

УДК 634:581.143.6

## ПОЛУЧЕНИЕ РАСТЕНИЙ-РЕГЕНЕРАНТОВ ИЗ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ

РЕГУНАТАН ПИЛЛАЙ, ЛЕТИ ДЖОС, Е. А. КАЛАШНИКОВА

(Кафедра с.-х. биотехнологии)

**В работе рассматриваются вопросы, касающиеся культивирования изолированных листовых эксплантов пшеницы *in vitro* и получения из них растений-регенерантов. Установлено, что листовые сегменты размером 3—5 мм, изолированные с 7-дневных проростков, способны в 100% случаев формировать каллусную ткань. Культивирование каллусной ткани на среде, содержащей 2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л зеатина, приводит к формированию растений-регенерантов.**

Проблема сохранения морфогенетического потенциала культивируемыми клетками растений семейства Злаковых остается все еще нерешенной. Во многом это объясняется тем, что пристальное внимание исследователей эта проблема привлекла сравнительно недавно. Первое сообщение о получении каллусной культуры пшеницы появилось в 1968 г. [6]. С тех пор опубликован ряд работ, в которых сообщается об успешном культивировании изолированных тканей и клеток злаковых, и в частности пшеницы [3, 4, 6]. Однако до сих пор не совсем ясно, чем определяется возможность получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани пшеницы, сохраняющей морфогенетический потенциал: генетическими особен-

ностями исходного сорта, характером дифференцировки клеток эксплантов или условиями выращивания каллусной ткани [1, 2]. Возможно, что существуют оптимальные сочетания всех трех факторов.

Как правило, при работе с пшеницей в условиях *in vitro* в качестве первичного экспланта используют изолированные зрелые или незрелые зародыши, из которых легко получают каллусную ткань для последующей регенерации растений. Что же касается листовых сегментов, то эти экспланты являются редким объектом исследований, а работы в этом направлении носят пока поисковый характер.

Целью наших исследований было изучение возможности

получения растений-регенерантов из изолированных листовых эксплантов различных генотипов пшеницы, а также выявление зависимости этого процесса от условий культивирования первичного экспланта.

### Методика

Объектом исследования служили 5 генотипов яровой пшеницы: Московская 35, Энита, WW-15370, Gaterin temps и Фортуна. Семена стерилизовали в ртутьсодержащем растворе (сулеме) 0,1% концентрации в течение 45 мин, затем 3-кратно промывали стерильной дистиллированной водой, после чего их помещали на модифицированную безгормональную питательную среду Мурасига и Скуга с целью получения стерильных проростков.

В качестве первичного экспланта для индукции каллуса использовали базальную часть флагового листа проростков. Изучали зависимость этого процесса от времени выращивания проростков (от 3 до 14 дней). Изолированные листовые сегменты размером 3—5 мм высаживали в чашки Петри по 15 шт. в каждую. Культивацию проводили в климатической камере при температуре 25°С, 16-часовом фотопериоде и 70% относительной влажности воздуха.

Для получения первичной и пересадочной каллусной ткани из листовых сегментов пшеницы использовали модифицированную питательную среду Мурасига и Скуга (МС), содержащую допол-

нительно аспарагин (120 мг/л), нитрат серебра (10 мг/л), а также гормоны ауксинового действия. Изучали влияние на процесс каллусогенеза и морфогенеза 2,4-дихлорфеноксисульфоновой кислоты (2,4-Д) в концентрации 2 и 3 мг/л, а также 2,4-Д в сочетании с зеатином 0,5 мг/л.

Пересадку пролиферирующего каллуса на свежую питательную среду осуществляли один раз в 4 недели. При этом учитывали число морфогенных и неморфогенных каллусов (в % к общему числу сформировавшихся каллусов), а также интенсивность каллусогенеза (визуально по 5-балльной шкале). Для изучения регенерационной способности каллусов были использованы среды, содержащие 2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л зеатина либо 0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП.

### Результаты

В первой серии экспериментов изучали влияние физиологического состояния листового экспланта на способность образовывать каллус. Для этого листовые сегменты размеров 4—7 мм изолировали с 3—14-дневных проростков и помещали на среду МС, содержащую 3 мг/л 2,4-Д. Визуальные наблюдения показали, что вначале листья увеличивались в длину, а затем в концах вытянутого листа образовывалась каллусная ткань. Причем, чем больше был первичный эксплант, тем меньшей способностью он обладал к каллусогенезу. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Зависимость каллусогенеза от возраста первичного экспланта  
у различных генотипов

Возраст проростков, дни	Московская 35	Фортуна	Энига	WW	Gaterin
	% эксплантов, образующих каллус				
3	33,3	26,6	33,3	86,6	40,0
4	33,3	26,6	26,6	93,3	40,0
5	33,3	26,6	26,6	93,3	46,6
6	33,3	33,3	33,3	86,6	53,3
7	40,0	33,3	33,3	100,0	60,0
8	33,3	26,6	26,6	93,3	53,3
9	26,6	20,0	20,0	80,0	46,6
10	20,0	13,3	13,3	66,6	33,3
11	13,3	6,7	6,7	53,3	26,6
12	0	0	0	33,3	20,0
13	0	0	0	20,0	13,3
14	0	0	0	13,3	0

Из табл. 1 видно, что листовые экспланты, изолированные с 3—9-дневных проростков, были способны формировать каллусную ткань. Начиная с 10-го дня эта способность резко снижалась и полностью утрачивалась на сегментах, изолированных с 14-дневных проростков. Однако способность листовых эксплантов формировать каллусную ткань зависела от генотипа первичного экспланта. Так, листовые сегменты сортов WW и Gaterin формировали каллус из 3—14-дневных проростков, в то время как сегменты листьев других исследуемых генотипов после 11-дневного проращивания зерновок не были способны пролиферировать каллусную ткань. Самый высокий показатель по каллусогенезу был отмечен у 7-дневного листового экспланта для всех изучаемых сортов. Поэтому в дальнейшей работе использовали 7-дневные проростки в качестве донора

для изолирования листового экспланта.

В следующей серии экспериментов изучали зависимость каллусогенеза от размера листового экспланта. Для этого изолировали листовую сегмент разного размера — от 3 до 10 мм. Наблюдения показали, что существует обратная зависимость между размером первичного экспланта и каллусогенезом. Так, с увеличением размера листового экспланта от 3 до 7 мм уменьшалась их способность формировать каллусную ткань. Причем при длине листового сегмента 6 мм этот показатель резко уменьшался. Как правило, каллус образовывался в базальной части изолированного участка листа и имел плотную консистенцию. При культивировании листовых сегментов размером 8—10 мм формирование каллуса не наблюдалось. Таким образом, было установлено, что листовая эксплант размером

3—5 мм является наиболее оптимальным для получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани.

После определения оптимального возраста первичного экспланта и его размера необходимо было подобрать концентрацию 2,4-Д для получения хорошо пролиферирующего каллуса. Для этого 7-дневный листовой сегмент размером 3—5 мм культивировали на среде, содержащей 2 и 3 мг/л 2,4-Д. Результаты приведены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2

Зависимость каллусогенеза из листовых эксплантов пшеницы от концентрации 2,4-Д в питательной среде (в числителе — 2 мг/л, в знаменателе — 3 мг/л)

Генотип	% эксплантов, образующих каллус
Московская 35	0
	30,5
Фортуна	0
	32,5
Энита	30
	30
WW-15370	100
	80
Gaterin	60
	42

Для сортов Московская 35 и Фортуна концентрация 2,4-Д 2 мг/л не была эффективной, поскольку на этой среде каллусная ткань не образовывалась, в то время как при концентрации 3 мг/л у этих сортов формировалась каллусная ткань. Однако каллус образовывался лишь на участке, где были сделаны срезы. Для сортов Энита, WW и Gaterin

концентрация 2 мг/л 2,4-Д была эффективной, о чем свидетельствует образование каллусов в пределах 30—100% эксплантов. У этих сортов каллусная ткань образовывалась по всей поверхности листового экспланга. Визуальные наблюдения показали, что для всех сортов было характерно формирование каллусной ткани более плотной консистенции, зеленого цвета на свету. Таким образом, по-видимому, для каллусогенеза из листовых эксплантов сортов Московская 35 и Фортуна целесообразно использовать 2,4-Д в концентрации 2 мг/л, а для сортов Энита, WW, Gaterin — 3 мг/л.

При дальнейшем культивировании цвет каллуса менялся от зеленого до беловато-желтого, но он оставался плотным с зелеными участками. После 4—5 пересадок 50% каллусов теряли морфогенетическую активность, они становились оводженными и в конце концов — неморфогенными (табл. 3).

Т а б л и ц а 3

Результаты наблюдений после 4 культивирований

Генотип	Концентрация 2,4-Д, мг/л	Каллусы, %	
		морфогенные	неморфогенные
Московская 35	3	42,5	57,5
Фортуна	3	45,5	54,5
Энита	2	48,7	51,3
WW-15370	2	50,2	49,8
Gaterin	2	49,8	50,2

Целью следующей серии экспериментов был подбор питательной среды для регенерации. Для этого использовали среды, содержащие 2,4-Д 2 мг/л + 0,5 мг/л зеатина и 0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л

БАП. Полученные результаты показали, что на среде с содержанием 0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП, наблюдался процесс ризогенеза, причем это явление было характерно для всех изучаемых сортов. Следует отметить среду, содержащую 2,4-Д 2 мг/л + зеатин 0,5 мг/л, на которой все сорта были способны формировать растения-регенеранты. Особо выделяется сорт *Gaterin temps*: образовывал регенеранты (5%) во всех вариантах исследуемых питательных сред (табл. 4). Исходя из этого мы пришли к выводу, что для получения регенерантов необходимо каллусы пересаживать на среду, содержащую 2 мг/л 2,4-Д и 0,5 мг/л зеатина.

Т а б л и ц а 4

Способность листовых эксплантов формировать растения-регенеранты (в числителе — среда 2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л зеатина, в знаменателе — 0,5 мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП)

Генотип	% регенерантов
Московская 35	$\frac{3}{0}$
Фортуна	$\frac{3,5}{0}$
Энита	$\frac{5,5}{0}$
WW-15370	$\frac{7,5}{0}$
<i>Gaterin temps</i>	$\frac{5}{5}$

#### Выводы

1. В качестве донора для изолирования листового эксплантата це-

лесообразно использовать 7-дневный проросток.

2. Листовой эксплант размером 3—5 мм является наиболее оптимальным для получения хорошо пролиферирующей каллусной ткани.

3. Для каллусогенеза из листовых эксплантов сортов *Московская* и *Фортуна* целесообразно использовать 2,4-Д в концентрации 2 мг/л, а для сортов *Энита*, *WW*, *Gaterin* — 3 мг/л.

4. Для получения регенерантов необходимо каллусы пересаживать на среду, содержащую 2 мг/л 2,4-Д + 0,5 мг/л зеатина.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Бутенко Р. Г.* В кн.: Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. М.: Наука, 1975 — 2. *Бутенко Р. Г., Джардемалиев Ж. К., Гаврилова Н. Ф.* Каллусообразующая способность эксплантов из разных органов различных сортов озимой пшеницы. — Физиология растений, 1986, т. 33, вып. 2, с. 350—355. — 3. *Прохоров М. Н., Чернова Л. К., Филли-Колдаков Б. В.* Выращивание ткани пшеницы на культуре и восстановление целого растения. — Докл. АН СССР, 1974, т. 214, № 1—3, с. 472. — 4. *Mc Hughen A.* Ann. Bot., 1983, vol. 51, N 6, p. 851. — 5. *Trione E. J., Jones L. E., Matzger R. J.* Amer. J. Bot., 1968, vol. 55, p. 529. — 6. *Zamora A. B., Scott K. J.* Plant Sci. Hett., 1983, vol. 29, N 2, 3, p. 183.

Статья поступила 12 января 1999 г.

#### SUMMARY

Studied the problems concerning the cultivation of isolated leaf explants of wheat in *In vitro* and the development of plant-regenerates from it. Established the fact that the leaf segments of 3—5 mm, isolated from the 7<sup>th</sup> day plantlets is 100% efficient to develop callus. Cultivation of callus in media, containing 2,4-D 2 mg/l and zeatin 0,5 mg/l is able to form plant-regenerates.