

Таким образом, данную мутацию, подобно ранее описанным гаметофитным мутациям табака (Колесова, Еналеева, 2001) и ряда других видов (Drews et al., 1998), можно отнести к группе мутаций, проявляющихся как в женской, так и в мужской генеративных сферах.

#### Литература

Еналеева Н.Х. Внутривидовая изменчивость зародышевых мешков покрытосеменных растений: теоретические и прикладные аспекты (на примере *Nicotiana tabacum L.*): Автореф. дис. .... д-ра биол. наук. С.-Пб., 2000. 41 с.

Еналеева Н.Х., Тырнов В.С., Хохлов С.С. Выделение зародышевых мешков покрытосеменных растений путем мацерации тканей // Цитология и генетика. 1972. Т. 6, № 5. С 439-441.

Колесова А.Ю., Еналеева Н.Х. Состояние мужского гаметофита у мутантов *Nicotiana tabacum L.* с уменьшенным числом элементов в зародышевых мешках // Известия СГУ. Серия биологическая, Вып. специальный. 2001. С. 184-189.

Drews G.N., Lee D., Christensen C.A. Genetic analysis of female gametophyte development and function // Plant Cell. 1998. Vol. 10. P. 5-17.

Enalceva N.Kh. Experimental production of gametophyte mutants // In: Proc. Of the XI Intern. symp. Embryology and seed reproduction. St.Petersburg "Nauka". 1992. P. 143-144.

УДК 581.143.6: 582.765.2

### МОРФОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ СКУМПЦИИ

С.Н. Тимофеева

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов

Скумпия дубильная (*Cotinus adans coqqiqria Scop.*) из сем. *Сумаховые* (*Anacardiaceae Lindl*) является одной из перспективных культур для городского озеленения, что обусловлено сочетанием высокой декоративности на протяжении всей вегетации с неприхотливостью к условиям выращивания. Кроме того, скумпия используется для получения ценного медицинского препарата танина, эфирного масла, красителей для кожи и шерсти (Колесников, 1974).

Несмотря на столь привлекательные хозяйственно-ценные признаки, скумпия является мало распространенной культурой в Саратовской области. Интродукция и дальнейшее распространение скумпии затруднены низким коэффициентом размножения традиционными методами. Семеса характеризуются низкой всхожестью, а размножение черенками строго ограничено стадией онтогенеза.

Использование методов культуры клеток и тканей дает возможность преодолеть подобные ограничения. В этой связи нами были начаты работы по изучению морфогенетического потенциала различных органов и тканей и

выявлению факторов, оказывающих влияние на инициацию и развитие стеблевых меристем скумпии в культуре *in vitro*.

### Материалы и методы

Донором растительного материала служило 10-летнее дерево в репродуктивной фазе развития, а также однолетние саженцы из коллекции дендрария Ботанического сада СГУ.

В качестве первичных эксплантов использовали вегетативные почки одревесневших и зеленых побегов, сегменты молодых, но уже полностью сформировавшихся листьев, верхушки однолетних вегетативных побегов длиной 2 – 3 см.

Срезанные в полевых условиях ветки освобождали от листьев, смывали внешние загрязнения проточной водой. Одревесневшие побеги помещали в раствор синтетического моющего средства «Апрель» (СМС) на 10-15 мин, затем промывали проточной водой в течение 20-30 мин. Поверхностную стерилизацию проводили в ламинар-боксе последовательно 70% этанолом (30 сек) и диацидом (15 мин). При стерилизации зеленых побегов раствор СМС заменили на мыльный, отменили промывку проточной водой, а также уменьшили время выдержки в диациде. Срезанные листья промывали водой, затем мыльным раствором, споласкивали несколько раз дистиллятом, погружали на 30 сек. в 70% спирт, затем – в диацид на 10-30 мин, после чего промывали стерильной водой.

Изоляцию эксплантов проводили под бинокулярной лупой в стерильных условиях ламинара. Для получения апикальных меристем отрезали верхушки побегов длиной 2-3 см; апикальные и латеральные почки освобождали от покровных чешуй и подлежащих тканей; листья нарезали на сегменты размером от 0,8-1,2 x 1,0-1,6 см.

Экспланты помещали на питательную среду, содержащую макро- и микроэлементы по Мурасиге и Скугу; тиамин, пиридоксин и никотиновую кислоту по 0,5 мг/л, аскорбиновую кислоту – 1 мг/л; мезоинозит – 100 мг/л; сахарозу – 20 г/л; агар – 7 г/л; рН- 5,8-6,1. В качестве фитогормонов использовали кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП),  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК) в разных концентрациях и соотношениях.

Экспланты культивировали на свету при 14-часовом фотопериоде (t = 25+1С). Листовые диски в первые 10 дней культивирования притеняли.

Инициацию ростовых процессов фиксировали на 10-14 день культивирования. Последующий анализ проводили с интервалом в 7-10 дней на протяжении 2-4 мес. культивирования. Пассирование на свежую питательную среду аналогичного или измененного состава осуществляли каждые 10 - 15 дней.

## Результаты и обсуждение

### *Культура изолированных почек*

В первые дни культивирования наблюдали интенсивное почернение как тканей экспланта, так и питательной среды. Согласно литературным данным (Катаева, 1986), в основе этого процесса лежит активный синтез эксплантом веществ фенольной природы, которые вызывают потемнение тканей, снижают жизнеспособность, замедляют рост и развитие и приводят, в конечном итоге, к гибели культур. Для нейтрализации данного явления используют различные варианты предварительной обработки экспланта: введение в питательную среду антиоксидантов (аскорбиновой кислоты, пролина, поливинилпирролидона), частое пассирование (Джонс, 1987; Катаева, 1986). В нашей работе добавление аскорбиновой кислоты в питательную среду (1 мг/л) оказалось менее результативным, чем частое неоднократное пассирование (3-5 пассажей) на свежие питательные среды аналогичного состава.

Наиболее интенсивно синтезировали фенольные соединения почки, менее – листья и верхушки побегов.

Культивирование изолированных почек на питательной среде без гормонов приводило к почернению и гибели эксплантов на 7-10 день культивирования. Добавление фитогормонов в питательную среду положительным образом повлияло на состояние эксплантов: спустя 5-7 дней после инокуляции начинался рост культур. Почки увеличивались в размерах, листовые примордии вытягивались, образуя листовые пластинки, и зеленели. В отдельных случаях листовые пластинки разрастались, образуя листочки типичной для скумпии овальной формы.

Первичная инициация культур и положительная динамика роста были отмечены во всех изученных вариантах. При культивировании на питательной среде, содержащей 0,5 мг/л БАП, в результате активации и интенсивного роста пазушных меристем формировалась типичная розетка из множества мелких зеленых листочков треугольной формы (Рис.а).

Междоузлия развивающихся побегов были сближены и в процессе дальнейшего культивирования так и не вытянулись. Ширина основания розетки в 1,5-2 раза превышала ее высоту, поэтому визуально данный тип роста мы определили как «рост вширь».

В единичных случаях на данной среде наблюдали прямое развитие одиночного побега с редуцированными листьями, что, по-видимому, было обусловлено эпигенетическими особенностями экспланта.

Изначально более высокие концентрации БАП (2,5 или 5 мг/л) в среде не приводили к увеличению коэффициента размножения. Только в этих вариантах отмечали ярко выраженную витрификацию тканей экспланта.

Одновременное наличие в питательной среде БАП и кинетина (1:1) вызывало интенсивный рост экспланта, определяемый как «рост вверх» (соотношение высоты к ширине в среднем 2,5:1). В большинстве случаев наблюдали рост одиночного крупного побега интенсивной зеленой окраски; с вытянутыми узкими листьями, плотно обхватывающими побег. Реже фиксировали рост нескольких укороченных побегов, не таких мощных и

крупных, но также имеющих ярко-зеленую окраску без некротизирующих участков. При дальнейшем культивировании эти различия выравнивались; в случаях преимущественного роста одиночного побега активизировались пазушные меристемы, образуя новые зоны роста, в результате чего формировалась розетка, а в случаях одновременного роста нескольких побегов – преимущественно развивались 2-3 побега.

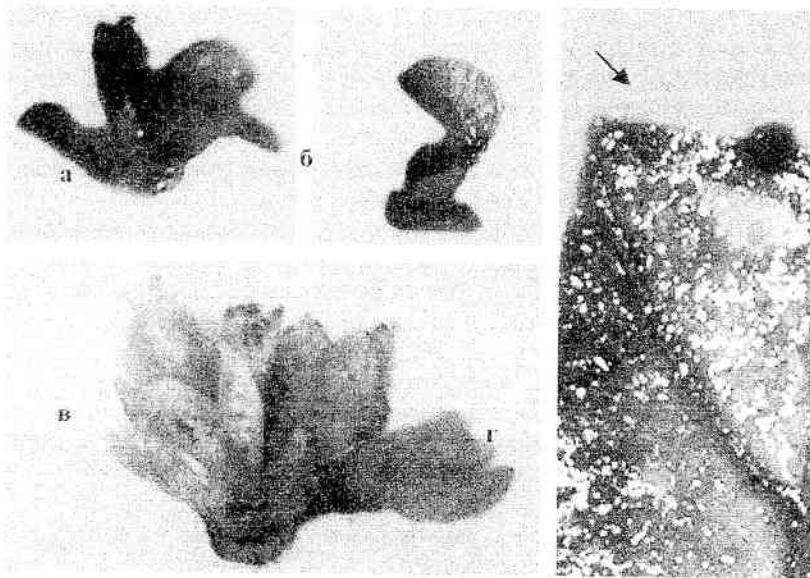


Рис. Различные типы морфогенеза в культуре соматических тканей скумпии  
 а – листовая розетка, образовавшаяся из вегетативной почки на среде MS, БАП 0,5 мг/л.  
 б – почка с развернувшимися листочками на среде MS, БАП 1,0 мг/л, НУК 0,5 мг/л.  
 в – новые апикальные меристемы, развившиеся в результате пассирования первичных розеток на среду MS, БАП 2,5 мг/л.  
 г – глобулярная структура, сформировавшаяся из кромки листового диска на среде MS, БАП 1,0 мг/л, НУК 0,1 мг/л.

При культивировании почек на питательной среде, содержащей БАП и НУК (1,0 и 0,1 мг/л) в первые 2-3 недели наблюдали только незначительное увеличение размеров экспланта. Затем начинался стремительный рост витрифицированных и аномальных листьев – узких и длинных (до 10 мм), волнисто-изогнутых, буро-коричневых. Образованная розетка по форме напоминала морскую звезду. Дальнейшее субкультивирование в течение 4 месяцев не изменило размеры или форму розетки и только поддерживало существование культур без качественных изменений.

Рост и развитие почек на среде, содержащей одновременно 1,0 мг/л БАП и 0,5 мг/л НУК, в целом было аналогично таковому на среде, содержащей только 0,5 мг/л БАП. Отличия проявились в более высокой интенсивности

ростовых процессов, а также – в развитии более крупных, округлых листьев. Это был единственный вариант, где листья имели типичную для скумпии обратнуюйцевидную форму (Рис.б). Наряду с этим ткани характеризовались оводненностью и рыхлостью структуры, быстрее некротизировали. Все это осложняло культивирование, так как при пассировании рыхлые ткани легко распадались на отдельные нежизнеспособные куски.

Кинетин в концентрации 1 мг/л вызывал незначительное увеличение размеров экспланта и появление зеленой окраски в первые две недели культивирования. Эксплант имел вид небольшого зеленого конуса с участками некротизирующей ткани. Затем развитие остановилось, а в процессе дальнейшего культивирования экспланты либо не развивались вовсе, либо погибали.

Как правило, длительное субкультивирование на средах аналогичного состава в большинстве изученных вариантов приводило к прекращению роста и появлению витрификации или некроза культур.

Часть первичных культур, полученных в нулевом пассаже, была перенесена на среды измененного гормонального состава. Наиболее интересными оказались варианты, в которых возрастала концентрация цитокининов. При увеличении концентрации БАП с 0,5 до 2,5 мг/л формировались новые зоны роста (Рис.в). Добавление к БАП (0,5 мг/л) кинетина (0,5 мг/л) также приводило к появлению новых зон роста и, одновременно с этим, к увеличению размеров листовых пластинок. Таким образом, в обоих вариантах удалось достигнуть следующего, после инициации, этапа микроклональной технологий – собственно микроразмножения. Следует отметить, что в данных экспериментальных условиях небольшие размеры побегов ограничивали последующие манипуляции с ними, что, по-видимому, потребует изучения и применения дополнительных приемов, стимулирующих рост и развитие микроробегов.

### *Культура листовых дисков*

Растительный материал (листья) брали как от «взрослого» 10-летнего дерева, так и от однолетних саженцев в стадии активного роста. В процессе последующего культивирования было выявлено, что возраст растения-донора влияет на скорость протекания морфогенетических процессов. Экспланты, полученные от однолетних саженцев, продуцировали структуры на 10-14 дней раньше, чем взятые от 10-летнего дерева. Не выявлено достоверной связи между временем инициации культур и регенерацией.

Для индукции морфогенеза использовали БАП, НУК и кинетин в разных концентрациях и соотношениях. Почти во всех изученных вариантах наблюдали быструю и ярко выраженную дегенерацию эксплантов. Листовые диски теряли естественную зеленую окраску, бурели или чернели, покрывались каплями конденсата и на 7-10 день окончательно некротизировали. Только в двух вариантах: (1) БАП, 1,0 мг/л, + НУК, 0,1 мг/л, и (2) БАП, 0,5 мг/л, + кинетин, 0,5 мг/л, первоначальная темно-зеленая окраска тканей листа сохранялась неизменной. Через несколько дней культивирования на данных

средах по кромке экспланта формировался раневой каллус в виде черного гофрированного валика. В дальнейшем в зоне каллуса наблюдали возникновение меристематических зон роста и формирование небольших (1-2 мм), округлых структур светло-зеленого цвета, представлявших собой, по-видимому, адвентивные почки (Рис.г). Один регенерирующий эксплант продуцировал, как правило, 5-7 почек. Этот показатель не зависел от типа и соотношения фитогормонов в питательной среде, хотя, как известно, цитокинины в сочетании с ауксинами более эффективно индуцируют развитие почек и побегов.

Структуры были отделены от тканей экспланта и перенесены на питательные среды измененного состава, но дальнейшего развития адвентивных почек в побеги ни на одной из используемых сред мы не наблюдали. Возможно, причиной неудачи были небольшие размеры структур.

### *Культура верхушек побегов*

При культивировании *in vitro* верхушек однолетних побегов была выявлена различная чувствительность эксплантов к фитогормонам. Наличие в питательной среде кинетина (0,5 или 1,0 мг/л) вызывало появление зеленой окраски и увеличение размеров почек, однако после 2-х недель культивирования рост тормозился, листовые примордии не развивались, листья не разворачивались. Одновременно с этим наблюдали первые признаки некроза верхней части побега, а вслед за этим, спустя 3-4 недели, - общий некроз и гибель.

При культивировании верхушек побегов на питательной среде с 0,5 мг/л БАП в течение 2-3 недель формировались небольшие (до 1,5 см длиной) зеленые побеги с 3-4 листьями. БАП в указанной концентрации не снял доминирования апикальной меристемы: преимущественное развитие продемонстрировала только верхушечная почка, боковые побеги не развивались, почки лишь незначительно вытянулись. При увеличении концентрации БАП до 2,5 или 5,0 мг/л количество побегов не увеличилось, побеги удлинялись незначительно, листовые пластинки были недоразвиты и скручены в трубочку. Чем выше была концентрация БАП, тем быстрее некротизировал побег. По-видимому, для развития большого количества почек требуется не повышение, а снижение концентрации БАП в питательной среде. Косвенным подтверждением данного предположения может служить развитие эксплантов на питательной среде без регуляторов роста, когда каждая почка, включая боковые, формировала побег с 2-3 хорошо развитыми листьями.

### **Выводы**

Морфогенный потенциал всех типов эксплантов скумпии реализуется в основном в первые 2-3 недели культивирования, затем происходит быстрая дегенерация и некроз тканей экспланта.

Установлено, что определяющим индуктором морфогенеза для разных типов эксплантов скумпии является БАП. Для инициации процессов роста и

развития необходимы изначально низкие концентрации БАП в питательной среде (0,5-1,0 мг/л).

Для развития новых зон роста при культивировании почек необходимо в последующих пассажах увеличение концентрации БАП до 2,5 мг/л.

В культуре изолированных листьев органогенез реализуется через каллусогенез, а в культуре почек и верхушек побегов происходит прямая реализация органогенного потенциала почек одновременно с активацией клеток пазушной меристемы.

### Литература

Джонс О.П. Размножение хозяйственно-важных древесных растений *in vitro* // Биотехнология сельскохозяйственных растений, Москва, 1987, С. 139-154.

Катаева Н.В. Особенности микроразмножения трудноукореняемых сортов яблони // Сельскохозяйственная биология. 1986. №4. С.18-23

Колесников А.И. Декоративная дендрология. М., 1974. 517 с.

УДК 575.224.234; 581.48

## ОСОБЕННОСТИ СЕМЕННОЙ РЕПРОДУКЦИИ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ПОЛУЧЕННЫХ ГЕНОМНЫХ И ХРОМОСОМНЫХ МУТАНТОВ *NICOTIANA TABACUM L.*

О.Л. Госенова, Ю.В. Евсеева

*Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, г. Саратов*

Вид *Nicotiana tabacum L.* является естественным аллополиплоидом, характеризуется высокой фертильностью и размножается исключительно половым путем. В силу ряда морфобиологических, физиологических и цитологических признаков (высокая регенерационная способность, обильное длительное цветение, крупные размеры цветков и цитозембриологических элементов, а также высокая семенная продуктивность) табак является удобным модельным объектом и широко используется во многих исследованиях (*Nicotiana...*, 1979; Шумный, 2001; Еналеева, 2003). Поскольку полиплоидия и анеуплоидия являются источником генетической изменчивости и факторами эволюции, включая эволюцию систем размножения (Грант, 1984; Otto, Whitton, 2000; Soltis et al., 2003), представляет значительный интерес получение и подробное изучение на модельном объекте мутаций этого типа.

Экспериментально полученные в отделе генетики и репродуктивной биологии Ботанического сада СГУ формы табака с увеличенным набором хромосом являются уникальным материалом для исследований в этих аспектах, и основная задача данной работы заключалась в анализе их некоторых репродуктивных особенностей.

### Материал и методика

Объектом исследования служили растения из самоопыленного потомства тетраплоида, полученного методом культуры тканей на основе *Dsyl* мутанта, и