

УДК 635.9:582:669.26:631.535.7

РЕГЕНЕРАЦИЯ АДВЕНТИВНЫХ ПОБЕГОВ ИЗ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ ГВОЗДИКИ (*DIANTHUS CARYOPHYLLUS* L.) IN VITRO

Д.Н. МИРОШНИЧЕНКО, Е.В. МАМОНОВ, С.В. ДОЛГОВ

(Кафедра селекции и семеноводства плодовых и овощных культур)

Получена регенерация адвентивных побегов из листовых эксплантов растений *in vitro* 17 сортов гвоздики. Побеги формировались из базальной части листьев как путем регенерации, так и через стадию каллусообразования. Исследовано влияние цитокининов (6-БАП и ТДЗ) и ауксинов (НУК и ТИБК) на эффективность регенерации. Использование 6-БАП приводило к преждевременному старению эксплантов и увеличению количества побегов на эксплант, а ТДЗ — к более активному, чем в варианте с 6-БАП, морфогенезу у всех изучаемых сортов. Повышение концентрации ТДЗ от 0,5 до 2,0 мг/л увеличивало каллусообразование на срезе листа и витрификацию побегов. У 10 из 17 сортов наибольший процент регенерации (33—82%) был при концентрации ТДЗ — 1,5 мг/л. Обнаружена сортоспецифичность в проявлении регенерации. Выделены сорта с наибольшим регенерационным потенциалом.

Генетическая трансформация растений позволяет в довольно короткие сроки получить растения с новыми признаками, что трудно достигается при использовании традиционных методов селекции. Один из способов успешной генетической трансформации — получение адвентивных побегов из соматических тканей, т.е. регенерация целого растения из единичной клетки.

Гвоздика (*Dianthus caryophyllus* L.) является одной из 5 самых распространенных срезочных культур на мировом рынке цветов. За

последние 15 лет адвентивные побеги получены из самых различных эксплантов гвоздик: лепестков [2, 5, 7, 11], стеблевых эксплантов [7, 14], гипокотилей [9], мацерированных верхушек побегов [4], пыльников [13], семяпочек [1], междоузлий [10], а также из протопластов [6]. Проводились работы с листовыми эксплантами [2, 3], но результаты были недостаточно успешными, поскольку регенерация оказалась недостаточно активной. В последнее время появились сообщения о возможности получения адвентив-

ных побегов из листьев с высокой частотой [8, 12]. Вместе с тем данная проблема по-прежнему остается актуальной, так как наблюдается большая сортоспецифичность регенерации.

Методика

В исследовании использовали листовые экспланты 17 различных сортов мелкоцветных и крупноцветных гвоздик *Dianthus caryophyllus* L. (Spray и Standart), которые в дальнейшем упоминаются под кодовыми номерами.

Стерильные растения выращивали на модифицированной среде МС с добавлением сахарозы — 20 г/л, очищенного агары — 7 г/л и стандартных витаминов МС. Перед автоклавированием среду доводили до pH 5,6—5,8. Автоклавирование проводили при 103 кПа (121°С) в течение 20 мин. Для размножения использовали регуляторы роста 6-БАП — 0,5 и НУК — 0,1 мг/л, для укоренения — безгормональную среду. Пассажи проводили через каждые 4—6 недель. Растения выращивали в культуральных комнатах при температуре 20—25°С с искусственным освещением люминесцентными лампами белого и красного света при 16-часовом световом дне.

Для регенерации использовали листовые экспланты растений, укорененные *in vitro* в возрасте 4—6 недель. Для этого листья отделяли от стеблей (пазушные почки при этом оставались прикрепленными к стеблю) и целиком горизонтально укладывали на среду регенерации в чашки Петри (90 мм). В различных опытах количество эксплантов колебалось

от 10 до 25 шт. на чашку. Эксперименты закладывали 3 раза в 3 повторностях.

Регенерацию проводили в темноте при температуре 22—25°С, используя ту же среду, что и для размножения.

В 1-м эксперименте с 7 сортами гвоздик было 2 варианта концентраций гормонов 6-БАП + НУК: 1-й — 1,0 + 0,1; 2-й — 1,5 + 0,1 мг/л. Брали листья всех ярусов растения.

Во 2-м эксперименте с 4 сортами использовали различные сочетания концентраций ТДЗ и НУК. При этом были подобраны 4 градации лоз ТДЗ — 0,5, 1,0, 2,0 мг/л и 3 градации доз НУК — 0,05, 0,1 и 0,15 мг/л. Брали 3 верхние пары листьев.

В 3-м эксперименте изучали 17 сортов в 4 вариантах: I (контроль) — 6-БАП + НУК в концентрациях 1,5 + 0,1 мг/л; II — ТДЗ + ТИБК — 0,5 + 0,1 мг/л; III и IV — ТДЗ + НУК в концентрациях соответственно 1,5 + 0,1 и 2,0 + 0,1 мг/л. Использовали 3 верхние пары листьев.

Данные по регенерации и количеству побегов на эксплант обрабатывали с помощью дисперсионного анализа: однофакторного (для отдельных сортов) и двухфакторного неравночисленных комплексов (для определения общей картины влияния отдельных вариантов концентраций) по методу Н.А. Плохинского (1980) и методу Г.Ф. Лакина (1990).

Результаты

В 1-м эксперименте исследовали сорта Dia-1, Dia-2, Dia-7, Dia-10, Dia-12, Dia-18, Dia-24, а в ка-

честве цитокинина использовали 6-БАП. Процент регенерации оказался низким: в среднем по 7 сортам при концентрации 6-БАП 1,0 и 1,5 мг/л — соответственно 15,5 и 16,03. На 2—3-й неделе субкультивирования листовые экспланты начинали стареть и уже образовавшиеся новые побеги гибли.

Во 2-м эксперименте для стимуляции регенерации и предотвращения преждевременного старения эксплантов было решено использовать более сильный цитокинин — тедиозурон (ТДЗ) и листья трех верхних пар листьев. В опыте изучали влияние сочетаний концентраций ТДЗ и НУК на регенерацию побегов листьев сортов Dia-2, Dia-12, Dia-18 и Dia-24, показавших наибольшую регенерационную способность в 1-м эксперименте. Из табл. 1 видно, что наибольший процент ре-

генерации ($75,0 \pm 5,9\%$) получен при концентрации ТДЗ 1,5 мг/л в сочетании с НУК 0,5 мг/л. Пролегивается увеличение регенерационной способности при повышении концентрации ТДЗ от 0,5 до 1,5 мг/л вне зависимости от градаций НУК (52,8, 61,1 и 72,5%) и некоторое ее снижение при 2,0 мг/л (65,0%). Таким образом, регенерация в большей степени зависела от выбранных концентраций цитокинина, чем ауксина. Дисперсионный анализ показал, что существенная разница 5% уровня значимости обнаружена только между вариантами ТДЗ 0,5 и 1,5 мг/мл. Разница между вариантами концентраций НУК оказалась несущественной. Наибольший процент регенерации наблюдался у сорта Dia-12: 100 и 93% при сочетании ТДЗ и НУК в концентрациях соответственно 1,5 + 0,15 и 1,5 + 0,10 мг/л.

Таблица 1

Регенерация (%) при различных соотношениях ауксинов и цитокининов (в среднем по сортам Dia-2, Dia-8, Dia-18 и Dia-24 через 8 нед после начала эксперимента)

ТДЗ, мг/л	НУК, мг/л			В среднем по вариантам с ТДЗ
	0,05	0,10	0,15	
0,5	52,5±6,5	49,2±6,5	56,9±6,5	52,9±3,8
1,0	67,2±6,2	57,6±6,4	58,6±6,5	61,2±3,7
1,5	70,0±6,0*	71,9±6,0*	75,0 5,9*	72,5±3,4*
2,0	62,7±6,3	64,4±6,2	67,8±6,1	65,0±3,6
В среднем по вариантам с НУК	63,3±3,2	60,7±3,2	64,7±3,1	

* 5% достоверная разница между вариантами ТДЗ 1,5 и 0,5 мг/л.

Повышение концентрации ТДЗ привело к увеличению количества каллуса, образующегося на

месте среза листьев. В вариантах с ТДЗ 2,0 мг/л оно было наибольшим вне зависимости от концен-

трации НУК, при этом побеги оказались слабыми и сильно обводненными, плохо приживались в дальнейшем на среде для размножения. Проявление описанных признаков зависело от сорта.

Побеги образовывались лишь из клеток базальной части листьев. Только у сорта Dia-12 они могли регенерировать из середины листовой пластинки (количество таких эксплантов составляло не более 1—3% к общему их числу).

Количество побегов на эксплант (табл. 2) не зависело от

варианта концентраций. По-видимому, этот показатель определяется сортовыми особенностями. Анализ групповых средних по вариантам с НУК выявил существенное (5% уровень достоверности) различие в побегообразовательной способности между вариантами НУК 0,05 и 0,15 мг/л. При этом с уменьшением концентрации ауксина наблюдалась тенденция к увеличению количества побегов на эксплант (соответственно 5,01 и 4,54 шт. на эксплант).

Т а б л и ц а 2

Количество побегов на эксплант (шт.) при различных соотношениях ауксинов и цитокининов (в среднем по сортам Dia-2, Dia-12, Dia-18 и Dia-24 через 8 нед после начала эксперимента)

ТДЗ, мг/л	НУК, мг/л			В среднем по вариантам с ТДЗ
	0,05	0,10	0,15	
0,5	4,74±1,37	4,82±0,33	5,49±1,54	5,02±0,24
1,0	5,46±1,31	4,83±1,35	4,21±0,75	4,83±0,36
1,5	5,89±1,33	5,62±0,49	4,72±1,28	5,41±0,35
2,0	3,96±0,72	4,72±1,27	3,73±0,68	3,97±0,14
В среднем по вариантам с НУК	5,01±0,42	4,87±0,29	4,54±0,38*	

В 3-м эксперименте, основываясь на результатах 2-го, для изучения регенерационной способности 17 сортов были использованы варианты ТДЗ 1,5 и 2,0 мг/л с НУК 0,1 мг/л в обоих случаях. Кроме того, для определения влияния ауксинов на регенерацию вместо НУК применили ауксин ТИБК с ТДЗ 1,5 мг/л. В качестве контрольного использовалось сочетание 6-БАП + НУК — 1,5 + 0,1 мг/л.

Большинство изучаемых сортов образовывало побеги через стадию каллусообразования (особенно сильно это проявлялось на средах с использованием ТДЗ). Лучшие результаты (80,0 и 81,8%) были получены у сорта Dia-12 в I и II вариантах. Сорта Dia-31 и Dia-23 не образовали побегов на среде с концентрацией ТДЗ 2,0 мг/л (рис. 1).

Изучаемые сорта заметно различались по своей регенерацион-

ной способности. Дисперсионный анализ показал, что она зависит как от выбранного варианта концентраций гормонов ($F_{\text{факт}} = 20,49 > F_{5\%} = 8,53$), так и от генотипа ($F_{\text{факт}} = 12,69 > F_{0,1\%} = 4,10$). Для сортов Dia-1, Dia-3, Dia-11 (уровень значимости 5%) и Dia-2, Dia-8, Dia-24 (уровень значимости 1%) использование ТДЗ привело к увеличению регенерации в 1,5—2 раза по сравнению с контролем, у Dia-2, Dia-3, Dia-8, Dia-12 и Dia-18 — более чем на 60%, у Dia-2, Dia-3 — на 50%. Тенденция к увеличению регенерации при замене 6-БАП на ТДЗ прослеживается у большинства сортов, хотя у сортов Dia-2, Dia-3, Dia-8, Dia-12, Dia-15 и Dia-18 процент регенерации был достаточно высок и в варианте с 6-БАП. У значительной группы сортов (Dia-4, Dia-9, Dia-7, Dia-11, Dia-23, Dia-27, Dia-31 и Dia-33) наблюдалась низкая регенерация; большинство из этих сортов относятся к группе Standard.

Изучаемые сорта характеризовались различной способностью к побегообразованию (табл. 3). Побеги регулярно образовывались в течение всего периода регенерации, хотя у сортов Dia-10, Dia-23, Dia-24 и Dia-33, как правило, формировались 1—3 побега, после чего новые побеги почти не появлялись.

При использовании 6-БАП побегообразование шло намного интенсивнее, чем при ТДЗ. Дисперсионный анализ показал существенную разницу (5 или 1% уровень значимости) между I вариантом и II, III и IV вариантами

у сортов Dia-1, Dia-4, Dia-9, Dia-10, Dia-11, Dia-15 по этому показателю. Максимальные значения последнего были у сортов Dia-11 ($8,50 \pm 2,76$ шт. на эксплант) и Dia-15 ($9,81 \pm 3,10$ шт.). В вариантах с ТДЗ среднее количество побегов не превышало 1—5 шт.: наибольшее количество побегов на эксплант было отмечено у Dia-4 и Dia-18 (соответственно $4,87 \pm 1,18$ и $4,51 \pm 1,03$ шт.).

Регенерационная способность эксплантов большинства сортов проявлялась максимально к концу второй недели субкультивирования (рис. 2, 1). У сортов Dia-9, Dia-18 и Dia-27 период «пробуждение эксплантов» был более затянутым (рис. 2, 2) — максимум приходился на 3-ю неделю субкультивирования; сорта Dia-2, Dia-3, Dia-31 и Dia-33 (рис. 2, 3) по своей регенерационной способности занимали промежуточное положение между предыдущими группами.

Вместе с регенерацией побегов в вариантах с использованием НУК обнаружена регенерация корней. При замене НУК на ТИБК большинства сортов, за исключением Dia-9, Dia-23, Dia-24 и Dia-27, корни не образовывались. У изучаемых сортов корни формировались и развивались раньше побегов — на 1—5-й неделе регенерации. В дальнейшем корнеобразование не происходило, к концу периода регенерации корни отмирали. Экспланты, показавшие ризогенез, не всегда образовывали адвентивные побеги, или побеги у них формировались позднее, чем у бескорневых эксплантов. У некоторых сортов

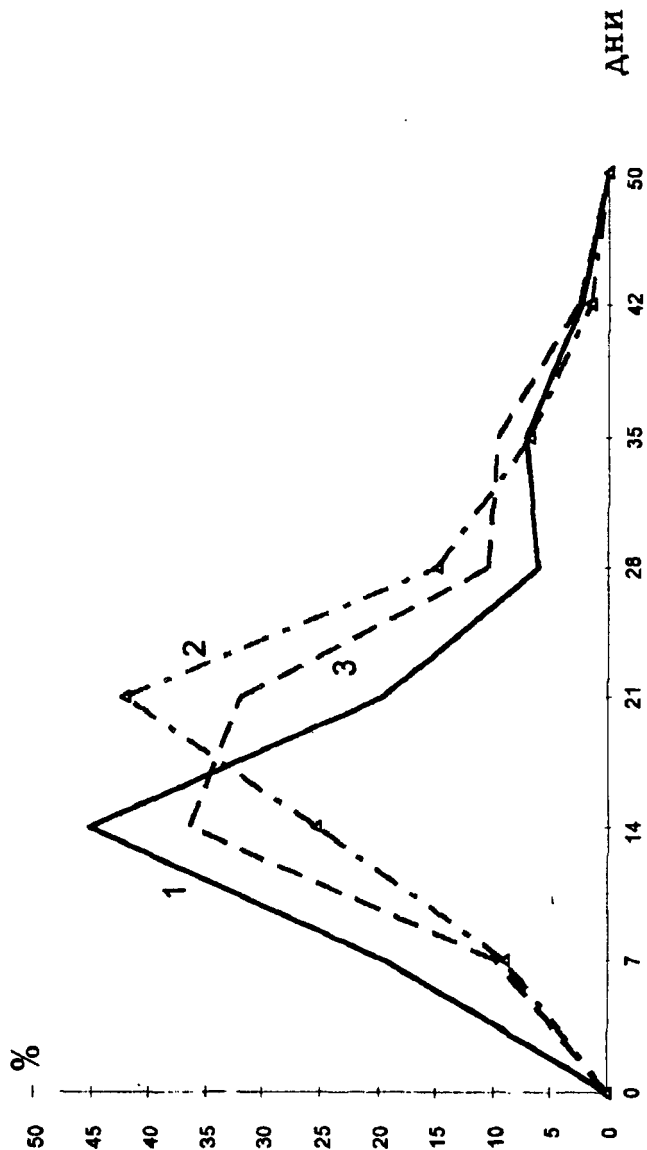


Рис. 1. Среднее количество эксплантов, образующих побеги за недельные интервалы наблюдений по группам сортов.

1 — Dia-1, Dia-4, Dia-8, Dia-11, Dia-15, Dia-24; 2 — Dia-9, Dia-18, Dia-27; 3 — Dia-2, Dia-3, Dia-31, Dia-33.

Среднее число побегов (шт/эксплант) и наличие корней у регенерирующих сортов гвоздики в 4-м эксперименте (через 7 нед после начала эксперимента)

Сорт	Вариант концентрации гормонов в среде для регенерации							
	I (контроль)		II		III		IV	
	П	К	П	К	П	К	П	К
Dia-1	7,66±1,31	++	1,94±1,16**	—	3,98±0,79*	+++	2,78±1,42***	+++
Dia-2	4,17±1,78	+	2,96±0,42	—	3,41±0,58	+	3,61±0,61	+
Dia-3	2,94±0,24	++	2,78±0,49	—	2,69±0,16	—	2,92±0,21	+
Dia-4	4,53±0,74	++	4,87±1,18	—	2,64±0,44*	+	3,78±1,01	+++
Dia-7	4,38±2,38	—	1,75±0,14	—	2,21±0,21	—	3,00±0,58	—
Dia-8	3,69±1,99	+++	1,50±0,87	—	2,59±1,22	++	1,58±0,30	++
Dia-9	6,33±2,92	++	1,37±0,39*	+++	3,10±0,93	++	3,23±0,32	+++
Dia-10	4,44±0,77	++	4,33±0,63	—	4,36±0,77	++	3,49±0,74*	+++
Dia-11	8,50±2,76	—	2,50±0,29*	—	2,30±0,25*	+	1,65±0,73*	—
Dia-12	3,00±0,67	—	2,82±0,58	—	3,90±1,16	—	4,13±0,86	—
Dia-15	9,81±3,10	+	2,34±0,54**	—	2,26±0,42**	+++	2,18±0,35**	++
Dia-18	4,17±0,44	—	4,23±0,50	—	3,76±0,31	+++	4,51±1,03	++
Dia-23	3,83±0,44	+	3,00±1,15	++	1,27±0,27	++	0,00	
Dia-24	4,67±1,83	+	2,79±0,51	++	3,71±0,70	+++	3,29±0,40	+++
Dia-27	2,83±1,00	++	3,40±0,38	+	4,45±1,21	+++	3,91±0,93	++
Dia-31	3,83±0,65	+	1,00±0,00	—	1,80±0,37	—	0,00	—
Dia-33	2,54±0,87	+	2,25±0,75	—	2,97±0,73	++	1,58±0,30	+++
В среднем	5,08±0,58		2,71±0,25**		2,8±0,23**		2,78±0,27**	

Примечания: П — количество побегов на эксплант; К — наличие корней: — корни не образовывались, + — 0,1—5% корней, ++ — 5—10, +++ — более 10% корней. Одной и двумя звездочками обозначены 5 и 1% уровень значимости по отношению к контролю.

количество эксплантов, образующих корни, превышало 20% их общего числа; такие экспланты наблюдались только в IV варианте (Dia-10 — 20%, Dia-4 — 21, Dia-9 — 24%). Статистическая корреляция между снижением регенерации адвентивных побегов и количеством образуемых корней обнаружена не была.

Таким образом, среди изучаемых вариантов вариант ТДЗ

1,5 мг/л + НУК 0,1 мг/л оказался оптимальным для регенерации из листовых эксплантов гвоздики. У 10 из 17 сортов в этом варианте получен самый высокий процент регенерации (33—82). Наибольшим регенерационным потенциалом обладают сорта Dia-2, Dia-3, Dia-8, Dia-12, Dia-15, Dia-18 и Dia-24. В настоящее время с этими сортами ведутся работы по дальнейшему усовершенствованию

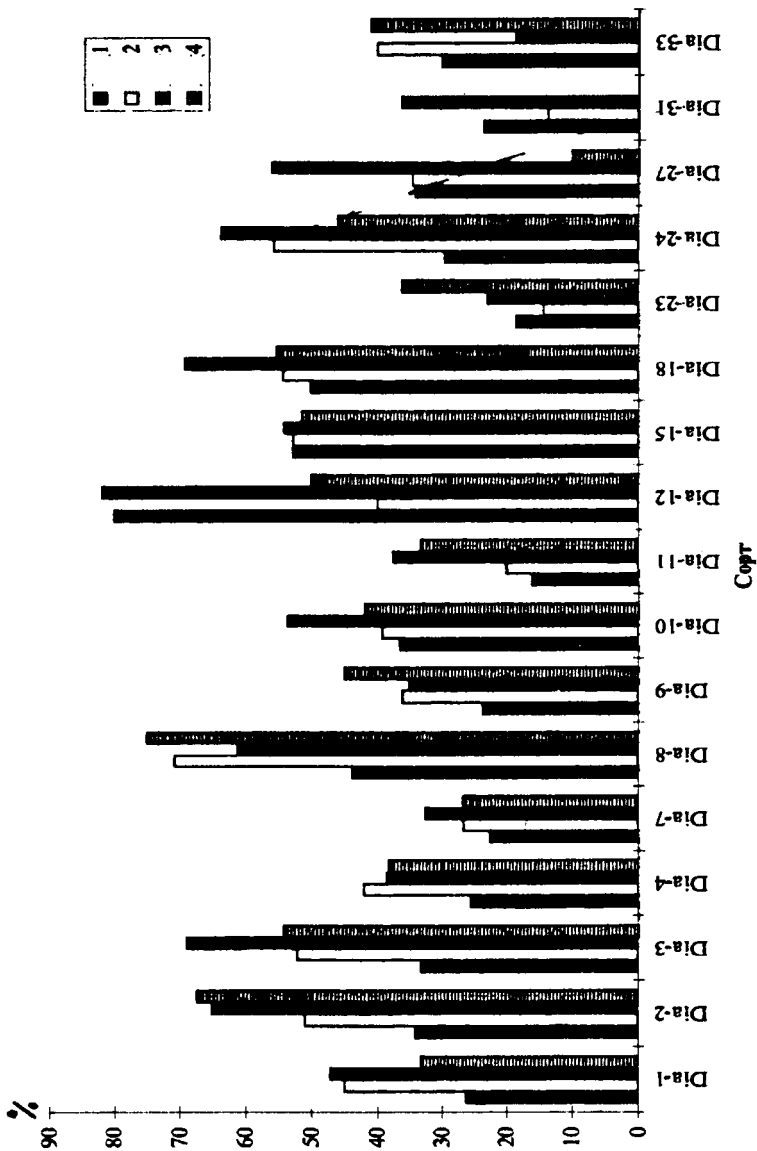


Рис. 2. Регенерация гвоздики различных сортов из листовых эксплантов (через 7 нед после начала эксперимента).
1, 2, 3, 4 — I, II, III и IV варианты 3-го эксперимента

нию методики регенерации адвентивных побегов из листьев посредством комбинирования 6-БАП и ТДЗ, а также с использованием эксплантов растений *in vivo*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Demmink J.F., Custers J.B.M., Berervoet J.H.W. *Acta Horticulturae*, 1987, vol. 216, p. 343—344. — 2. Frey L., Janic J. — *Amer. Soc. Hort. Sci.*, 1991, vol. 116(6), p. 1108—1112. — 3. Gimelli F., Ginata G., Venturo R., Positano S., Buiatti M. — *Riv. Ortoflorofrutt*, 1984, vol. 68, p. 107—121. — 4. Johnson R.T. — *Hort. Sci.*, 1980, vol. 15(5), p. 605—606. — 5. Kakehi F. — *Bull. of the Hiroshima Agric. Coll.*, 1979, vol. 6, p. 159—166. — 6. Nakano M., Mii M. — *Plant Cell Report*, 1992, vol. 141, p. 721—725. — 7. Nugent G., Wardley—Richardson T.,

Lu S.Y. — *Plant Cell Report*, 1991, vol. 10, p. 477—480. — 8. Messeguer J., Arconada M.C., Mele E. — *Scienta Hort.*, 1993, vol. 54, p. 153—163. — 9. Pertu E., Landa Z. — *Biologia Plant*, 1974, vol. 1316, p. 109—116. — 10. Radojevic L., Djordjevic N., Petrovic J. — *Int. Symp. «In Vitro Culture and Hort. Breeding»*. Casena, Italy, 30 May—3 June 1989. — 11. Sankhla D., Davis T.D., Sandkhla N., Upadhyata A. — *Gartenbauwissenschaft*, 1995, Bd 60, S. 228—233. — 12. Van Alvrost A.C., Dons J.M.M., Bruinsma T., Dons J.J.M. — *Plant Cell Culture and Organ Culture*, 1994, vol. 37, p. 87—90. — 13. Villabos V. — *Phyton Argentina*, 1981, vol. 41, p. 71. — 14. Zuker A., Chang P.F.L., Ahroni A. *et al.* — *Sci. Hort.*, 1995, vol. 64, p. 177—185..

Статья поступила 3 марта
1997 г.

SUMMARY

Regeneration of adventitious shoots was achieved from leaf explants derived from *in vitro* plants of 17 carnation varieties (*Dianthus caryophyllus* L.). Shoots were formed from basal parts of leaves by direct regeneration as well as through stage of callus. Influence on regeneration efficacy of both cytokinins (BA and TDZ) and auxines (NAA and TIBA) was investigated. BA led to early senescence of explants and increased the number of adventitious shoots per explant. TDZ caused more active morphogenesis than BA in all investigated varieties; increasing TDZ concentration from 0.5 to 2.0 mg/l extended callus formation on cuts of leaves and caused vitrification of shoots. In 10 of 17 varieties the greatest percent of regeneration was observed at TDZ concentration 1.5 mg/l (33—82). The specificity of regeneration was revealed. Varieties with the highest regeneration potential were found.