

УДК 581.143.6

М.В. Скапцов, М.Г. Куцев

*Южно-Сибирский ботанический сад
Алтайского государственного университета (г. Барнаул)*

ВЛИЯНИЕ 24-ЭПИБРАССИНОЛИДА НА ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЩАВЕЛЯ (*Rumex acetosa L.*) *in vitro*

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ
(проект № 14.В37.21.0110).

*Изучено влияние 24-эпибрассинолида на повышение устойчивости регенерантов щавеля кислого (*Rumex acetosa L.*) в периоды доращивания и акклиматизации с последующим переносом в тепличные условия. Исследована возможность продолжительного культивирования без смены питательной среды (Мурасиге – Скуга), а также выживаемость регенерантов в период акклиматизации. Установлено оптимальное соотношение регуляторов роста для каллусогенеза, геммагенеза и ризогенеза. Для доращивания использовали питательную среду $\frac{1}{4}$ MS с внесением 24-эпибрассинолида в концентрациях 0,1; 0,5; 1 мг/л. Установлено, что 24-эпибрассинолид в концентрации 0,5 мг/л увеличивает продолжительность культивирования регенерантов без смены питательной среды в 2 раза, по сравнению с контролем. Для акклиматизации регенеранты пересаживали в песчано-торфяную смесь (1:1) с поливом раствором 24-эпибрассинолида в концентрации 0,5 мг/л. Выявлено снижение гибели регенерантов в 2 раза, по сравнению с контролем.*

Ключевые слова: *эксплант; каллус; микрклональное размножение; акклиматизация; 24-эпибрассинолид; щавель (*Rumex acetosa L.*).*

Введение

В связи с развитием биотехнологии растений стало возможным производить большое количество безвирусных культур растений, как декоративных, так и сельскохозяйственных. Конечной стадией биотехнологического процесса является доращивание регенерантов растений на твердой питательной среде, затем в грунте или на жидких средах в гидропонной установке. При этом возможны значительные потери регенерантов при перенесении в грунт, особенно при производстве в больших масштабах. В зависимости от используемых составов для доращивания, а также видов растений гибель регенерантов составляет от 10 до 80% [1–3]. Снижение влияния данного явления способно увеличить эффективность биотехнологического процесса.

Возможным способом снижения данного явления является внесение в питательные среды и обработка регенерантов регуляторами роста, особенно фитостероидами (брассинолидами). Отмечено положительное действие

фитостероидов на общий гормональный фон растений, устойчивость к засолению, засухе и некоторым другим неблагоприятным условиям [4–9].

Предполагается, что внесение 24-эпибрассинолида в питательные среды и грунт при акклиматизации позволит снизить процент гибели регенерантов, особенно при конечных стадиях дорастивания и первых стадиях переноса в грунт, тем самым позволяя укрепить корневую, листостебельную и другие системы организма регенеранта.

Материалы и методики исследования

Культивирование *in vitro* изолированных тканей и органов растений осуществляли согласно общепринятым рекомендациям с вариациями [10]. На различных этапах экспериментальной работы использовали минеральную основу питательных сред по прописи Мурасиге – Скуга (MS) с добавлением 30 г/л сахарозы, 100 мг/л мезоинозитола (SigmaAldrich, GmbH), 3 г/л фитагеля (SigmaAldrich, GmbH) [11]. Поверхностную стерилизацию листьев проводили в течение 15 мин в 0,5%-ном растворе гипохлорита натрия [12]. В качестве исходного материала для индукции каллусогенеза была использована область по периферии центральной жилки листа *Rumex acetosa* L., которую делили на фрагменты и помещали на питательные среды.

Для индукции и поддержания каллусогенеза экспланты культивировали на твердой питательной среде MS с добавлением ауксинов и цитокининов в различных концентрациях и сочетаниях: бензиладенин-6 (БА) (SigmaAldrich, GmbH), α -нафтилуксусная кислота (НУК) (SigmaAldrich, GmbH), дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) (SigmaAldrich, GmbH), 4-амино-3,5,6-трихлорпиколиновая кислота (АТХП) (SigmaAldrich, GmbH). Каллусогенез индуцировали при различных сочетаниях регуляторов роста, в условиях затемненности, при температуре 25°C. Субкультивирование осуществляли через 14 сут до появления белого плотного каллуса. После этого каллусы пассировали на те же питательные среды и переносили в климатическую камеру КС-200 (ОАО «Смоленское СКТБ СПУ», Россия) с фотопериодом день (8 ч) : ночь (16 ч) и температурой 23°C и культивировали до появления побегов.

Полученные побеги срезали и переносили на питательную среду $\frac{1}{2}$ MS, содержащую 0,25 мг/л НУК с целью индукции ризогенеза. После достижения достаточного уровня развития корневой системы регенеранты пассировали на питательную среду $\frac{1}{4}$ MS для дорастивания, содержащую 0 (контроль); 0,1; 0,5; 1 мг/л 24-эпибрассинолида. Регенеранты культивировали в климатической камере без смены питательной среды в течение 1–4 мес. Параллельно проводили эксперимент по внесению 24-эпибрассинолида в питательные среды на конечных стадиях дорастивания. После дорастивания регенеранты пересаживали в грунт (песок:торф – 1:1) и переносили в тепличные условия. Полив производили раствором 24-эпибрассинолида в концентрации 0 (контроль); 0,1; 0,5; 1 мг/л в течение недели.

Данные о выживаемости регенерантов, полученные в ходе экспериментов, обрабатывали с помощью программы StatSoft STATISTIKA .6.0.

Результаты исследования и обсуждение

Значительное влияние на длительное поддержание активно пролиферирующей культуры *in vitro* оказывает оптимальное соотношение регуляторов роста. Как показали результаты наших исследований, темпы роста каллусов *R. acetosa* L. значительно выше при концентрациях 1 мг/л БА и 2 мг/л НУК. После переноса в условия фотопериода в течение 2–4 недель наблюдалось побегообразование. После переноса на питательную среду $\frac{1}{2}$ MS, содержащую 0,25 мг/л НУК, наблюдался ризогенез. Дорастивание проводили при тех же условиях на питательной среде $\frac{1}{4}$ MS без гормонов (рис. 1, А–Г).

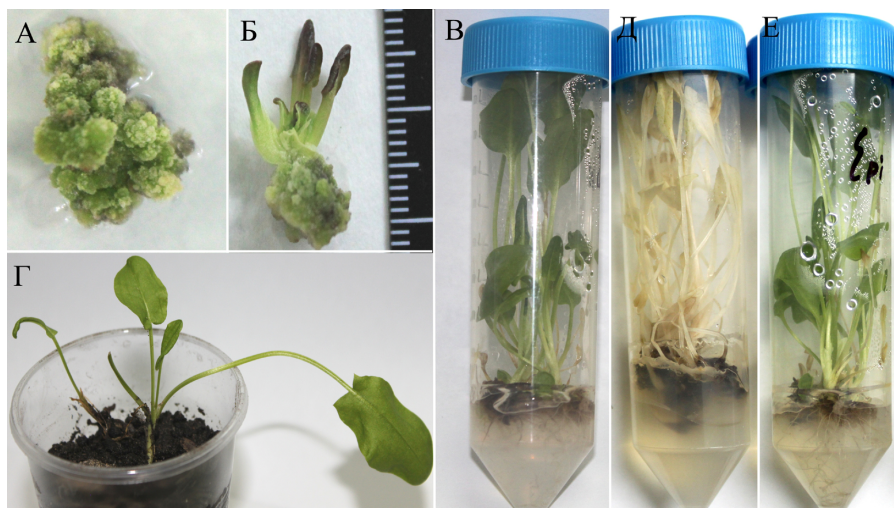


Рис. 1. Микрোকлональное размножение *R. acetosa* L. *in vitro*: А – каллусогенез; Б – геммагенез; В – ризогенез и дорастивание; Г – акклиматизация; Д – дорастивание в течение 1,5 мес. без смены питательной среды; Е – дорастивание в течение 3 мес. без смены питательной среды в присутствии 24-эпибрассинолида

При внесении 24-эпибрассинолида в питательную среду на стадии дорастивания наблюдалось увеличение возможного срока культивирования в 2 раза без смены питательной среды, тогда как культивирование контрольных экземпляров без внесения 24-эпибрассинолида невозможно более 1–1,5 мес. вследствие гибели последних (рис. 1, Д, Е).

Внесение 24-эпибрассинолида на конечных стадиях дорастивания, а также полив регенерантов на стадии акклиматизации раствором 24-эпибрассинолида позволяли снизить процентное соотношение погибших регенерантов. В результате переноса в условия окружающей среды наблюдалось снижение процента гибели регенерантов в два раза (таблица).

**Влияние 24-эпибрасинолида на эффективность акклиматизации
регенерантов *R. acetosa* L.**

Концентрация 24-эпибрасинолида, мг/л	Среднее значение гибели регенерантов и относительная ошибка среднего значения, %	Коэффициент вариации, %
0,0	19,9 ± 0,67	0,10
0,1	16,9 ± 0,69	0,13
0,5	10,1 ± 0,35	0,10
1,0	11,4 ± 0,62	0,16

Заключение

Внесение в питательные среды 24-эпибрасинолида при микроклональном размножении *R. acetosa* L. способствовало снижению гибели эксплантов и увеличению сроков культивирования регенерантов без смены питательной среды. При дорацивании у регенерантов, выращиваемых без 24-эпибрасинолида, на начальных стадиях наблюдалось более активное развитие листостебельной части, тогда как различий в развитии корневой системы не наблюдалось. Предполагается, что повышение устойчивости на начальных стадиях акклиматизации связано со снижением темпов развития «зеленой» части и перехода от резких ростовых процессов к усилению общего развития.

Литература

1. Bhatt I.D., Dhar U. Factors controlling micropropagation of *Myrica esculenta* Buch. Ham. ex D. Don: a high value wild edible of Kumaun Himalaya // African Journal of Biotechnology. 2004. Vol. 3, № 10. P. 534–540.
2. Nas M.N. Improved rooting and acclimatization of micropropagated hazelnut shoots // Hort-Science. 2004. Vol. 39, № 7. P. 1688–1690.
3. Gutierrez I.E.M., Nepomuceno C.F., Ledo C.A.S., Santana J.R.F. Micropropagation and acclimatization of *Bauhinia cheilantha* (an important medicinal plant) // African Journal of Biotechnology. 2011. Vol. 10, № 8. P. 1353–1358.
4. Budiarto K. Micro propagation of several potted *Anthurium* accessions using spathe explants // Jurnal Natur Indonesia. 2008. Vol. 11, № 1. P. 59–63.
5. Mariani T.S., Fitriani A., Teixeira da Silva J.A. et al. Micropropagation of *Aglaonema* using axillary shoot explants // International Journal of Basic & Applied Sciences IJBAS-IJENS. 2011. Vol. 11, № 01. P. 46–53.
6. Khan S., Naseeb S. and Ali K. Callus induction, plant regeneration and acclimatization of African violet (*Saintpaulia ionantha*) using leaves as explants // Pakistan Journal of Botany. 2007. Vol. 39, № 4. P. 1263–1268.
7. Qayyum B., Shahbaz M. and Akram N.A. Interactive effect of foliar application of 24-epibrassinolide and root zone salinity on morpho-physiological attributes of wheat (*Triticum aestivum* L.) // International Journal of Agricultural and Biological Engineering. 2007. Vol. 9, № 4. P. 584–589.
8. Houimli S.I.M., Denden M., Hadj S.B. Induction of salt tolerance in pepper (*Capsicum annum*) by 24-epibrassinolide // EurAsian Journal of BioSciences. 2008. Vol. 2. P. 83–90.
9. Ефимова М.В., Мануйлова А.В., Малофий М.К. и др. Влияние брассиностероидов на формирование защитных реакций проростков рапса в условиях засоления // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. Т. 21, № 1. С. 118–128.

10. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе : учеб. пособие. М. : ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Plant Physiology*. 1962. Vol. 15, № 13. P. 473–497.
12. Stewart C.N.J. *Plant biotechnology and genetics : Principles, techniques and applications*. New Jersey : John Wiley & Sons, 2008. 352 p.

Поступила в редакцию 07.04.2013 г.

Tomsk State University Journal of Biology. 2013. № 2 (22). P. 52–56

Mikhail V. Skaptsov, Maxim G. Kutsev

South-Siberian Botanical Garden of Altai State University, Barnaul, Russia

EFFECT OF 24-EPIBRASSINOLIDE ON DURATION OF SORREL (*Rumex acetosa* L.) CULTIVATION *in vitro*

*In this study there was used 24-epibrassinolide – plant steroid hormone, responsible for the physiological response of plants to various environmental stresses. The effect of 24-epibrassinolide on the improvement of the sustainability of regenerates during completion of growing and acclimatization and then its transfer to greenhouse conditions were studied. We investigated the possibility of a prolonged cultivation without changing the medium, as well as the survival of regenerates during acclimatization. For research, sorrel (*Rumex acetosa* L.) was introduced into the culture *in vitro* by using the MS medium, with the addition of 30 g/l of sucrose, 100 mg/l of mesoinozitol and 3 g/l of phytigel. We used standard methods of cultivation with modifications. Benzyladenine-6 and α -naphthaleneacetic acids were used as growth regulators. The optimum ratio of growth regulators for callus formation, gemmagenesis and rhizogenesis was found. Culture medium ¼ MS was used for completion of growing with the addition of 24-epibrassinolide at concentrations of 0.1, 0.5, and 1 mg/l. It was found that the 24-epibrassinolide at 0.5 mg/L increased the duration of regenerates' cultivation, without changing the culture medium, 2 times, as compared to control. Regenerates cultivated without adding 24-epibrassinolide in solid ¼ MS medium died after 1–1.5 months of cultivation. For acclimatization, regenerates were transferred into sand and peat mixture (1:1) in greenhouse conditions with watering by 24-epibrassinolide solution in concentration of 0.5 mg/l. Watering was applied during a week. The cases of death of regenerates decreased 2 times as compared to control. It was found that it was possible to extend the period of cultivation, and reduce the degree of death of regenerates almost two-fold, provided 24-epibrassinolide was introduced in culture media, starting from the stage of regeneration, rooting and acclimatization at a concentration of 0.5 mg/l. The specimens grown with the addition of 24-epibrassinolide are characterized by lower level of development of the leafy part. Characteristically, this phenomenon is often observed at plant species in a stress situation. Root system reduction was not recorded. This phenomenon is supposed to be one of the reasons why the death of regenerates decreased in the period of acclimatization.*

Key words: *explant; calli; microclonal propagation; acclimatization; 24-epibrassinolide; sorrel (*Rumex acetosa* L.).*

Received April 7, 2013