

## Резюме

Досліджено вплив тидіазурона (ТДЗ) на утворення морфогенного калюсу та регенерацію пагонів м'якої пшениці. Показано, що процеси морфогенезу залежать від концентрації ТДЗ в поживному середовищі. Найбільшою частотою утворення морфогенного калюсу (94%) спостерігалась за концентрації ТДЗ 0,25 мг/л. У варіанті з концентрацією ТДЗ 0,25 мг/л, також виявлено достовірне підвищення частоти регенерації пагонів до 24%, в порівнянні з контролем, де цей показник складає 18,5%.

Исследовано влияние тидиазулона (ТДЗ) на образование морфогенного каллуса и регенерацию побегов мягкой пшеницы. Показано, что процессы морфогенеза зависят от концентрации ТДЗ в питательной среде. Наибольшую частоту образования морфогенного каллуса (94%) наблюдали при концентрации 0,25 мг/л. В варианте с концентрацией ТДЗ 0,25 мг/л, также выявлено достоверное увеличение частоты регенерации побегов до 24%, в сравнении с контролем, где этот показатель составляет 18,5%.

The effect of thidiazuron (TDZ) on formation morphogenic callus and shoot regeneration of wheat has been investigated. It is shown, that processes of morphogenesis depend at concentration of TDZ in a nutrient medium. The highest frequency of formation morphogenic callus (94%) was observed at concentration 0,25 mg/l. In the variant, with concentration TDZ 0,25 mg/l, we observed increasing of frequency shoot regeneration to 24%, in comparison with 18,5% in the control.

## БЕЛОКУРОВА В.Б.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,  
Украина, 03680, Киев-143, ул. Акад. Заболотного, 148, E-mail: iicb@iicb.kiev.ua*

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАННИТОЛА И АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ ДЛЯ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ *IN VITRO* РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА *CARYOPHYLLACEAE*

Использование методов биотехнологии, в том числе путём создания банков *in vitro*, рассматривается как важный элемент охраны биоразнообразия растений [1–5]. Уменьшить затраты материалов и труда на поддержание асептических коллекций можно за счёт использования так называемого “замедленного” роста (“slow growth”), который даёт возможность увеличить интервалы субкультивирования. Замедлить или полностью остановить рост *in vitro* можно с помощью ряда методов — снижения температуры, создания осмотического стресса или использования соединений, замедляющих рост [6]. В ряде публикаций сообщается об использовании для этой цели маннитола [2, 5–8], а также абсцизовой кислоты [9–11].

Нами начата работа по изучению возможностей использования замедленного роста для поддержания коллекции растений *in vitro*. Семейство *Caryophyllaceae* в банке представителей мировой флоры *in vitro*, созданном

в ИКБГИ, является одним из наиболее многочисленных (22 рода). Цель работы — на примере двух видов семейства *Caryophyllaceae* изучить влияние маннитола и абсцизовой кислоты на рост растений в культуре *in vitro* и подобрать оптимальные условия длительного культивирования без частых пересадок на свежие среды.

### Материалы и методы

Материалом для работы были растения *Dianthus monspessulanus* L. и *Ихоса quadrifida* (L.) Sojak. Для замедления роста *in vitro* применяли маннитол или абсцизовую кислоту. В контрольном эксперименте использовали безгормональную среду MS<sub>0</sub> с 30 г/л сахарозы [12]. Исследовали три варианта питательных сред с маннитолом, состав которых приведен в табл. 1. Концентрация маннитола варьировала от 10 до 20 г/л. Второй вариант ингибирования роста осуществляли с помощью абсцизовой кислоты (АБК). Учитывая, что в работе использовали раствор АБК в диметилсульфоксиде (ДМСО), в данном варианте опыта было два контроля — безгормональная среда MS<sub>0</sub> и среда MS<sub>КД</sub>, содержащая 5 мл/л ДМСО, для проверки, не оказывает ли ДМСО существенного влияния на темпы роста растений *in vitro*. В разных вариантах опыта использовали АБК в концентрациях от 0,1 до 10 мг/л (табл. 1).

Выборка в каждом варианте опыта составляла 10 растений. Верхушки побегов длиной 10–12 мм отрезали от исходных растений и переносили в пробирки Sigma высотой 12 см с пластиковыми крышками на среды разного состава и выращивали в условиях культуральной комнаты при 24 °С и 16-часовом фотопериоде. Оценивали эффективность укоренения (отношение числа укоренённых побегов к общему числу побегов, в %), высоту растений и коэффициент выживания при длительном культивировании без переноса на свежие среды. Статистическую обработку результатов проводили согласно стандартному методу оценки достоверности разницы между средними значениями по коэффициенту Стьюдента  $t_d$  [13].

Таблица 1

### Варианты ингибирующих обработок, использованные в экспериментах

Вариант среды	Сахароза, г/л	Маннит, г/л	ДМСО, мл/л	АБК, мг/л
MS <sub>0</sub>	30	-	-	-
MS <sub>КД</sub>	30	-	5	-
MS <sub>10</sub>	20	10	-	-
MS <sub>15</sub>	15	15	-	-
MS <sub>20</sub>	10	20	-	-
MS <sub>А01</sub>	30	-	0,01	0,1
MS <sub>А1</sub>	30	-	0,1	1,0
MS <sub>А5</sub>	30	-	0,5	5,0
MS <sub>А10</sub>	30	-	5,0	10,0

## Результаты и обсуждение

Результаты изучения влияния маннитола и абсцизовой кислоты на укоренение верхушек побегов *in vitro* представлены в табл. 2. Увеличение содержания маннитола в среде не сказывалось на сроках и эффективности укоренения побегов *D. monspessulanus*, но несколько снижало данные показатели для *I. quadrifida*. Тем не менее, и в последнем случае эффективность укоренения была достаточно высокой (90%). При использовании АБК уже в течение первого месяца укоренялось 100% побегов, за исключением варианта со средой MS<sub>A10</sub> (40%). При этом если для *D. monspessulanus* отмечали только замедление сроков укоренения, и к концу второго месяца 100% побегов формировали корни, то для *I. quadrifida* даже к концу второго месяца культивирования число укоренённых побегов было существенно ниже — 30%.

Результаты оценки средней высоты и выживания растений *in vitro* при использовании маннитола и АБК представлены в табл. 2.

Таблица 2

Средняя высота растений и коэффициент выживания при использовании различных вариантов ингибирующих обработок

Вид	Среда	1 месяц		3 месяца		6 месяцев		9 месяцев	
		Средняя высота растений	% живых растений						
<i>D. monspessulanus</i>	MS <sub>0</sub>	36,5±3,7	100,0	94,0±6,6	100,0	-	-	-	-
	MSKD	45,8±4,5	100,0	97,5±1,5	100,0	-	-	-	-
	MS <sub>10</sub>	18,3±3,1	100,0	22,3±2,5	100,0	27,6±2,9	100,0	29,2±0,6	50
	MS <sub>15</sub>	13,0±1,7	100,0	17,5±2,0	100,0	19,4±1,5	100,0	21,0±0,9	30
	MS <sub>20</sub>	12,1±0,9	100,0	14,8±1,7	100,0	16,9±1,3	100,0	17,0±0,9	30
	MS <sub>A01</sub>	21,9±4,5	100,0	65,7±8,9	100,0	-	-	-	-
	MS <sub>A1</sub>	23,0±4,5	100,0	73,4±5,9	100,0	-	-	-	-
	MS <sub>A5</sub>	13,1±1,9	100,0	70,8±9,6	100,0	-	-	-	-
	MS <sub>A10</sub>	15,5±3,4	100,0	72,5±9,9	100,0	-	-	-	-
<i>I. quadrifida</i>	MS <sub>0</sub>	36,4±9,1	100,0	104,5±7,2	100,0	-	-	-	-
	MS <sub>KD</sub>	32,2±3,7	100,0	83,8±6,0	100,0	-	-	-	-
	MS <sub>10</sub>	22,5±2,1	100,0	28,8±4,1	100,0	33,6±2,3	100,0	39,4±4,8	100,0
	MS <sub>15</sub>	14,7±1,9	100,0	21,2±2,4	100,0	23,1±3,6	100,0	25,9±2,3	100,0
	MS <sub>20</sub>	11,3±0,8	100,0	13,7±1,2	100,0	19,2±1,6	100,0	20,3±1,2	70,0
	MS <sub>A01</sub>	27,1±3,7	100,0	82,9±12,2	100,0	-	-	-	-
	MS <sub>A1</sub>	20,3±3,7	100,0	74,8±9,3	100,0	-	-	-	-
	MS <sub>A5</sub>	21,5±3,4	100,0	76,8±5,4	100,0	-	-	-	-
	MS <sub>A10</sub>	18,4±3,4	100,0	33,5±5,1	100,0	не опр.	не опр.	не опр.	не опр.

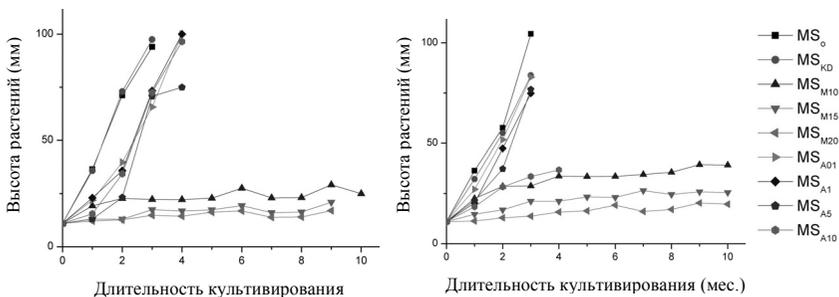


Рис. Динамика изменения средней высоты растений *D. monspessulanus* (слева) и *I. quadrifida* (справа) при длительном культивировании на средах с маннитолом и АБК

Характер изменения средней высоты растений при использовании различных ингибирующих обработок в течение 10 месяцев культивирования представлен на графиках (рис.).

Как видно из данных табл. 2 и рисунка, в контроле (MS<sub>0</sub> и MS<sub>KD</sub>) к концу третьего месяца культивирования растения обоих видов достигали максимально возможной в данных условиях высоты. При этом достоверных различий между средней высотой растений не было, т.е. ДСМО не оказывал негативного влияния на темпы роста.

Существенные различия между средней высотой растений на разных этапах культивирования наблюдали на средах с маннитолом. Уже в концентрации 10 г/л он оказывал значительное ингибирующее действие на темпы роста растений обоих видов. Так, для *D. monspessulanus* при сравнении средней высоты растений в вариантах MS<sub>0</sub> и MS<sub>10</sub> коэффициент Стьюдента  $t_d$  равнялся 6,5 в первый месяц культивирования и 17,8 на 3-й месяц; для *I. quadrifida* эти показатели составили 2,8 и 16,4, соответственно. Достоверность различий по сравнению с контролем, а также между вариантами с разным содержанием маннитола сохранялась для *I. quadrifida* на протяжении всего периода культивирования. Для *D. monspessulanus* достоверные различия по высоте растений не выявлены только в варианте MS<sub>15</sub>–MS<sub>20</sub> ( $t_d = 0,9; 0,3$  и 1,2 на 1-й, 2-й и 3-й месяц культивирования, соответственно). На поздних стадиях культивирования наблюдалось снижение коэффициента выживания. На среде MS<sub>10</sub> на 9-й месяц сохранилось 50% живых растений *D. monspessulanus*, в двух остальных вариантах — по 30% (к концу 7-го месяца этот показатель составлял 100% для всех вариантов, данные в табл. 2 не представлены). Для *I. quadrifida* на 9-й месяц культивирования коэффициент выживания составил 100%, кроме варианта MS<sub>20</sub> (70%).

Данные о влиянии АБК на темпы роста растений обоих видов *in vitro* не так однозначны. Для *D. monspessulanus* отмечены достоверные различия в высоте растений между контрольными значениями и всеми вариантами АБК, начиная с минимальной концентрации 0,1 мг/л ( $t_d = 5,2, 5,8$  и 4,8 на 1-й, 2-й и

3-й месяц культивирования, соответственно). Достоверной разницы между вариантами с АБК в минимальной (0,1 мг/л) и максимальной (10 мг/л) концентрациях не выявлено ( $t_d = 1,8; 0,7$  и  $0,8$ ). Для *I. quadrifida* также показаны достоверные различия в высоте растений в контроле и на средах с АБК, в том числе между вариантами  $MS_{A01} - MS_{A10}$  ( $t_d = 5,2; 5,8$  и  $4,8$ ). Промежуточные в отношении концентрации АБК варианты сред показывали как достоверность различий, так и её отсутствие в течение 3-х месяцев.

Несмотря на достоверность разницы в средней высоте растений по сравнению с контролем, увеличить интервал субкультивирования при использовании АБК удалось всего до 4 месяцев и только для *D. monspessulanus*. Для второго вида, *I. quadrifida*, максимальный интервал субкультивирования составил 3 мес., как и в контроле, за исключением варианта с 10 мг/л АБК, где средняя высота растений в конце 4-го месяца культивирования составляет 36,8 при 100% выживании растений. Из графика видно, что в этом варианте опыта кривая роста растений приближается к варианту  $MS_{10}$ .

Таким образом, полученные результаты согласуются с данными, приведенными в работах [2, 4, 5, 6, 7, 8] о том, что маннитол в концентрациях 1–2% может быть успешно использован *in vitro* как ретардант, позволяя увеличить интервал субкультивирования до 8–12 месяцев. Более высокие концентрации были токсичными для растений [4, 6]. Использование АБК в наших опытах не было столь же эффективным, как применение маннитола, что отличается от данных, полученных на некоторых других видах растений [9, 10], и может свидетельствовать о видоспецифичности ответа культуры.

### **Выводы**

Использование маннитола для удлинения общего срока хранения *in vitro* растений *D. monspessulanus* и *I. quadrifida* без субкультивирований оказалось более действенным, чем применение АБК, и может рассматриваться как эффективный и простой способ сохранения асептических культур этих видов в условиях минимального роста.

*Работа выполнялась в рамках проекта по поддержанию объекта национального научного достояния Украины “Коллекция зародышевой плазмы растений флоры Украины и мировой флоры”.*

### **Литература**

1. Hao Y.-J., Wen X.-P., Deng X.-X. Genetic and epigenetic evaluations of citrus callus recovered from slow-growth culture // J. Plant Physiol., 2004, v.161, 479–484.
2. Divakaran M., Babu K.N., Peter K.V. Conservation of *Vanilla* species, *in vitro* // Scientia Horticultuirae, 2006, v.110, 175–180.
3. Keller E.R.J., Senula A., Leunufna S., Grube M. Slow growth storage and cryopreservation — tools to facilitate germplasm maintenance of vegetatively propagated crops in living plant collections // International J. of Refrigeration, 2006, v.29, 411–417.
4. Renau-Morata B., Arrillaga I., Segura J. *In vitro* storage of cedar shoot cultures under minimal growth conditions // Plant Cell Reports, 2006, v.25, 636–642.
5. Gonzalves S., Romano A. *In vitro* minimum growth for conservation of *Drosophyllum lusitanicum* // Biologia Plantarum, 2007, v.51, №4, 795–798.
6. Bessembinder J.J.E., Staritsky G., Zandvoort E.A. Long-term *in vitro* storage of *Colocasia esculenta* under minimal growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, v.33, 121–127.

7. Negash A., Krens F., Schaart J., Visser B. *In vitro* conservation of enset under slow-growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, v.66, №2, 107–111.
8. Borges M., Ceiro W., Meneses S., Aguilera N., Vázquez J., Infante Z., Fonseca M. Regeneration and multiplication of *Dioscorea alata* germplasm maintained *in vitro* // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004, vol.76, №1, 87–90.
9. Watt M.P., Thokoane N.L., Mycock D., Blakeway F. *In vitro* storage of *Eucalyptus grandis* germplasm under minimal growth conditions // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000, v.61, №2, 161–164.
10. Lemos E.E.P. de Ferreira, Alencar M. de S., Ramalho Neto L.M.C., Albuquerque C.E. *In vitro* conservation of sugarcane germplasm // Pesquisa Agropecuaria Brasileira, 2002, v.37, N10, 1359–1364.
11. Gopal J., Chamail A., Sarkar D. *In vitro* production of microtubers for conservation of potato germplasm: effect of genotype, abscisic acid, and sucrose // *In vitro* — Cell Dev. Biol. — Plant, 2004, v.40, 485–490.
12. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum, 1962, v.15, 473–497.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия // М.: Высш. школа. — 1990. — 352 с.

### Резюме

Проведена сравнительная оценка влияния маннитола и абсцизовой кислоты на рост асептически культивируемых растений *D. monspessulanus* и *I. quadrifida*. Показано, что маннитол в составе питательных сред может применяться для длительного хранения растений этих видов *in vitro*.

Проведено порівняльну оцінку впливу манітолу та абсцизової кислоти на ріст асептично культивованих рослин *D. monspessulanus* и *I. quadrifida*. Показано, що манітол у складі живильних середовищ може застосовуватись для тривалого зберігання рослин цих видів *in vitro*.

Comparative study of the influence of mannitol and abscisic acid on the growth of aseptically cultured *D. monspessulanus* and *I. quadrifida* plants has been carried out. Culture media supplied with mannitol can be used for long-term *in vitro* conservation of plants of both species.

**ВЛАСОВ В.Г., САВЕНКО Е.Г.**

ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт риса  
Россия, г. Краснодар, 350921, н/о Белозерное, E-mail: arrri\_kub@mail.ru

## ЦИТОЛОГО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ АНДРОКЛИННОГО КАЛЛУСА РИСА В ОНТОГЕНЕЗЕ

Культивирование пыльников связано с реализацией таких путей морфогенеза *in vitro*, как эмбриоидогенез и каллусогенез. При каллусогенезе инициальная клетка — микроспора сначала формирует недифференцированный каллус. После переноса на регенерационные питательные среды в каллусе отмечаются различные морфогенетические процессы.