем возрастает только число побегов на регенерирующем экспланте. Аналогичные результаты получены и на яблоне — частота регенерации почти не возросла после 35 дней культивирования и совсем не возросла через 45 дней.

На протяжении всех экспериментов побеги в основном регенерировали из каллуса. Регенерация непосредственно из листовой ткани наблюдалась очень редко (единичные случаи). Количество образующегося каллуса уменьшалось в направлении от проксимального к дистальному концу.

В целом же, суммируя полученные результаты, можно сказать, что реге-

нерация исследованных сортов груши значительно отличается не только от западноевропейских, но и от яблони — ее ближайшего родственника. Возможная причина этого в том, что селекция российских сортов груши, которые являются сложными гибридами с участием уссурийской, в основном шла на признаки, отличные от западноевропейских (например, морозостойкость). Это могло привести к формированию генома, значительно отличающегося от европейских сортов и с иными требованиями тканей.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Меркулов С. М., Бартузи И. В., Глеба Ю. Ю. Физиология и биохимия культурных растений, 1993, т. 25, с. 375-379. — 2. Abu-Quaoud H., Skirvin R. M., Belov F. E. — Plant Cell Tiss. Org. Cult, 1991, vol. 27, pp. 315-319. — 3. Baker B. C., Bhatia S. K. — Plant Cell Tiss. Org. Cult, 1993, vol. 35, pp. 273-277. — 4. Chevreau E., Skirvin R. M., Abu-Quaoud H. — Plant Cell Rep, 1989, vol. 7, pp. 688-691. — 5. Chu C. C. C., Wang C. C., Sun C. S. — Sci. Sinica, 1975, vol. 18, pp. 659-668. — 6. Cousineau J. C., Donnelly D. J. — Plant Cell Tiss. Org. Cult, 1991, vol. 27, pp. 249-255. — 7. Eapen S., George L. — Plant Cell Tiss. Org. Cult, 1990, vol. 22, pp. 87-93. — 8. Fasolo F., Zimmerman R., Fordham I. — Plant Cell Tiss. Org. Cult, 1989, vol. 16, pp. 75-87. — 9. Hammatt N., Grant N. J. — Plant Cell Rep, 1998, vol. 17, pp. 526-530. — 10. Huettemann C. A., Preeee J. E. — Plant Cell Tiss. Org. Cult, 1993, vol. 33, pp. 105-119. — 11. Kaneda Y., Tabei Y., Nishimura S. — Plant Cell Rep, 1997, vol. 17, pp. 8-12. — 12. Leblay C., Chevreau E., Raboin L. M. — Plant Cell Tiss. Org. Cult, 1991, vol. 25, pp. 99-105. — 13. Litz R. E., Cray D. J. Biotechnology of Perennial Crops. Biotechnology in Agricultural series, № 8. Hammerschlag, Litz (Eds.). — CAB International, 1992, pp. 3-34. — 14. Murashige T., Skoog F. — Physiol. Plantarum, 1962, vol. 15, pp. 473-497. — 15. Nitsch J. P., Nitsch C. — Science, 1969, vol. 163, pp. 85-87. — 16. Quoirin M., Lepoivre P. — Acta Hort, 1977, vol. 78, pp. 437-442.

Статья поступила  
13 февраля 2004 г.

## SUMMARY

Induction of somatic embryogenesis in pear was investigated. Experiments have shown, that induction of somatic embryogenesis depends on variety, composition of nutrient medium, type of explant. High regenerative ability was found in varieties Burakovka, Memory Yakovlev, seedling GP № 217. More often regeneration was found on medium NN with tizuron.