

УДК 581.143.6

ИНДУКЦИЯ КАЛЛУСОГЕНЕЗА У ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР *CUCUMIS SATIVUS L.* *И BETA VULGARIS L.*

M.E. Лапкасов^{1,2}, Т.А. Кузнецова², Ю.В. Ухатова¹

¹*Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова*

²*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого
Санкт-Петербург, РФ*

Исследовано влияние различного состава питательных сред, типа эксплантов (гипокотили, эпикотили, семядоли, фрагменты листа) на каллусогенез двух сортов и гибрида *Cucumis sativus L.* и четырех сортов и гибрида *Beta vulgaris L.* Подобран режим стерилизации семян, которые в дальнейшем проращивались в асептических условиях. Из полученных проростков получали разные типы эксплантов, которые использовались для получения каллусных тканей. Экспланты высаживались на модифицированные среды на основе среды Мурасиге-Скуга (МС), содержащие различные стимуляторы роста. Оптимальной средой для получения каллусной ткани из сортов огурца стала среда МС с содержанием 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты, при обеспечении светового режима с 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2200 люкс на м², при температуре от 20 до 24 °C. Наиболее успешное использование в качестве экспланта эпикотиля сорта ‘Ochiai 9’. Наилучшей средой для образования каллусной ткани свёклы стала среда МС с добавлением 0,1 мг/л 2,4-дихлорфеноксикусной кислоты и 1 мг/л 6-бензиламинопурина для исследуемых сортов ‘Гранатовый Шар’, ‘Цыганский Барон’, ‘Комбат’, ‘Санькина Любовь’ и гибрида ‘Партнер F1’, наилучший тип экспланта – фрагменты листовой пластиинки. Полученный по итогу работы каллус можно применять для изучения регенерационной способности, использовать для получения новых сортов методами ускоренной селекции.

Ключевые слова: каллусогенез, *Beta vulgaris L.*, *Cucumis sativus L.*, культивирование, *in vitro*.

Применение биотехнологических подходов селекции разных овощных культур начинается с разработки эффективных и воспроизводимых методов регенерации и каллусогенеза, поскольку без них невозможно проводить дальнейшие исследования с применением методов генетической инженерии и биотехнологии, так как на выходе нельзя будет получить целое растение для дальнейшего высаживания и изучения в полевых условиях. Для разработки методик каллусообразования на эксплантах, нужно провести тщательный анализ сред, обогащенных фитогормонами, так как от этого будет зависеть вид образовавшегося каллуса, его консистенция и размер [2]. У культур свёклы и огурца в настоящее время изучены только единичные генотипы [1, 4, 6, 7], возможности коллекции ВИР позволяют расширить выборку и провести анализ растений различных сортов и гибридов по способности каллусообразования и регенерации в условиях *in vitro*.

Материалы и методы. В качестве материала исследования использован материал из коллекции ВИР: два сорта и гибрид *Cucumis sativus L.*: ‘Ochiai 9’, ‘Cucumber Pickmore’, ‘Britanos F1’ и четыре сорта *Beta vulgaris L.*: ‘Гранатовый Шар’, ‘Цыганский Барон’, ‘Комбат’, ‘Санькина Любовь’ и один гибрид ‘Партнер F1’. В качестве исходных эксплантов для инициации культуры *in vitro* брали семена 2018 года репродукции (огурец) и 2021 (свёкла).

Для введения в асептические условия семена стерилизовали в растворе с содержанием активного хлора – 2,5 % в течение 15 минут с последующим трехкратным промыванием в стерильной воде. Эффективность стерилизации оценивали по отсутствию роста посторонней микрофлоры при помещении семян после обработки на питательную среду. Базовым составом

питательной среды была среда по прописи Мурасиге и Скуга (1962), МС. В эксперименте оценивали влияние различных регуляторов роста на индукцию каллусообразования (табл. 1).

Проращивание семян на поверхности питательной среды проводили при 16-часовом фотопериоде и освещенности 2200 люкс на м² при температуре воздуха от 20 до 24 °C. В ходе работы по получению каллуса исследовали способность к каллусогенезу у различных типов эксплантов (фрагменты листьев, семядоли, черешки, гипокотили и эпикотили), которые помещали на среду МС, обогащенную различными стимуляторами роста (табл. 1), и культивировали в контролируемых постоянных условиях (описаны выше) световой комнаты.

Эффективность каллусообразования оценивали как долю (%) эксплантов, на которых образуется каллусная ткань, от общего количества посаженных на питательную среду эксплантов в одном варианте опыта. При введении в культуру *in vitro* семена овощных культур равномерно распределялись по 4 питательным средам по 40 семян от сорта или гибрида. Получаемые проростки нарезались на экспланты и высаживались на среды. Из-за неравномерного произрастания растения из семени, количество посадочного материала для образования каллусной ткани разнилось. В среднем на среду от сорта или гибрида изучаемых культур высаживалось по 35 эксплантов.

Таблица 1
Состав сред для индукции каллусообразования из эксплантов *Cucumis sativus* и *Beta vulgaris* *in vitro*

Состав среды	Номер сред для культивирования					
	1 [7,8]	2 [4]	3 [4]	4 [6]	5 [1]	6 [3]
	<i>Cucumis sativus</i>			<i>Beta vulgaris</i>		
МС макро- и микроэлементы	+	+	+	+	+	+
Витамины МС	+	+	+	+	+	+
Хелат железа	+	+	+	+	+	+
6-БАП, мг/л	-	1,0	1,0	1,0	-	0,5
2,4-Д, мг/л	2,0	-	1,0	0,1	1,0	-
PVP, мг/л	-	-	-	-	5,0	-
НУК, мг/л	-	1,0	-	-	-	0,1
ИУК, мг/л	-	-	-	-	-	-
Сахароза, г/л	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0

Примечание: БАП – 6–бензиламинопурин; 2,4–Д – 2,4–дихлорфеноксикусусная кислота; PVP – поли–N–винилпирролидон; НУК – нафтилинусусная кислота; ИУК – индолил–3–уксусная кислота.

Изучали также влияние освещенности на каллусогенез. Получение каллусной ткани проводили в двух режимах освещенности: в темноте и при обеспечении светового режима с 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2200 люкс на м². Температура воздуха составляла от 20 до 24 °C. Появление каллусной ткани зависело от используемого сорта, среды, а также выбранных условий и варьировалось от 4 до 8 недель. Для более точных показателей времени образования каллуса результаты снимались каждые сутки.

Результаты и обсуждение. Стерилизация приводила к 96,6±1,7 % стерильности семян у сортов огурца, у свеклы – 96,0±1,9 %. Процент прорастания семян после стерилизации у сортов и гибрида *Cucumis sativus* L. составил 45,8±2,2 %, у сортов и гибрида *Beta vulgaris* L. – 55,0±2,1 %. Оптимальной средой для получения проростков из семян большинства изучаемых овощных культур *in vitro* стала безгормональная среда МС, на которой процент прорастания у сортов и гибрида *Cucumis sativus* L. составил 68,3±14,9 %, у сортов и гибрида *Beta vulgaris* L. – 68,0±14,7 %.

Из трех изучаемых сред для получения каллуса из эксплантов *Cucumis sativus* (табл. 1: номера сред 1, 2, 3), наиболее интенсивное каллусообразование наблюдали на среде МС с содержанием 2 мг/л 2,4-Д [7,8] (среда № 1), на свету. Из 61 изучаемого экспланта разного происхождения, посаженных на эту среду, культивируемых на свету, на 43 образовалась каллусная ткань (табл. 2).

Таблица 2

Эффективность каллусообразования (%) образцов *Cucumis sativus* на модифицированных средах с использованием разных типов эксплантов

Сорт / гибрид	Среда №1		Среда №2	Среда №3
	МС + 2 мг/л 2,4-Д		МС + 1 мг/л 6-БАП, 1 мг/л НУК	МС+ 1мг/л 2,4-Д, 1 мг/л 6-БАП
	свет	темнота	свет	свет
‘Ochiai 9’	70,5±5,9	16,4±4,6	42,1±11,6	0,0±0,0
‘Cucumber Pickmore’	65,0±10,9	0,0±0,0	35,0±10,9	50,0±12,9
‘Britanos F1’	41,2±12,3	20,0±9,2	60,0±11,2	50,0±18,9

Лучший тип эксплантов – эпикотили сорта ‘Ochiai 9’. Каллус образовывался на концах эпикотиля и достигал размеров от 7 до 15 мм в диаметре на 48 сутки роста. На других типах эксплантов каллус был точечный, не превышающий 4 мм в диаметре на 48 сутки роста. Каллус, полученный на листьях, образовывался чаще всего в районе прикрепления черешка к листовой пластинке. Каллус сорта ‘Ochiai 9’ можно охарактеризовать как плотноглобулярную массу, светло-зеленого цвета. При культивировании каллуса более 40 - 50 суток он перестает расти, либо растет очень медленно и начинает темнеть. В литературе потемнение каллусных тканей объясняется накоплением в них фенольных соединений [2].

На сорте ‘Cucumber Pickmore’ из 20 изучаемых эксплантов каллус образовался на 13 (табл. 2). Его можно охарактеризовать как плотноглобулярную массу, светло-зеленого или желто-зеленого цвета. На гибриде ‘Britanos F1’ из 17 изучаемых эксплантов каллус образовался только на 7 эксплантах (табл. 2). Его можно охарактеризовать как плотноглобулярную массу, светло-зеленого или желто-зеленого цвета. В местах соприкосновения со средой каллус становился рыхлым.

В темноте эффективность каллусообразования на среде № 1 существенно снижается. На эксплантах сорта ‘Cucumber Pickmore’ каллусообразование отсутствует, у сорта ‘Ochiai 9’ из 61 экспланта, посаженных на среду, только на 10 удалось получить каллус (наилучший тип экспланта в этих условиях гипокотиль и фрагменты листа), из 17 эксплантов гибрида ‘Britanos F1’ только на 4 эксплантах (фрагментах листа), образовывался точечный каллус.

На среде №2 содержащей 1 мг/л НУК и 1 мг/л 6-БАП [4] было использовано 59 эксплантов, были задействованы листья и семядоли растений. Эксперимент проводился на свету. Лучше всего каллусная масса образовывалась на эпикотилях сорта ‘Ochiai 9’ (табл. 2). Из 19 эксплантов, посаженных на данную среду, на 8 образовалась каллусная ткань. Каллус образовывался на концах гипокотиля и по всей поверхности листа. На эпикотиле размер каллуса был от 2 до 9 мм в диаметре. На листе каллус образовывался небольшими участками от 3 до 5 мм в местах порезов и в основании. На других эксплантах каллус обнаружен не был.

На различных типах эксплантов гибрида ‘Britanos F1’, и сорта ‘Cucumber Pickmore’ каллус образовывался только на одном типе эксплантов – фрагменты листа. Размеры каллусных тканей достигали 3 – 4 мм. Полученный каллус был плотноглобулярным, обычно светло-желтого или желтого цвета, редко образовывался каллус светло-зеленого цвета.

На среде № 3 с содержанием 1мг/л 2,4-Д и 1 мг/л 6-БАП [4] для получения каллуса было задействованы листья и семядоли растений. На 20 сутки каллус образовался в среднем на 50 % эксплантов сорта ‘Cucumber Pickmore’ и гибрида ‘Britanos F1’ (табл. 2). Каллус образовывался только на одном типе эксплантов – фрагменты листа. Он окружал всю поверхность экспланта, кроме сторон, соприкасающихся со средой. Образованный каллус был плотноглобулярным размером от 3 до 5 мм, зеленого или светло-зеленого цвета с небольшими вкраплениями светло-желтого или желтого цвета.

Для получения каллусной ткани из сортов *Beta vulgaris* из 3 питательных сред лучше всего подошла среда МС с добавлением 0,1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л 6-БАП [5], независимо от сорта (табл. 3, среда № 4), световой режим с 16-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 2200 люкс на м².

Таблица 3

Эффективность каллусообразования образцов *Beta vulgaris* на модифицированных средах с использованием разных типов эксплантов

Сорт / гибрид	Среда № 4	Среда № 5	Среда № 6
	МС + 1,0 мг/л 6-БАП и 0,1 мг/л 2,4-Д	МС + 1мг/л 2,4-Д, 5 мг/л РВР	МС + 0,1 мг/л НУК и 0,5 мг/л 6-БАП
	Свет	свет	темнота
‘Гранатовый Шар’	100±0	0,0±0,0	30,0±15,3
‘Цыганский Барон’	100±0	60,0±16,3	22,2±10,1
‘Партнер F1’	100±0	0,0±0,0	52,8±8,4
‘Комбат’	100±0	0,0±0,0	58,3±14,9
‘Санькина Любовь’	100±0	23,1±12,2	20,0±13,3

Каллус образовался на всех эксплантах разного происхождения, но наиболее крупный от 5 до 10 мм в диаметре, несколькими очагами – на фрагментах листовой пластиинки. Он имел плотную глобулярную консистенцию, цвет бело-серый, стабильный. Было определено, что экспланты листового происхождения лучше всего подходят для каллусообразования.

Каллус формировался вдоль всего основания листа и в местах порезов. Также были случаи, когда каллус образовывался в местах соприкосновения экспланта со средой. Каллусная ткань была плотноглобулярной и имела бело-серый цвет. Каллус, появляющаяся в местах соприкосновения листа со средой, был рыхлой, темно-зеленого или красноватого цвета, данный тип каллуса характеризуется в литературе как неморфогеный, не способный к дальнейшей регенерации в целое растение [1].

На среде МС с добавлением 1 мг/л 2,4-Д и 5 мг/л РВР (среда № 5) проводили культивирование листовых эксплантов в условиях освещения. Каллус на эксплантах появился только на 32 сутки на 6 эксплантах сорта ‘Цыганский Барон’ небольшими участками (от 1 до 5 мм) по всей длине листа. Каллус можно охарактеризовать как плотный, светло-зеленого цвета, на 89 сутки он приобретал белый цвет.

На 3-х эксплантах сорта ‘Санькина Любовь’ (на поверхности фрагмента листа) образовался светло-зеленый каллус на 127 сутки культивирования. Размер участков – 9 мм. Эксплант вместе с каллусной тканью быстро покернел из-за накопления в них фенольных соединений. Листовые экспланты сортов ‘Гранатовый Шар’, ‘Комбат’ и гибрида ‘Партнер F1’ быстро чернели и образование каллуса обнаружено не было. На среде с содержанием 0,1 мг/л НУК и 0,5 мг/л 6-БАП [3] (среда №6) для получения каллусов было использовано 93 экспланта, были задействованы листья и семядоли растений. Эксперимент проводился без доступа света.

Лучше всего каллусная масса образовывалась на листовых эксплантах гибрида ‘Партнер F1’ и сорта ‘Комбат’. Каллус образовывался в местах порезов, а также участками от 2 до 7 мм по краям. Было отмечено, что несмотря на то, что было получено много каллусной ткани, по сравнению с другими сортами, она быстро чернела.

Образующийся каллус можно охарактеризовать как плотный, глобулярный, белого или кремового цвета. На 12 эксплантах сорта ‘Комбат’, каллус образовался на 26 сутки на 7 эксплантах. Из 10 изучаемых образцов сорта ‘Санькина Любовь’, каллусная ткань образовалась на 29 сутки только на 2 эксплантах. Из 18 эксплантов сорта ‘Цыганский Барон’, каллус образовался на 26 сутки только на 4 эксплантах. Из 10 эксплантов сорта ‘Гранатовый Шар’, каллус образовался на 27 сутки только на 3 эксплантах. Образующийся каллус у всех сортов, можно охарактеризовать как плотный, глобулярный, белого или светло-серого цвета.

При длительном проращивании семян свёклы на среде Мурасиге-Скуга с добавлением 1мг/л 6-БАП у пары проростков свеклы на безгормональной среде МС, вокруг гипокотиля через 4 недели проращивания начинал появляться плотный белый каллус. После появления каллуса, рост растения замедлялся.

Выходы. Оптимальной средой для получения каллусной ткани из сортов огурца стала среда МС с содержанием 2 мг/л 2,4-Д, на свету. Наиболее крупная каллусная масса образовывалась на эпикотилях сорта огурца ‘Ochiai 9’. Наилучшей средой для образования каллусной ткани свёклы

стала среда МС с добавлением 0,1 мг/л 2,4-Д и 1 мг/л 6-БАП, для исследуемых сортов ‘Гранатовый Шар’, ‘Цыганский Барон’, ‘Комбат’, ‘Санькина Любовь’, гибрида ‘Партнер F1’, наилучший тип экспланта для каллусогенеза – фрагменты листовой пластиинки.

Благодарности: часть результатов работы получена при поддержке проекта "Национальная сетевая коллекция генетических ресурсов растений для эффективного научно-технологического развития РФ в сфере генетических технологий".

Библиографический список

1. Банникова М.А. Регенерация растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) в культуре *in vitro*. Гистологическое изучение процессов регенерации / М.А. Банникова, А.Э. Головко, О.А. Хведынич, Н.В. Кучук // Цитология и генетика. – 1995. – Т. 29. – №. 6. – С. 14 – 22.
2. Васильченко Е.Н. Воспроизведение *Beta vulgaris* L. в условиях *in vitro* / Е.Н. Васильченко., Е.О. Колесникова, Т.П. Жужжалова // Наука и образование: отечественный и зарубежный опыт – 2019. – С. 114 – 117.
3. Мишуткина Я.В. Изучение влияния состава питательной среды, типа экспланта и генотипа на частоту регенерации растений сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.) *in vitro* / Мишуткина Я.В., Гапоненко А.К. // Генетика. – 2006. – №. 2. – С. 210-218.
4. Lashin I.I. Effect of plant growth regulators on callus induction and plant regeneration of cucumber (*Cucumis sativus* L. Beith Alpha) / I.I. Lashin, D. Mamdouh // Nat. Sci. – 2014. – V. 12, Nb. 1. – pp.68 – 74.
5. Murashige T.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T.A. Murashige, F. Skoog // Plant Physiol. – 1962. – V. 15. – pp. 473 – 476.
6. Roussy I. In planta 2, 3, 5 truodobenzoic acid treatment promotes high frequency and routine *in vitro* regeneration of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants / Roussy I. // Plant cell reports. – 1996. – V. 16. – pp. 142–146.
7. Sultana H. Response of Different Explants for Callus Induction in *Cucumber* / H. Sultana et al. //European Journal of Biology and Biotechnology. – 2021. – Т. 2. – №. 5. – С. 71-75.
8. Usman M. Somatic embryogenesis and shoot regeneration induced in cucumber leaves / M. Usman, Z. Hussain, B. Fatima // Pak. J. Bot. – 2011. – V. 43, Nb. 2. – pp. 1283-1293.