

УДК 581.143.5

ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАЦИИ РАСТЕНИЙ *SOLANUM CHILENSE* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* ПРИ РАЗЛИЧНОМ СВЕТОДИОДНОМ ОСВЕЩЕНИИ

Т.В. Никонович, М.И. Усенко, И.Е. Баева

Белорусская государственная сельскохозяйственная академия, Горки, Беларусь

В статье представлены результаты оценки регенерационного процесса из изолированных тканей семядолей *Solanum chilense* в условиях *in vitro* при различном светодиодном освещении. Установлено, что формирование побегов из соматических клеток исходного экспланта в культуре *in vitro* в значительной степени индуцируют не только регуляторы роста, входящие в искусственную питательную среду, но и спектральный состав света. Определены варианты освещения, позволяющие с относительно высокой частотой (119,0; 342,9 %) вызывать процессы регенерации побегов в культуре тканей семядолей *Solanum chilense*. Это светодиодные светильники, у которых спектральное соотношение R/B составляет 1,3; 3,1 и 19,7; а соотношение FR/R – соответственно 0,14; 0,12; 0,24. Значительный интерес для получения растений-регенерантов представляют светодиоды зеленого цвета, которые совместно с регуляторами роста в составе питательной среды вызвали формирование побегов высотой в среднем 4,1 см, более чем с четырьмя листьями и частотой стеблевого органогенеза 85,7%.

Ключевые слова: томат, *Solanum chilense*, регенерация, *in vitro*, светодиодное освещение.

Культура клеток высших растений является уникальной биологической системой и может рассматриваться в качестве инструмента для физиолого-биохимических, генетических и биотехнологических исследований. Популяции растительных клеток в регулируемых условиях характеризуются рядом специфических особенностей, за счет которых изолированные клеточные культуры представляют собой экспериментальную модель. Важным свойством соматических клеток является их способность к регенерации (лат. *regeneratio* – восстановление, возрождение), то есть к возобновлению деления, дифференциации, в результате чего формируются отдельные ткани, органы или целый растительный организм. В этом проявляется свойство тотипотентности растительных клеток (лат. *totus* – весь, целый и *potentia* – сила), как способности полностью реализовать генетическую программу развития с образованием целого организма и является одной из примечательных особенностей культивируемых клеток растений. В основе тотипотентности лежит омнипотентность ядра или полное сохранение генетической программы развития, что позволяет надеяться на возможность индуцирования активности тех генов, которые отвечают за переход в меристематическое состояние с последующей дифференцировкой стеблевого или корневого апексов, или эмбрионной структуры, формирование и развитие которой приводит к образованию растения-регенеранта [1, с. 272].

В настоящее время актуальным является выявление генотипов растений, обладающих повышенным регенерационным потенциалом, а также определение условий *in vitro*, стимулирующих проявление восстановительных способностей растительными клетками. Для определения физических факторов, вызывающих реализацию тотипотентности культивируемыми *in vitro* соматическими клетками перспективным направлением, является использование установок на основе света искусственных диодов. Обладая низким энергопотреблением, светодиодные светильники позволяют сократить расходы на освещение. Многообразие световых решений создает определенный спектр света, как для конкретной культуры, так и для конкретного регенерационного процесса. Следовательно, оптимизация освещения для успешного морфогенеза и регенерации растений в условиях *in vitro* требует тщательных исследований, результаты которых позволят получать желаемый результат с минимальным количеством в составе искусственной питательной среды регуляторов роста или совсем без них [4, 5].

Работа с дикими видами томата в культуре *in vitro* направлена на изучение особенностей их регенерации в контролируемых условиях, что позволит включать данные объекты в программы клеточной селекции по улучшению комплекса ценных признаков и свойств растений. Одним из подходов, решающих эти задачи, является анализ происхождения и биологических особенностей диких видов томата, с целью создания оптимальных контролируемых условий для реализации ими регенерационного потенциала. Вид диких томатов *Solanum chilense* относится к семейству пасленовых (рис.1).



Рисунок 1. Внешний вид растения и плодов томата *Solanum chilense*

Произрастает на западном склоне Анд от департамента Такна на юге Перу до севера Чили, на гиперзасушливых скалистых равнинах и прибрежных пустынях от уровня моря до 3000 м. Мощные многолетние растения, прямостоячие, переходящие в лежащие, деревянистые у основания, до 1 м высотой, до 1 м в диаметре, изредка стелющиеся в каменистых местообитаниях. Стебли диаметром у основания 8-12 мм, сероватые, густо бархатисто опушенные. Листья прерывистые, непарноперистые, 7,0-13,0 см длины, 2,5-6,5 см ширины, серовато-зеленые, бархатисто опушенные. Соцветия 6,0-20,0 см, обычно разветвленные с 20-50 цветками. Цветки имеют венчик 2,0-2,6 см в диаметре, звездчатый, ярко-желтый. Плод 1,0-1,5 см в диаметре, шаровидный, 2-5-гнездный, зеленовато-белый с пурпурными полосками по краям гнезда при созревании [6]. Примечательно, что растения *Solanum chilense* обладают определенной степенью устойчивости к факторам внешней среды, в том числе и различным патогенам, что важно для селекции. Кроме того, плоды содержат значительное количество антоцианов – это делает их хорошими донорами указанного признака [2, 3].

Целью данной работы явилось изучение влияния различного спектрального состава светодиодного освещения на регенерационные процессы в культуре изолированных тканей семядолей *Solanum chilense*.

В культуру *in vitro* вводились семена *Solanum chilense*, из которых получали проростки – источники стерильных эксплантов. Для этого плоды без механических повреждений предварительно отмывались проточной водой, затем в условиях ламинарного бокса обрабатывались 96% этанолом и поджигались. Процедура обработки спиртом и поджигания повторялась трижды. Затем плоды вскрывались и семена помещались по одному в стерильные пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга [7]. Данный метод стерилизации позволял получать 100% абсолютно чистых жизнеспособных семян. Культивирование осуществлялось при температуре +22-23°C, в условиях полной темноты. В качестве первичных эксплантов использовались фрагменты тканей семядолей. Через 10-14 дней этиолированные семядоли пересаживались на питательную среду для регенерации, в состав которой вводили экзогенные регуляторы роста: 6-бензиламинопури и индолилуксусную кислоту.

Регенерационный процесс осуществлялся в культуральном помещении с автоматическим климат контролем, где установлены экспериментальные источники светодиодного освещения. Номера вариантов светодиодных светильников обозначены порядковыми номерами, присвоенными им согласно общей нумерации, используемой в лаборатории. Вариант 4 – светодиодная лента 50 % *Red*+ 50 % *Green* с плотностью потока фотонов – $5,1 \pm 1,8$ мкмоль/($m^2 \cdot c$). Вариант 5 – светодиодная лента RT 2 – 500 12V *White* с плотностью потока фотонов – $5,3 \pm 1,4$ мкмоль/($m^2 \cdot c$). Вариант 8 - светодиодная лента RT 2 – 500 12V *Green* 525 нм с плотностью потока фотонов – $9,2 \pm 2,5$ мкмоль/($m^2 \cdot c$). Вариант 10 - светодиодная лента RT 2 – 500 12V *Blue* 470 нм с плотностью потока фотонов – $0,7 \pm 0,3$ мкмоль/($m^2 \cdot c$). Варианты 12–21 – это модельный ряд светодиодных светильников серии «Светодар» производства Государственного предприятия «ЦСОТ НАН Беларуси». В этих светильниках отношение ППФ (плотность потока фотонов в диапазоне 400–700 нм) оранжево-красно полосы (607–694 нм) к ППФ синей полосы (400–495 нм) варьировалось от 1 до 20.

При этом доля ППФ в диапазоне 580–607 нм (желтый) находилось от 13 до 22 %, а доля фотонов в диапазоне 495–580 нм (зеленый) – от 18 до 38 %. В качестве контроля применялись люминесцентные лампы марки *OSRAM 36W/765 Cool Daylight* с плотностью потока фотонов – $38,2 \pm 13,4$ мкмоль/($m^2 \cdot c$) (вариант 22). Через 60 дней определялись следующие показатели: количество образовавшихся побегов (шт.), высота побега (см), количество листьев на побеге (шт.), частота стеблевого органогенеза (отношение количества регенерировавших побегов в варианте опыта к количеству в контроле, выраженное в %), индекс регенерации побегов (отношение количества полученных побегов (шт.) к количеству высаженных первичных эксплантов (шт.)). Как показали наши исследования, более длительное пребывание эксплантов на питательной среде для регенерации приводит к значительному ее истощению и, вероятно, насыщению фенольными соединениями, что вызывает гибель регенерантов и требуется их немедленная пересадка на свежие питательные среды. Причем, нами установлено, что достаточно использовать питательную среду Мурасиге-Скуга без регуляторов роста, чтобы пересаженный побег образовал адвентивные корни и продолжил развиваться как нормальное растение-регенерант. Опыт закладывался в трехкратной повторности по шесть эксплантов на одну повторность. Анализ регенерационного процесса показал, что свет различного спектрального состава значительно влиял на регенерационный потенциал изолированных тканей семядолей *Solanum chilense* в культуре *in vitro*. Формирование побегов из соматических клеток исходного экспланта индуцируют не только регуляторы роста, входящие в состав питательной среды, но и физические факторы, в частности спектральный состав света.



Рисунок 2. Внешний вид побегов, сформировавшихся при 21 варианте освещения

Результаты исследований свидетельствуют о развитии стеблевого органогенеза при всех вариантах светодиодного освещения, однако эффективность и качество этого регенерационного процесса значительно отличались, что указывает на прямую зависимость дифференциации клеток не только от состава питательной среды, но и качества света. В таблице 1 представлена характеристика стеблевого органогенеза, а также данные о количестве и качестве образовавшихся побегов. Наибольшее количество побегов 72 шт. первичные экспланты сформировали при 21 варианте освещения (рис. 2), причем процесс побегообразования продолжался и после установленной даты снятия результатов, тогда как при других вариантах освещения этого явления не наблюдалось.

Таблица 1.

Характеристика стеблевого органогенеза *Solanum chilense* в культуре *in vitro*

Номер варианта освещения	Количество образовавшихся побегов, шт.	Высота побега, см	Количество листьев на побеге, шт.	Частота стеблевого органогенеза, %	Индекс регенерации и побегов
4	6,3	2,4	3,0	28,6	1,0
5	8,0	1,9	2,1	38,1	1,3
8	18,0	4,1	4,7	85,7	3,0
10	22,3	1,7	2,2	104,8	3,7
12	10,7	2,3	5,2	52,4	1,8
13	7,3	1,9	2,2	33,3	1,2
14	25,0	2,4	2,8	119,0	4,2
15	3,3	2,0	2,1	14,3	0,5
16	24,0	2,6	2,2	114,3	4,0
17	8,7	3,0	3,1	38,1	1,3
18	24,7	2,4	2,3	119,0	4,2
19	7,7	1,9	3,0	33,3	1,2
20	8,0	1,4	3,0	33,3	1,2
21	72,0	3,9	4,2	342,9	12,0
22-контроль	21,3	2,4	3,7	100,0	3,5
НСР _{0,5}	27,0	1,2	1,6	-	-

При освещении 21 вариантом были сформированы также отдельные растения-регенеранты с хорошо развитой надземной частью и корневой системой (рис. 3), чего не выявлено при других вариантах освещения.



Рисунок 3. Внешний вид растения-регенеранта, сформировавшегося при 21 варианте освещения

Это свидетельствует об уникальном влиянии 21 варианта освещения на культивируемые клетки, которые способны в данных условиях образовывать эмбриониды, развивающиеся в нормальные растения-регенеранты. Освещение вариантами 10, 16, 14 и 18 вызывало превышение количества регенерировавших побегов над контролем, однако оно составило от 1,0 шт. до 4,0 шт. Значительно уступал контрольному варианту регенерационный процесс, происходящий при освещении 15 вариантом. В данных условиях освещения сформировалось только три побега. Более, чем в два раза меньше побегов образовано первичными эксплантами при 4, 5, 12, 13, 17, 19 и 20 вариантах освещения. На рис. 4 представлен внешний вид побегов, сформировавшихся при 17 варианте освещения, что позволяет видеть значительную разницу в количестве побегов, образованных при 21 варианте освещения, представленных на рис. 2.



Рисунок 4. Внешний вид побегов, сформировавшихся при 17 варианте освещения

Высота побега варьировала от 4,1 см при варианте 8, который способствовал вытягиванию стебля, до 1,4 см при варианте 20. По данному признаку контроль превышали также побеги, образованные при 21 и 17 вариантах освещения. Количество листьев на побеге при контрольном освещении составило 3,7 шт. Это значение было превышено при 8, 12 и 21 вариантах освещения.

Наибольшая частота стеблевого органогенеза 342,9% отмечена при 21 варианте освещения, в данных световых условиях зафиксирован и наивысший индекс регенерации, который составил 12,0. На уровне контроля индекс регенерации установлен при 10 варианте освещения. Незначительное превышение следует отметить при освещении 18, 14 и 16 вариантами. Остальные спектральные составы светодиодного освещения уступали контрольному варианту по влиянию на частоту стеблевого органогенеза, который при них был на уровне 14,3–52,4%. Следует обратить внимание на реакцию клеток первичных эксплантов на освещение вариантом 8. Это светодиоды зеленого цвета, которые совместно с регуляторами роста в составе питательной среды вызвали формирование побегов высотой в среднем 4,1 см, более чем с четырьмя листьями и частотой стеблевого органогенеза 85,7%. Целесообразно признать этот вариант освещения перспективным для работы в культуре *in vitro*, в том числе и с дикими видами томата.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что стеблевой органогенез в тканях семян *Solanum chilense* стимулируется не только наличием в составе питательной среды регуляторов роста, но и качеством света. Несмотря на то, что изучалось действие различного спектрального состава светодиодного освещения в культуре одних и тех же тканей, характеризующихся одинаковым эндогенным гормональным статусом, на одних и тех же вариантах питательных сред частота стеблевого органогенеза варьировала. Такую вариабельность можно объяснить тем, что каждая клетка, имея свою собственную генетическую программу, отвечает на определенные сигналы (качество света) специфически; более того, одна и та же клетка на разной стадии развития может по-разному реагировать на одни и те же сигналы.

В нашем исследовании определены варианты освещения, позволяющие с относительно высокой частотой (119,0; 342,9 %) индуцировать процессы регенерации побегов в культуре тканей семядолей *Solanum chilense*. Это светодиодные светильники вариантов 14, 18 и 21, у которых спектральное соотношение R/B («красный/синий») составляет соответственно 1,3; 3,1 и 19,7; а соотношение FR/R («дальний красный/красный») – соответственно 0,14; 0,12; 0,24. Образовавшиеся в указанных световых условиях побеги успешно развивались при последующем культивировании и формировали нормальные растения-регенеранты. После адаптации в условиях *ex vitro* они могут быть включены в селекционный процесс.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Белорусского Республиканского фонда фундаментальных исследований на тему: «Оценка морфогенеза и вариабельности растений-регенерантов различных видов томата при воздействии светодиодного освещения в условиях *in vitro*», договор с БРФФИ № Б24-056.

Библиографический список

1. Калинин, Ф. А. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. А. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. - Киев, 1980. 488 с.
2. Курина А. Б., Соловьева А. Е., Храпалова И. А., Артемьева А. М. Биохимический состав плодов томата различной окраски. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021; 25 (5), с. 514-527.
3. Лабате, Джоан А.; Робертсон, Ларри Д.; Стриклер, Сьюзен Р.; Мюллер, Лукас А. «Генетическая структура четырех диких видов томатов в комплексе видов *Solanum peruvianum* s.l.». Геном. 2014. 57 (3): С. 169–180.
4. Никонович Т. В. Анализ сортовых различий растений-регенерантов картофеля *in vitro* при использовании светодиодных светильников / Т. В. Никонович, А. В. Кильчевский, Т. В. Кардис, В. Л. Филипня, О. В. Чижик, Ю. В. Трофимов, В. И. Цвирко, Е. В. Керножицкий // Вестник БГСХА. 2018. №1. С. 73-79.
5. Никонович, Т. В. Влияние спектрального состава света на рост и развитие растений-регенерантов винограда в период адаптации к условиям *in vivo* / Т. В. Никонович, А. В. Левый, В. В. Французенок // «Вестник БГСХА». – Горки, 2012. № 2. – С. 70-75.
6. *Solanum chilense*. A global taxonomic resource for the nightshade family. Режим доступа: <https://solanaceaesource.myspecies.info/content/solanum-chilense/>.
7. Murachige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – Vol. 15. - №13. – P.473-497.