

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43
И73

Редакционная коллегия:

д.б.н., чл.-корр. НАН Беларуси *В. В. Титок* (ответственный редактор),
к.б.н. *П. Н. Белый*; к.б.н. *И. М. Гаранович*; д.б.н. *Н. В. Гетко*;
к.б.н. *Л. А. Головченко*; *С. М. Кузьменкова*; д.б.н. *Е. Н. Кутас*;
к.б.н. *Н. М. Лунина*; к.б.н. *О. В. Чижик*; к.б.н. *А. П. Яковлев*

Рецензенты:

доктор биологических наук, Ботанический институт
имени В. Л. Комарова Российской академии наук *К. Г. Ткаченко*;
кандидат биологических наук, Институт экспериментальной
ботаники имени В. Ф. Купревича Национальной академии наук Беларуси
А. В. Пугачевский

Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия флоры : материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси (Минск, 28 июня – 1 июля 2022 г.). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]. редкол.: В.В. Титок [и др.] – Минск : Белтаможсервис, 2022. – 420 с.

ISBN 978-985-7004-75-1

В сборнике представлены материалы международной научной конференции, посвященной 90-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. Часть 2: секция 3 «Биотехнологические и молекулярно-генетические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений», секция 4 «Решение вопросов защиты растений в ботанических садах», секция 5 «Научное, прикладное и просветительское значение ботанических коллекций» и секция 6 «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства».

УДК 582:581(082)
ББК 28.59я43

ISBN 978-985-7004-75-1 (ч. 2)
ISBN 978-985-7004-72-0

© ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси», 2022
© Оформление. РУП «Белтаможсервис», 2022

УДК 581.14.6:634.738

МОРФОГЕНЕЗ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ СОРТОВ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ, БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ, РОДОДЕНДРОНА ЖЕЛТОГО, В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Кутас Е. Н.

Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь
E. Kutas@cbg.org.by

Резюме. Изучен морфогенез интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого на различных модификациях питательных сред, определен оптимальный состав питательной среды для этого процесса. Показана принципиальная возможность регенерации интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной методом активации пазушных меристем, рододендрона желтого – двумя методами: 1) активацией пазушных меристем, 2) через пролиферацию каллуса и последующее образование из него побегов.

MORPHOGENESIS INTRODUCED VARIETIES OF BLUEBERRY HIGH, COWBERRY ORDINARY, OF RHODODENDRON YELLOW, DEPENDING ON THE COMPOSITION OF THE NUTRIENT MEDIA

Kutas E. N.

Summary. The morphogenesis of the introduced varieties of blueberry high, cowberry ordinary, rhododendron yellow on various modifications of the nutrient media was studied, the optimal composition of the nutrient medium for this process was determined. The principal possibility of regeneration of introduced varieties of blueberry high, cowberry ordinary by the method of activation of axillary meristems was shown; for rhododendron yellow – by two methods: 1) by activation of the axillary meristems, 2) through the proliferation of callus and the subsequent formation of shoots from it.

Введение. Вопросу морфогенеза в культуре клеток и тканей посвящена обширная литература. Ее анализ позволяет прийти к выводу, что морфогенез – сложный и многофакторный процесс, зависящий от типа и физиологического состояния экспланта, состава питательной среды, т. е. компонентов, содержащихся в ней (макро- и микроэлементов, витаминов, углеводов, гормональных добавок), а также от pH среды, условий культивирования и целого ряда других факторов. Подтверждением тому могут служить некоторые экспериментальные исследования [1–7].

Согласно результатам исследований Шора и Папазяна [8], полученным при изучении процессов морфогенеза в культуре изолированных тканей роз на пяти средах, различающихся концентрацией макросолей и комбинацией гормональных добавок, реализация морфогенеза заключалась в развитии побегов из пазушных почек и формировании каллуса на срезах стебля и черешка листа. Наиболее интенсивное развитие побегов было отмечено на среде Мурасиге-Скуга полного минерального состава с добавлением БАП и НУК в условиях 16-часового фотопериода.

Guta and Chandra [9] изучали влияние регуляторов роста (БАП, НУК, ГК) на морфогенез различных типов эксплантов табака: кусочки листа без центральной жилки, изолированные из 2–4 верхних листьев; отрезки междоузлий, изолированные из второго верхнего междоузлия; полоски ткани эпидермиса с несколькими примыкающими слоями клеток, изолированные из молодых междоузлий. Экспериментальные данные позволили авторам прийти к выводу, что ГК в концентрации 0,5 мг/л стимулировала формирование почек только на эксплантах кусочков листа; кинетин и НУК способствовали образованию вегетативных почек на эксплантах стебля, а кинетин – на эксплантах листа.

Из публикации Вилор с соавторами [10] следует, что морфогенетические процессы, протекающие у подсолнечника в культуре *in vitro*, находятся в зависимости от типа питательной среды и экспланта. Ими установлено, что лучше всего каллус формировался на средах Эриксона

и Мурасиге-Скуга из апикальной меристемы стебля, а на среде Уайта – из листа. Образование побегов с корнями авторы наблюдали только из апикальной меристемы.

О роли ауксинов и цитокининов в регуляции морфогенеза свидетельствуют экспериментальные исследования, проведенные Budagovskava et al. [11]. В качестве эксплантов использовали листья и верхушки молодых побегов злаков, выращенных в асептических условиях, а также листья взрослых растений, культивируемых в полевых условиях. Авторы приходят к выводу, что каллусы лучше образуются на эксплантах, взятых от взрослых растений, выращенных в поле, при содержании в среде 1 мг/л бензиладенина и 1,2 – НУК. Побегообразование отмечено на среде Мурасиге-Скуга, содержащей 2 мг/л бензиладенина.

Изучение морфогенеза интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого, на различных модификациях питательных сред, позволит определить оптимальный состав питательной среды для протекания этого физиологического процесса в условиях *in vitro*.

Объекты и методы исследования. Объектами исследования служили интродуцированные сорта голубики высокой («Elizabeth»), брусники обыкновенной («Ammerland», «Red Pearl»), рододендрон желтый (*Rhododendron luteum* Sweet). Эксперименты были поставлены на трех типах питательных сред (MS, WPM, Андерсена), представленных 9 различными модификациями (табл. 1).

В качестве эксплантов использовали микрочеренки, интродуцированных сортов голубики высокой («Elizabeth»), брусники обыкновенной («Ammerland», «Red Pearl»), рододендрона желтого (*Rhododendron luteum*), введенных в стерильную культуру, а также эпикотиль, гипокотиль, семядоли, корешок, листья ювенильных проростков рододендрона желтого, полученных нами ранее в асептических условиях на модифицированной питательной среде Андерсена. Стерильные экспланты высаживали на питательные среды: Мурасиге-Скуга, WPM и Андерсена в колбы одинакового объема по 15 мл среды в каждой. Высаженный материал культивировали при температуре 26°C, влажности воздуха 56 %, фотопериоде 16 ч, освещенности 4 000 лк. Повторность опытов трехкратная. Учитывалось количество побегов на эксплант (шт.), каллусообразование (мг) спустя 45 дней с момента высадки эксплантов на питательную среду. Статистическая обработка данных проведена исходя из 20 эксплантов на повторность. Экспериментальные данные сведены в табл. 2–3. В них приведены средние арифметические и их стандартные ошибки.

Результаты и их обсуждение. По истечении четырех недель культивирования из одного микрочеренка образовалось в среднем от 1 до 13 микропобегов в зависимости от состава питательной среды (таблица 2). У эксплантов рододендрона желтого (эпикотиль, гипокотиль, семядоли, корешок, листья) через 5–6 недель культивирования образовался органогенный каллус с последующей регенерацией из него вегетативных побегов. При этом следует отметить, что образование органогенного каллуса и дальнейшая регенерация побегов характерны для эксплантов (корешок, эпикотиль, гипокотиль, семядоли, листья), полученных из свежесобранных семян, а для эксплантов из пророщенных семян, прошедших стратификацию, побегообразование происходило непосредственно из ткани экспланта, минуя стадию каллусообразования. Логично предположить, что это может быть связано с неодинаковым протеканием физиологических, биохимических, цитологических и других процессов у эксплантов из свежесобранных и стратифицированных семян, а также с разным содержанием эндогенных фитогормонов в них. Вероятно, все вместе взятое послужило основой для регенерации побегов из каллуса без предварительного его пассирования на питательную среду другого состава. Другими словами, индукция каллусогенеза, а затем побегообразование происходили на среде одного и того же состава.

Из таблицы 3 следует, что самым высоким морфогенетическим потенциалом обладают все без исключения экспланты рододендрона желтого на средах: WPM и Андерсена двух модификаций (№ 8, 9, см. таблицу 1). В данном случае в основе морфогенеза рододендрона желтого лежит способность клеток эксплантов дедифференцироваться, другими словами, терять свою прежнюю специализацию и превращаться в каллусные клетки. Превращение специализированных клеток в каллусные связано с индукцией клеточного деления, способность к которому клетки потеряли в процессе дифференциации [12].

Таблица 1. Состав питательных сред, для изучения морфогенеза интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого

Компонент, мг/л	Модификация среды								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Соли и витамины по MS	+	-	1/2	+	-	-	-	-	-
Соли и витамины по WPM	-	+	-	-	-	-	-	+	-
Соли и витамины по Андерсону	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Мезоинозит	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Аденин сульфат	-	80	80	80	80	40	60	80	80
Тиамин	0,4	-	-	0,4	-	0,1	0,1	0,4	0,1
Пиридоксин	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
Индолилуксусная кислота	1,0	5,0	-	2,0	2,0	1,5	2,5	4,0	4,0
Гибберелловая кислота	-	4,0	-	-	-	-	-	-	-
Нафтилуксусная кислота	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Бензиламинопурин	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-
Изопентениладенин	10	10	2,0	5,0	4,0	-	10	15	15
Сахароза, г/л	20	20	20	30	30	20	20	30	30
Агар, г/л	9	9	9	9	9	9	9	9	9
pH	4,8	4,8	4,8	4,8	4,0	4,0	4,0	4,8	4,8

Примечание. Знак (+) – компонент присутствует в среде; знак (-) – компонент отсутствует в среде; ½ – половинная доза компонента в среде.

Таблица 2. Побегообразование у интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого в зависимости от состава питательной среды

Номер модификации среды	Количество регенерантов на один эксплант, шт.			<i>Rhododendron luteum</i>
	«Elizabeth»	«Ammerland»	«Red Pearl»	
1	4,5±1,2	4,7±1,8	4,2±1,0	4,5±1,3
2	3,5±1,4	3,2±1,0	3,7±1,2	4,2±1,0
3	1,1±1,0	1,3±1,0	1,8±0,2	1,3±1,0
4	1,2±1,3	2,9±1,1	3,2±1,1	3,1±1,7
5	3,6±1,2	3,1±1,3	3,0±2,1	2,1±1,2
6	1,3±1,1	0,7±0,1	1,0±0,3	0,6±0,1
7	1,4±1,0	1,6±1,1	1,2±0,1	1,5±1,0
8	7,0±1,0	10,0±1,0	11,5±2,1	6,0±1,7
9	9,0±1,0	12,0±2,0	13,0±2,0	7,0±2,2

Таблица 3. Морфогенез у рододендрона желтого в зависимости от состава питательной среды

Номер модификации среды	Количество регенерантов на один эксплант, шт.					
	калус, мг	побеги, шт.	Источник эксплантов			
			корешок	гипокотиль	эпикотиль	листья
1	30,7±3,1	1,0±0,0	+	+	+	+
2	165,6±3,8	10,0±3,0	++	++	++	++
3	130,0±3,2	9,0±1,0	++	++	++	++
4	210,0±3,0	16,0±1,0	+++	+++	+++	+++
5	110,5±16,1	13,0±2,0	+++	+++	+++	+++
6	40,8±1,4	2,0±1,0	+	+	+	+
7	85,0±2,5	7,0±2,0	+	+	+	+
8	119,0±1,7	8,0±2,0	++	++	++	++
9	305,0±6,1	19,0±3,0	+++	+++	+++	+++

Примечание: + – морфогенез низкий, ++ – средний, +++ – высокий

Согласно теории Скуга и Миллера, процесс морфогенеза начинается от перехода клетки к инициации организованного развития и является результатом изменения баланса между фитогормонами. Ими было установлено, что превышение содержания ауксина над цитокинином в среде вызывает индукцию корней; обратное соотношение, т. е. превышение цитокинина над ауксином приводит к образованию почек и вегетативных побегов [13].

Можно полагать, что различия между клетками и тканями по содержанию эндогенных фитогормонов определяют разный характер их поведения в изолированной культуре и неодинаковые потребности в компонентах среды.

Каллусные клетки (за исключением ауксин- и цитокининнезависимых опухолевых клеток) не могут сами синтезировать фитогормоны в достаточных количествах, необходимых для индукции процессов морфогенеза, поэтому нуждаются в экзогенных регуляторах роста. Каллусные клетки только при определенном соотношении цитокининов и ауксинов в среде могут перейти к организованному росту и формированию побегов. Это соотношение для каждого вида растения устанавливается экспериментальным путем. Подтверждением тому могут служить многочисленные исследования, касающиеся регуляции морфогенеза в культуре клеток и тканей с помощью определенного соотношения ауксинов и цитокининов в питательной среде [14–22].

Нашими исследованиями показано, что для образования регенерантов рододендрона желтого из каллусной ткани в питательную среду необходимо добавлять цитокинины и ауксины в следующих соотношениях: 2,5:1 (среда № 4), 2:1 (среда № 5), 3,75:1 (среда № 8 и № 9).

Как показал анализ результатов экспериментальных исследований, полученных по изучению морфогенеза интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной, рододендрона желтого на девяти модификациях питательных сред, различающихся по содержанию макро- и микросолей, гормональных добавок, лучшими для морфогенеза изученных растений оказались среды 8-й и 9-й модификаций, содержащие в своем составе макро- и микроэлементы по WPM и Андерсену, а также гормональные добавки: 4 мг/л индолилуксусной кислоты и 15 мг/л изопентениладенина (таблица 1). На средах 8-й и 9-й модификаций в сравнении с таковыми 1-й, 2-й, 3-ей, 4-й, 5-й, 6-й и 7-й получено максимальное количество побегов на эксплант от 6 до 13 в зависимости от сорта и вида растения (таблица 2).

Выводы:

1. Лучшими для морфогенеза интродуцированных сортов голубики высокой, брусники обыкновенной и рододендрона желтого оказались среды 8-й и 9-й модификаций, содержащие в своем составе макро- и микроэлементы по WPM и Андерсену, а также гормональные добавки: 4 мг/л индолилуксусной кислоты и 15 мг/л изопентениладенина.

2. Регенерировать рододендрон желтый можно двумя методами: 1) путем активации пазушных меристем, 2) через пролиферацию каллуса и последующее образование из него побегов.

Список литературы

1. Sweet M., Rahman M. In Vitro Rapid Clonal Propagation of *Plumbago zeylanica* Linn. Through Direct Organogenesis // *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* – 2016. – Vol.7, N 3. – P. 877–887.
2. Hala Al. A. Almobasher. Comparison Study On In Vitro morphogenesis of Mature and Immature Wheat (*Triticum aestivum* L.) Embryos // *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* – 2016. – Vol.7, N 3. – P. 1134–1141.
3. Ali J., Bantte K., Feyissa T. Protocol optimization for in vitro shoot multiplication of Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* L.) // *African Journal of Biotechnology.* –2017. – Vol 16, N 2. – P. 87–90.
4. Shete R., Jadhav A., Pandhure N. In vitro multiplication of *Solanum virginianum* L. // *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* –2017. – Vol.4, N 2. – P. 157–160.
5. Kaveri S., Srinath R. Thidiazuron mediated callus and multiple shoot induction in *Nothapodytes foetida* (Wight) Sleumer – an important medicinal plant // *Int. J. Cur. Adv. Res.* – 2017. – Vol. 6, N 2. – P. 1731–1734.
6. Mejury Shiri, Ruvimbo Marjorie Mudyiwa, Marjory Takawira, Collen Musara and Tsvakai Gama. Effects of rooting media and indole-3-butyric acid (IBA) concentration on rooting and shoot development of *Duranta erecta* tip cuttings // *Afr. J. Plant Sci.* – 2019. – Vol. 13, N 10. – P. 279–285.

7. Gilani S., Shah K, Ahmed I, Basit A, Sajid M, Bano A. S, Shahid U. Influence of indole-3-butyric acid (IBA) concentrations on air layerage in guava (*Psidium guajava* L.) cv. Sufeda // *Pure and Applied Biology* – 2019. – Vol. 8, N 1. – P. 355–362.
8. Шор М. Ф., Папазян Н. Д. Изучение процессов морфогенеза в культуре изолированных тканей роз // *Рос. акад. наук, Ин-т физиологии растений. М., 1989. Деп. в ВИНТИ 19.04.89, № 2572–889.*
9. Gupta S. C., Chandra N. Control of organogenesis in cultures of differnt vegetative explants of *Nicotiana plumbaginifolia* Viv // *Indian. J. Plant. Physiol.* – 1985. – N 2. – P. 145–150.
10. Вилор Т. А., Гапоненко А. К., Мелконова Н. М. Выбор оптимальной питательной среды для подсолнечника /*Рос. акад. наук, Ин-т физиологии растений. М., 1987. Деп. в ВИНТИ 19.01.87, № 382–387.*
11. Budagovskaya H. V., Kara A. N., Kotov A. A. Hormonal regulation of pea isolated apex devolepment // *Plant Physiol.* –1990. – Vol. 79, N 2, pt. 2. – P. 7.
12. Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. М.: Наука – 1975. – 51 с.
13. Skoog F, Miller C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro // *Indian. J. Plant. Physiol.* –1957. –N 11. – P. 118–123.
14. Christopher T., Prolaram B., Rajam M. V., Subhash K. In vitro response of excised embryos from red pepper (*Capsicum annuum* L.) on hydroxylamine treatment // *Indian. J. Exp. Biol.* –1987. – Vol. 25, N 5. P. 349–350.
15. Маковейчук А. Ю. Эмбриодогенез как модель коррелятивного взаимодействия фитогормонов // Второй съезд Всесоюз. Об-ва физиологов растений: материалы Междунар. науч. конф., Минск, 24–29 сент. 1990 г. Мн., 1990. С. 58.
16. Martínez, A.P., Cárdenas, N.R., Hernández, O.D., Chávez, A. V. Micropropagation of *Turbinicarpus valdezianus* (Möeller) Glass & Foster (Cactaceae) an Endemic Cactus in Northern Mexico // *HortScience.* – 2016. – Vol. 51, N 1. – P. 94–97.
17. Sellathurai, T., Rathinavel, S. In vitro micropropagation of *Tylophora indica* (Burm.f) Merrill through shoot tip explants // *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology.* – 2012. – Vol. 13, N 1. – P. 65–68.
18. Miyamoto Kensuke, Kotake Toshihisa, Boncela Anna Jarecka, Saniewski Marian, Ueda Junichi. Hormonal regulation of gummosis and composition of gums from bulbs of hyacinth (*Hyacinthus orientalis*) // *Journal of Plant Physiology.* – 2015. – Vol. 174. – P. 1–4.
19. Masondo Nqobile, Aremu Adeyemi, Finnie Jeffrey, Staden Johannes. Growth and phytochemical levels in micropropagated *Eucomis autumnalis* subspecies *autumnalis* using different gelling agents, explant source, and plant growth regulators // *Biology Plant.* –2015. – Vol. 5, N 1. – P. 102–110.
20. Noreldaim H. Effects of nutrient media constituents on growth and development of banana (*Musa spp.*) shoot tips cultured in vitro // *African Journal of Biotechnology.* – 2012. – Vol. 11, N 37. – P. 9001–9006.
21. Егорова Н. А., Ставцева И. В., Митрофанова И. В. Морфогенез и клональное микроразмножение *Salvia sclarea* L. in vitro // *Сборник научных трудов. Ялта, – 2011. – Т. 133. – С. 41–52.*
22. Choudhari N. B., Khade R.S, Thakare I. S. In vitro Medicinal plant *Uraria picta* Jacq DC. // *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* –2020. – Vol.7, N 4. P. 169–172.