



УДК 633.66: 34.31.33

ОСОБЕННОСТИ КАЛЛУСОГЕНЕЗА И РЕГЕНЕРАЦИИ *STEVIA REBAUDIANA* (BERTONI) В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

**Е.О. Колесникова,
Т.П. Жужжалова**

Всероссийский научно-исследовательский институт сахарной свеклы имени А.Л. Мазлумова,
Россия, 396030, Воронежская область, пос. ВНИИСС, д.86

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Изучена возможность индукции каллусогенеза и регенерации побегов стевии из недифференцированной ткани. Показано влияние экзогенных гормонов, генотипа, эксплантов и длительности их культивирования на процессы формирования каллуса и образования микроклонов.

Ключевые слова: *Stevia rebaudiana*, культура *in vitro*, каллусогенез, регенерация, гормоны, генотип, эксплант.

Введение

Интродукция сахароносных культур с ценными пищевыми и лекарственными свойствами привлекает большое внимание в связи с ежегодным увеличением количества людей с проблемой сахарного диабета и ожирения. Наиболее перспективна в этом отношении стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni), сладость которой определяется комплексом дитерпеновых гликозидов (стевиозид, ребаудиозиды А, В, С, Д, Е и др.), содержащихся во всех надземных органах [1,2].

Успех интродукции стевии определяется способностью растений адаптироваться к новым условиям. В связи с этим необходима работа по созданию сортов с адаптивными свойствами для возделывания в ЦЧР. Стевия – преимущественно вегетативно размножаемая культура, в связи с чем ей необходима дополнительная изменчивость для формирования базы отбора. При создании селекционного материала в этом случае целесообразно применять биотехнологические методы увеличения генетического разнообразия.

Важным резервом получения исходного материала является соматическая изменчивость, спектр которой затрагивает как структуру ДНК, так и структуру кариотипа, без переноса чужеродных геномов [3]. Эта изменчивость основана на спонтанных мутациях, возникающих в выращиваемой *in vitro* каллусной ткани, из которой регенерируют растения. При этом у соматических клонов обнаруживаются варианты, превосходящие исходные сорта по хозяйственно ценным признакам [4,5]. Соматическая изменчивость даёт возможность расширить генетическое разнообразие и получить в культуре *in vitro* ценные генотипы растений, ускоряя, таким образом, селекционный процесс. В связи с этим актуальным является выявление условий, способствующих активному образованию каллуса, морфогенезу и увеличению частоты изменчивости получаемых регенерантов стевии.

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследований были использованы 4 генотипа различной пloidности из коллекции стевии: №0 (диплоид) – контроль, №19 (диплоид), №37 (триплоид), №28 (тетраплоид).

Для индукции каллусогенеза и последующей регенерации побегов было приготовлено 50 вариантов питательных сред MS (РН=5.8-6.0) с добавлением гормонов: 6-БАП, ИУК, ГК, 2,4Д в концентрациях от 0.01 до 4 мг/л в различных сочетаниях. Культивирование эксплантов проводилось на свету при 16-ти часовом фотопериоде, при температуре 23-26 °С, освещённости 5 тыс. люкс и влажности воздуха 70%.

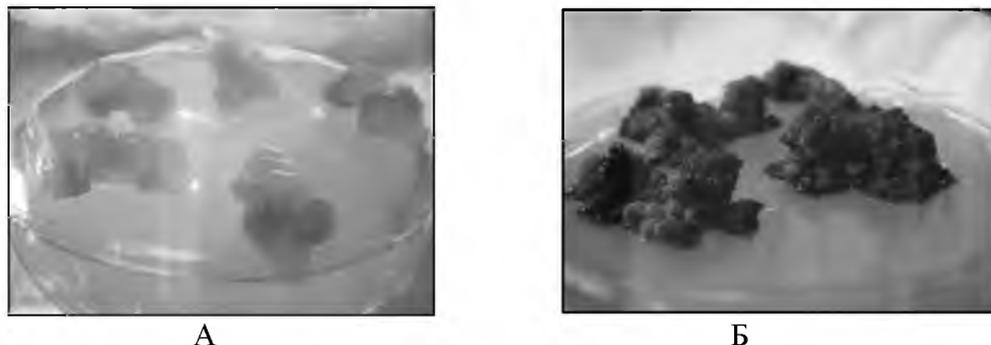
В качестве эксплантов были использованы части стебля и листа стевии. Каллусы культивировались в течение 1, 2, 3 пассажей и т. д. в течение года на одной и той же среде, а также на среде для регенерации побегов.

Опыты проводились в трёхкратной повторности по 20 эксплантов на вариант. Всего было введено более 1500 эксплантов. Математическая обработка данных была проведена по Б.А. Доспехову [6], с использованием компьютерных программ.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что лимитирующим фактором образования каллуса из специализированных клеток стевии являлось наличие в питательной среде фитогормонов, главным образом ауксинов и цитокининов. На безгормональной среде у эксплантов не наблюдалось процессов каллусогенеза и регенерации, что связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению.

Присутствие в составе питательной среды от 0,05 мг/л до 1 мг/л ауксина 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4 Д) способствовало 100%-му каллусогенезу как стеблевых, так и листовых эксплантов. Высокие концентрации 2,4 Д вызывали образование бежевых рыхлых структур, состоящих из сильно оподененных клеток, легко распадающихся на отдельные агрегаты. Со временем при старении у каллусов появлялась коричневая окраска, обусловленная накоплением в них фенолов (рис. 1).



А
Б
Рис. 1. Неморфогенный каллус стевии: А – через 3 месяца; Б – через 7 месяцев культивирования

На среде, содержащей 0,5 мг/л 2,4 Д происходило образование светлого каллуса средней плотности с зелёными меристематическими очагами (рис. 2), из 18,8% которых регенерировали витрифицированные побеги (по 2 шт.).

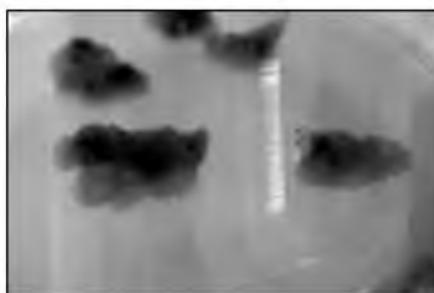


Рис. 2. Каллус с морфогенными очагами на питательной среде, включающей 2,4 Д

Низкая концентрация 2,4 Д (0,05 мг/л) вызывала в культуре каллусных тканей корневой органогенез с частотой 25,0 %.

При добавлении в питательную среду только цитокинина 6-бензиламинопурина (6-БАП) в концентрации от 0,2 мг/л до 1 мг/л частота каллусообразования и регенерации (чаще прямой) составила лишь 12,5-18,8%. Объём каллусов превышал размер исходных эксплантов не более чем в 2 раза. Это свидетельствовало о том, что эндогенного уровня ауксинов стебля и листа стевии оказалось не достаточно для эффективного образования неорганизованной пролиферирующей ткани.

Введение в среду с цитокинином ауксина (3-индолиуксусной кислоты) в соотношении 1:1 вызывало 100% образование зелёного каллуса, имеющего плотную глобулярную структуру, развивающегося со средней интенсивностью. Регенерация при этом происходила редко (18,8%). При соотношении данных гормонов 1:3, частота регенерации увеличивалась до 39,0%. Высокие концентрации ИУК (2-4 мг/л) вызывали при 100%-м каллусогенезе прекращение регенерации побегов.

На данном этапе исследований наиболее эффективной питательной средой для 100%-го образования каллуса, склонного к морфогенезу, оказалась среда №27, включающая ауксин,



цитокинин и гиббереллин в невысоких концентрациях. Неорганизованная масса клеток при этом была компактной, имела зелёный цвет и мелкоглобулярную структуру. Регенерация происходила с частотой 53.7 % (рис. 3).



А
Б
Рис. 3. Формирование на среде № 27 калусных структур (А) и микроклонов из каллуса стевии (Б)

Положительное влияние гиббереллина на образование морфогенного каллуса, способного к регенерации, очевидно связано со способностью этого вещества стимулировать рост зачатков стебля [7].

При использовании на среде №27 в качестве эксплантов верхней части стебля, у стевии наблюдался 100% каллусогенез и максимальный процент регенерации, что согласуется с литературными данными о том, что формирование калусной ткани и успешную регенерацию растений можно получать из различных вегетативных органов, являющихся меристематически активными [8]. При культивировании средней части стебля каллусогенез происходил на 40%, а регенерация – на 33.7% реже, чем из верхней части. У эксплантов из нижней части стебля каллусогенез составил лишь 20%, а регенерации не наблюдалось вообще (рис. 4).

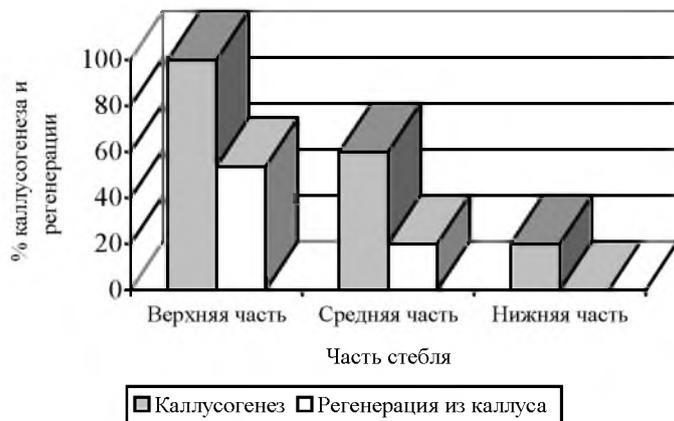


Рис. 4. Каллусогенез и регенерация стевии в зависимости от экспланта
НСР05(каллусогенез)=6,5; НСР05(регенерация)=8,9

Было установлено, что кроме состава питательной среды на процессы каллусогенеза и регенерации побегов стевии, оказывали влияние генотипические различия. Изучаемые сортообразцы формировали каллус (100 %) на средах 27, 45, 46 (рис. 5).

Однако регенерация побегов происходила по-разному. На оптимальной для регенерации побегов из каллуса питательной среде (№27) хорошие результаты показали диплоидные и триплоидные сортообразцы № 0 – 53.7%, № 19 – 53.3%, № 37 – 56.7% (стеблевые экспланты). У тетраплоидного № 28 образовали побеги только 27.5% каллусов из стеблевых эксплантов.

На питательной среде, содержащей БАП и ИМК (5:1), каллусы из стеблевых эксплантов сортообразцов №№ 0, 19 и 37 регенерировали с частотой 15%, 12.5% и 20.0%, соответственно. У № 28 на данной среде не наблюдалось образования побегов из каллусов ни у стеблевых, ни у листовых эксплантов. На среде № 45 регенерации из каллусов не наблюдалось ни у одного сортообразца.

На частоту регенерации и изменчивость микроклонов стевии также оказывала влияние длительность культивирования каллуса. При этом во время первого пассажа (3 месяца) количество

регенерирующих побегов составило 53.7%. Во втором и в третьем пассаже (5 и 7 месяцев) частота регенерации увеличивалась до 62.5%, далее каллусы переставали регенерировать (рис. 6).

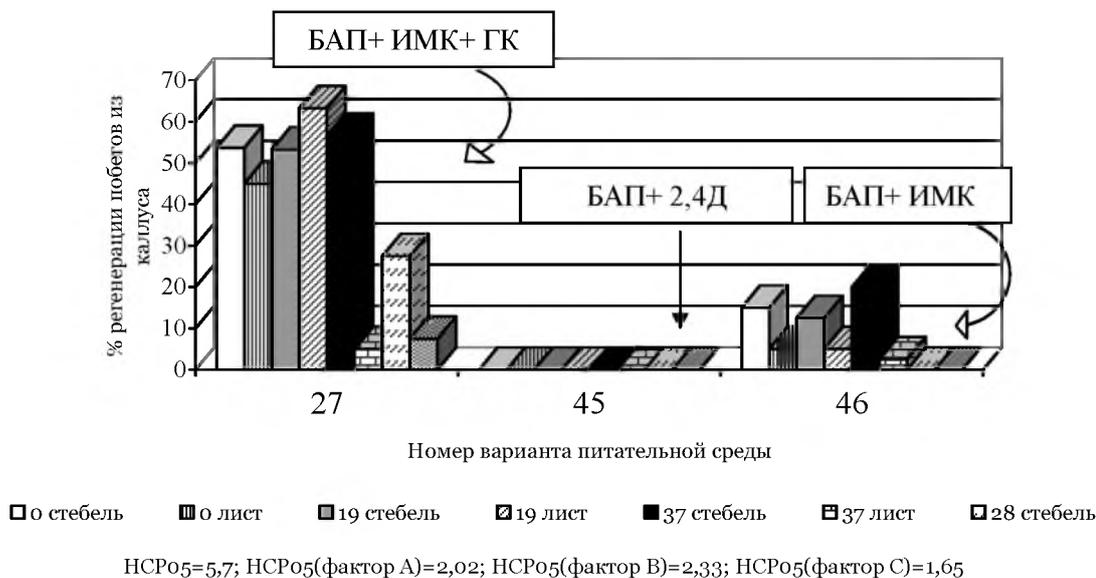


Рис. 5. Регенерация побегов из каллуса на разных питательных средах в зависимости от генотипа

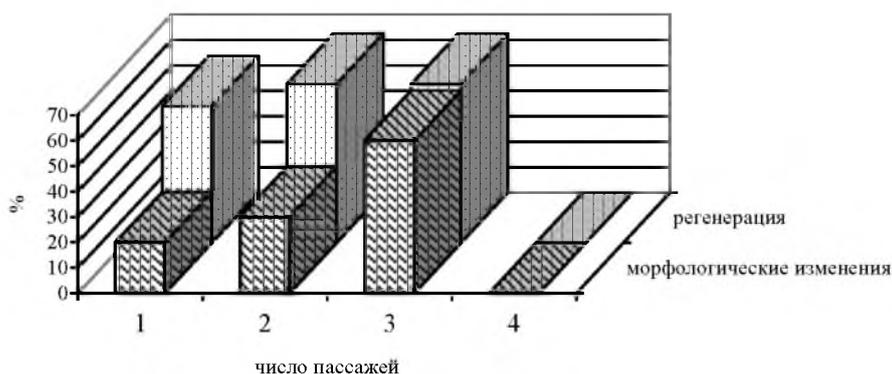


Рис. 6. Частота регенерации и количество регенерантов с видимыми изменениями в зависимости от числа пассажей

Подсчёт видимых морфологических изменений (очередное, мутовчатое листорасположение, неправильная форма или раздвоение листа) после каждого пассажа показал, что с увеличением времени культивирования каллусов увеличивалось количество изменённых растений. Так после первого пассажа наблюдалось 20 % таких растений. После второго пассажа их было 30%, а после третьего – 60% (рис. 6, 7). При этом длительное культивирование каллуса повышало частоту регенерации на 8.8% (до третьего пассажа), а частоту изменённых растений – на 10-30%.

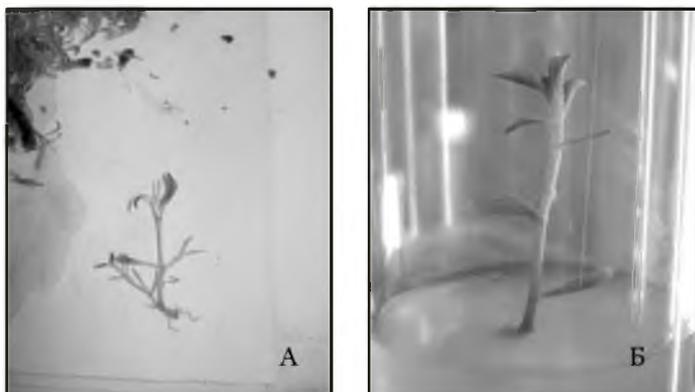


Рис. 7. Микроклоны с морфологическими изменениями:
 А – растение с неправильным листорасположением и формой листа (при черенковании),
 Б – микроклон стевии с очередным листорасположением (в пробирке)



К сожалению не все морфологические изменения окажутся результирующими. Поэтому требуется выявление в дальнейшем тех признаков, которые определяют продуктивность стевии.

Из полученных соматоклональных вариантов путём микроклонирования были сформированы линии, отличающиеся наибольшей интенсивностью роста и развития. Они подлежат изучению по количеству ядерной ДНК, оценке морфологического развития в условиях закрытого и открытого грунта, а также выявлению наследуемости изменений в последующих поколениях.

Заключение

В ходе проведённых исследований была выявлена возможность получения растений-регенерантов стевии из каллуса. Процессы каллусообразования и регенерации определялись качественным и количественным содержанием гормонов в питательной среде, генотипом, типом эксплантов и длительностью их культивирования. Состав питательной среды, включающий MS-основу и гормоны 6-БАП, ИМК и ГК, при культивировании эксплантов из верхней части стебля в течение 2-3-х пассажей обеспечивали 100 %-ный каллусогенез и максимальную частоту регенерации стевии.

Для увеличения генетической изменчивости соматоклонов стевии необходимо продолжать работу по подбору оптимальных факторов, способствующих повышению эффективности образования морфогенного каллуса, склонного к регенерации в течение нескольких пассажей.

Список литературы

1. Frohne D. Systematik des Pflanzenreichs / D. Frohne, U. Jensen. – Stuttgart, 1992. – 25.
2. Tanaka O. Chemistry of *Stevia rebaudiana* Bertoni – New source of natural sweeteners // Resent Adv. Nat. Prod. Res. – 1980. – Vol. 1. – P. 111–119.
3. Расторгуев С.Л. Изменчивость растений-регенерантов земляники, полученных методом тканевых культур // Вопросы современной науки и практики. Университет им. В.И. Вернадского. – 2008. – №1(11), Том 2. – С. 46 – 47.
4. Чеченева Т.Н. Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений // Физиология и биохимия культурных растений. – 2006. – 38, №2. – С. 163-171.
5. Щербатенко И.С. Биотехнологические методы конструирования и отбора вирусоустойчивых форм растений // Микробиологический журнал. – 1993. – Т. 55, №1. – С. 89-101.
6. Доспехов Б.А. Методика полевого опыта. – М.: МГУ. – 1985. – 268 с.
7. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Высш. шк., 1998. – 416 с.
8. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. – Киев: Наукова думка, 1990. 280 с.

PECULIARITIES OF *STEVIA REBAUDIANA* (BERTONI) CALLUS FORMATION AND REGENERATION UNDER *IN VITRO* CULTURE

**E.O. Kolesnikova,
T.P. Zhuzhzhhalova**

The A.L. Mazlumov All-Russian Research Institute of Sugar Beet, Ramon,
86, Voronezh Region, 396030, Russia

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Possibility of inducing callus formation and regeneration of shoots from undifferentiated tissue in stevia has been studied. Influence of exogenous hormones, genotype, explants and duration of their cultivation on the processes of callus formation and development of microclones is shown.

Key words: *Stevia rebaudiana*, *in vitro* culture, callus formation, regeneration, hormones, genotype, explant.