

КУЛЬТУРА ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *YUSSA* L.

П.А. КАРПОВ, кандидат биологических наук
Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАНУ

Род *Yucca* L. насчитывает около 42 видов древесных однодольных растений, произрастающих в Северной Америке. Представители рода *Yucca* являются ценными декоративными растениями, источниками природного волокна, а также природным источником стероидных гликозидов, являющихся основой для синтеза медицинских препаратов стероидного ряда, таких как кортизон и половые гормоны [18, 38].

Представители р. *Yucca* – медленнорастущие растения, с выраженной периодичностью цветения, основным способом размножения которых является семенная репродукция, тесно связанная с деятельностью опылителей - юкковых молей, имеющих специализацию на уровне отдельных родов, подродов, экологических групп и видов [14, 16, 28]. В условиях интродукции на юге Украины из-за отсутствия естественных опылителей, юкки оказываются не способными к завязыванию плодов без применения принудительного опыления. Исключение составляет способная к самоопылению *Y. aloifolia* [2, 6, 7, 11]. Это является основной причиной, по которой в настоящее время преобладают методы вегетативного размножения *Yucca* sp., отличающиеся низкой эффективностью [39]. Наряду с разработкой и совершенствованием методов искусственного опыления, которое значительно затруднено периодичностью цветения, а в случае с крупными видами, сложностью самой процедуры опыления [1, 7], актуальна разработка методов клонального микроразмножения представителей рода *Yucca in vitro* [37].

Индукция адвентивного побегообразования

In vitro быстрое размножение представителей рода *Yucca* L. чаще всего достигается посредством индукции закладки адвентивных почек [19, 25, 26].

Роберт с соавторами [37] обнаружили, что при индукции адвентивного побегообразования в культуре изолированных побегов, в случае с представителями семейства *Agavaceae*, обязательным условием является совместное действие низкой концентрации ауксина и высокой концентрации цитокинина [12]. Так, в Флоридском университете добились массового получения растений *Yucca* sp. через закладку придаточных почек на питательной среде Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением α -нафтилуксусной кислоты (НУК) и 6-бензиламинопурина (БАП) [26].

При проращивании семян *Y. schidigera* Roezl. на среде МС, содержащей 1 % агара, закладка адвентивных почек наблюдалась в присутствии 1,33 мкМ БАП [20].

В Голландии разработана методика клонального микроразмножения химерной *Y. elephantipes* Regel., путем индукции закладки придаточных почек. Показано, что интенсивность адвентивного побегообразования изолированных боковых побегов *Y. elephantipes* определяется целым рядом факторов, из которых важнейшим является присутствие БАП и его концентрация, содержание сахарозы и температура. За 12 недель от материнского побега индуцировалось развитие 7-8 адвентивных побегов [32].

Проростки *Y. valida*, полученные *in vitro* в культуре изолированных семян, также были размножены путем клонирования *in vitro* посредством активации латеральных почек на модифицированной питательной среде МС, дополненной 1 мкМ индолилуксусной кислоты (ИУК) и 5 мкМ БАП [12]. При этом, был определен оптимальный баланс регуляторов роста. Было исследовано влияние различных комбинаций ИУК и БАП на процесс адвентивного побегообразования. При использовании исключительно ИУК, без добавления цитокинина, происходило развитие исключительно апикальной меристемы без признаков гипертрофии или каллусообразования. Наблюдалась положительная корреляция закладки латеральных побегов и концентрации БАП, однако статистически достоверная зависимость при совместном воздействии БАП и ИУК обнаружена не была. Максимальная закладка адвентивных побегов была отмечена при использовании 10 и 20 мкМ БАП в сочетании с

5 мкМ ИУК. Замена ИУК на 2,4-Д и НУК приводило к нарастанию каллуса. Таким образом, использование питательной среды, дополненной 10 или 20 мкМ БАП в сочетании с 5 мкМ ИУК, являлось более эффективным для адвентивного побегообразования в случае с *Y. valida* [12]. При этом закладка адвентивных побегов была отмечена на 10-й день культивирования и достигала максимального числа побегов на эксплант после 30-го дня культивирования. Использование высоких концентраций БАП (30 мкМ) вызывало гипертрофию и каллусогенез. В отсутствие регуляторов роста у изолированных микропобегов *Y. valida* всегда отмечался ризогенез, и применение ИУК не оказывало заметного влияния на активность ризогенеза. С другой стороны, присутствие БАП всегда вызывало его полное подавление [12].

С.Е. Бенц [15] была разработана система микроразмножения уникальных розово- и белоцветковых селекционных форм *Y. glauca*. Апикальные меристемы, взятые от взрослых растений, культивировались на питательной среде МС, дополненной различными комбинациями НУК (от 0,0 до 3,2 мкМ) и БАП (от 0,0 до 45 мкМ). При этом пролиферация адвентивных побегов также происходила при увеличении концентрации БАП [15].

Морфогенетический ответ на присутствие и концентрацию БАП и НУК был сходным для разных генотипов *Y. glauca*, а попытка замены БАП на N6-(2-изопентиниладенин) показала, что 2iP является неэффективным при индукции адвентивного побегообразования [15].

Таким образом, индукция адвентивного побегообразования в культуре изолированных побегов *Yucca sp.* с помощью БАП описана многими авторами: Bentz et al. [15] для *Y. glauca*; Pierik and Steegmans [32] для *Y. elephantipes*, Atta-Alla и Van Staden [13] для *Y. aloifolia*, Kaneda et al. [20] для *Y. schidigera*, Arce-Montoya [12] для *Y. valida*.

Ризогенез

Укоренение микропобегов *Yucca sp.*, как правило, наблюдается на безгормональных питательных средах [12, 15, 32], или средах, дополненных ИМК [13, 15, 32] или НУК [27]. ИУК, как правило, оказывается неэффективной [12].

Микропобеги *Y. glauca* успешно укоренялись на безгормональных питательных средах или средах, содержащих низкие концентрации β-индолил масляной кислоты (ИМК) [15]. Пролифериовавшие побеги *Y. aloifolia* укоренялись на питательной среде МС, содержавшей половинную концентрацию макро- и микро солей и дополненной 2,5–4,9 мкМ ИМК и 1% активированного угля [13]. Укоренение микропобегов *Y. elephantipes* происходило как на безгормональной питательной среде МС, так и на средах, дополненных 0,049–24,6 мкМ ИМК. Причем, оптимальный по эффективности и морфологии ризогенез отмечали на питательной среде, дополненной 4,9 мкМ ИМК [32]. Стабильный ризогенез отмечался в культуре изолированных микропобегов *Y. valida* в отсутствие регуляторов роста. При этом применение ИУК не оказывало заметного влияния на активность ризогенеза и морфологию корней, а присутствие БАП вызывало полное его подавление [12].

Согласно данным ряда авторов [13, 15, 32], во всех описанных случаях растения-регенеранты успешно адаптировались в почве.

Также в литературе описано получение культуры изолированных корней *Yucca sp.* Так, культура изолированных корней *Y. torreyi* (син. *Y. macrocarpa*) была получена из высечек корней проростков. Апексы корней *Y. torreyi* длиной 2,5 см культивировались в 125 мл колбах Эрленмейера, содержащих 50 мл жидкой среды Вайта (20 г/л сахарозы, pH=5,7) [41, 42], или МС (1/4 концентрации минеральных солей, полная концентрация NH₄NO₃, 3 мг/л глицерина, 20 г/л сахарозы, pH=5,7). При этом рост корней зависел от условий культивирования, а кривые роста были идентичны на обеих средах [23]. Индукция культуры корней наблюдалась также в случае *Y. schidigera* Roetzl. при переносе неорганизованного каллуса, полученного на питательной среде МС, дополненной 4,52 мкМ 2,4-Д на среду МС, содержащую 16,11 мкМ НУК [27].

Каллусогенез

Впервые каллус юкки был получен в 1974 г. С. Стоксом на примере *Yucca glauca* [40]. При этом был разработан метод получения каллуса и клеточной суспензии из прорастающих семян *Y. glauca* на питательной среде МС, дополненной 0,53 мкМ 2,4-Д. Позже, в Институте биохимии растений АН ГрузССР получили каллус из эксплантов цветков *Y. gloriosa* на среде МС дополненной 2,6 – 5,3 мкМ 2,4-Д [29]. Каллус был получен из колеоптиля и высечек листа *Y. filifera* [33, 35]. Khanna S. и P. Purohit получили каллусную ткань из эксплантов листа на питательной среде МС, содержащей 5,3 мкМ 2,4-Д, при этом восьминедельный каллус имел ростовой индекс 1,7 [24].

Активный каллусогенез наблюдался при проращивании семян *Y. schidigera* Roetzl. на среде МС, содержащей 1 % агара в присутствии 1,36 мкМ 2,4-Д [20], а в случае *Y. valida*, на питательных средах МС дополненных 10-20 мкМ БАП в комбинации с 5 мкМ 2,4-Д или НУК [12].

В Грузии в течение многих лет велись работы по культивированию *Y. gloriosa* как потенциального промышленного источника стероидных гликозидов. Первичный каллус *Y. gloriosa* был получен от изолированных бутонов на питательной среде МС, дополненной 2,26 – 4,52 мкМ 2,4-Д. Успешное субкультивирование осуществлялось на питательной среде МС, дополненной 0,09226 – 0,226 мкМ 2,4-Д [3, 4, 9].

Каллусы некоторых видов *Yucca*, такие как *Y. filifera* [33] и *Y. schidigera* [20] продемонстрировали способность продуцировать стероидные гликозиды [34].

Информация относительно регенерации растений рода *Yucca* из каллуса в литературе пока отсутствует. Хотя С. Бенц отмечалась пролиферация побегов в культуре каллуса *Y. glauca* при увеличении концентрации БАП, в то время как в присутствии НУК и исключении БАП происходило угнетение побегообразования и пролиферация каллуса [15].

Материалы и методы

Объектами исследований служили *Yucca aloifolia* L. и *Y. torreyi* Shafer., растущие в коллекции Никитского ботанического сада.

Первичными эксплантами служили семена и изолированные зародыши, культивировавшиеся на безгормональных питательных средах Монье (М) [30] и МС [31].

Стерилизация семян производилась в две стадии: 1) предварительная поверхностная стерилизация плода 96%-ным этанолом и 2) стерилизация изолированных семян 70%-ным этанолом (1 мин) с последующей промывкой в дистиллированной воде. Семена высевались поверхностно на твердые питательные среды М и МС по 5-10 шт. в случае с *Y. torreyi* и 10-17 шт. в случае с *Y. aloifolia*.

Все дальнейшие манипуляции производились с ювенильными растениями, полученными *in vitro*.

В ходе исследований использовались модифицированные питательные среды М, МС и Quoirin, Leroivge (QL) [36] с полной и половинной концентрациями солей.

При получении каллуса в качестве первичных эксплантов использовали зиготические зародыши, высечки листьев и корней растений, выращенных в культурах изолированных зародышей и семян на безгормональных питательных средах (М, МС, QL).

В дальнейших опытах культивирование осуществлялось на агаризованных питательных средах QL и МС с полной и половинной концентраций макро- и микросолей, дополненных БАП (0,0; 0,44; 0,89; 1,78; 2,22; 4,4; 6,62; 8,90; 11,12; 13,3 и 24,42 мкМ), ИУК (0,228; 2,85; 5,71 мкМ), ИМК (0,098; 0,197; 0,49; 0,98; 1,97; 2,46; 4,9; 9,8; 14,7 мкМ), НУК (0,107; 0,215; 0,43; 0,54; 1,07; 2,15; 2,69; 4,83; 5,37; 10,74 и 16,11 мкМ) и 2,4-Д (0,181; 0,45 и 18,1 мкМ) при 6%-ном содержании агара и постоянном значении рН=5,8, Т=24°C и освещенности 1000-1200 лк.

Эффективность клонального микроразмножения оценивалась по формуле:

$$K = \frac{N - n}{n}$$

где: N – конечное число микропобегов; n – исходное количество микропобегов, K – эффективность микроразмножения

Частота регенерации (R) оценивалась в проценте эксплантов, образывавших адвентивные побеги.

Для укоренения микропобегов использовалась среда МС с половинной концентрацией макро- и микросолей, содержащая 25 мг/л мезоинозитола, 15000 мг сахарозы и удвоенную концентрацию по хелатному комплексу (55,6 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ + 74,6 мг/л Na_2EDTA) при рН=6,5.

Ауксины добавлялись в концентрации 1 мг/л в следующих соотношениях и концентрациях: 1) 5,71 мкМ ИУК; 2) 5,37 мкМ НУК; 3) 4,9 мкМ ИМК; 4) 9,8 мкМ ИМК; 5) 4,52 мкМ 2,4-Д; 6) 2,85 мкМ ИУК + 2,69 мкМ НУК; 7) 2,85 мкМ ИУК + 2,46 мкМ ИМК; 8) 2,69 мкМ НУК + 2,46 мкМ ИМК; 9) 5,14 мкМ ИУК + 0,45 мкМ 2,4-Д; 10) 4,83 мкМ НУК + 0,45 мкМ 2,4-Д; 11) 4,43 мкМ ИМК + 0,45 мкМ 2,4-Д.

Контролем служила среда МС оригинального состава без регуляторов роста.

Результаты и обсуждение

Первичная асептическая культура *Yucca aloifolia* и *Y. torreyi* была получена через культуру изолированных семян и зиготических зародышей на питательных средах М и МС, не содержащих регуляторы роста (рис. 1). При этом процент взошедших семян в условиях *in vitro* составлял 89-95% для *Y. torreyi* и 100% для *Y. aloifolia*. Для культуры изолированных семян *Yucca* был характерен длительный период прорастания. Так, например, в случае с *Y. aloifolia*, прорастание первых семян наблюдалось на 9-й день культивирования и заканчивалось на 125-й день. Все дальнейшие исследования проводились на культурах изолированных зародышей, а также на каллусных культурах индуцированных из листовых и корневых эксплантов ювенильных растений, полученных *in vitro*.

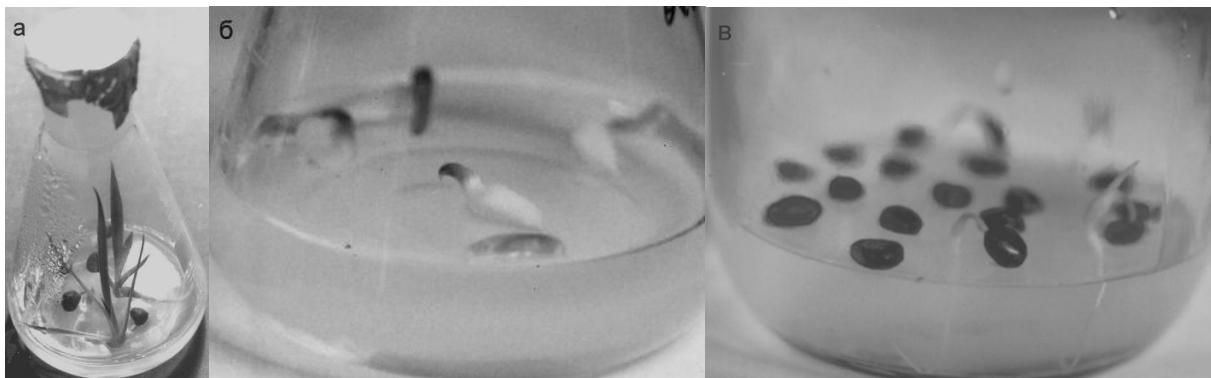


Рис. 1. Прорастание семян и изолированных зиготических зародышей *Y. torreyi* (а, б) и *Y. aloifolia* (в) на безгормональных питательных средах: а – Мурасиге и Скуга (1962); б – Мурасиге и Скуга (1962); в - на среде Монье (1968)

При культивировании изолированных зиготических зародышей *Y. torreyi* и *Y. aloifolia* на безгормональных питательных средах М, МС и QL полного и половинного составов, всегда отмечалось развитие полноценных растений. Культивирование изолированных зиготических зародышей на средах МС и QL, содержащих БАП (0,44; 0,89; 1,78; 2,22; 4,4; 6,62; 8,9; 13,3 мкМ), приводило к развитию основного побега, а также к адвентивному побегообразованию при совместном использовании БАП и низких концентраций НУК (0,11-2,15 мкМ) и ИМК

(0,1-1,97 мкМ). При культивировании зародышей на средах с НУК (0,54; 1,07; 2,15; 2,69; 5,37; 10,74; 16,11 мкМ) или ИМК (0,49; 0,98; 1,97; 2,46; 4,9; 9,8; 14,7 мкМ) в концентрациях равных или преобладающих над цитокининами, происходило развитие корней различной морфологии (рис. 2, а), подавление развития побега и нарастание каллуса, с последующей пролиферацией многочисленных корней (рис. 2, б). При этом, отмечено влияние концентрации питательной среды на морфогенез. Так на питательной среде $\frac{1}{2}$ QL, дополненной 0,89 мкМ БАП и 1,97 мкМ ИМК, наблюдали ризогенез, сопровождавшийся полным подавлением развития побега (рис. 2, а). Использование среды QL с полной концентрацией макро- и микро-солей приводило к нарастанию каллуса с последующей пролиферацией многочисленных поверхностных корнеподобных структур (рис. 2, б).

Каллусогенез и органогенез

Проведенные исследования по индукции каллусогенеза, подтвердили правильность выбора рядом авторов [3, 4, 9, 12, 20, 24, 29, 33, 34, 35, 40, 41] 2,4-Д как лучшего регулятора роста для получения каллуса *Yucca* sp. В наших экспериментах активный каллусогенез, вне зависимости от видовой принадлежности и первичного экспланта, происходил на питательной среде МС, дополненной 2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д. При этом было отмечено явное различие в способности первичных эксплантов к каллусогенезу (табл. 1). Пассирование каллуса на питательные среды для регенерации приводило к реализации морфогенеза через геммогенез (рис. 3, а, б, 4, б, в), ризогенез (рис. 4, б), гемморизогенез (рис. 4, б) и эмбриоидогенез (рис. 3, а, в).

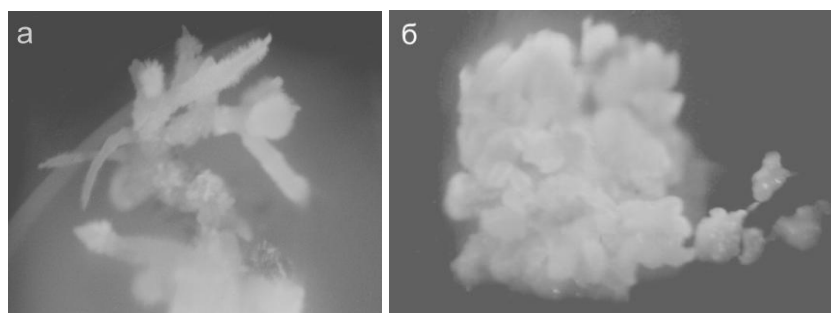


Рис. 2. Влияние на морфогенез изолированных зародышей *Yucca* питательной среды и преобладания концентраций ИМК.

а - ризогенез при культивировании на среде $\frac{1}{2}$ QL+0,89 мкМ БАП+1,97 мкМ ИМК;
б - каллусогенез с последующим формированием многочисленных корнеподобных структур на среде QL + 0,89 мкМ БАП+1,97 мкМ ИМК

Таблица 1

Влияние первичного экспланта на каллусогенез на примере *Y. torreyi* (питательная среда МС, дополненная 2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д)

Первичный эксплант	Число эксплантов (шт.)	Каллусогенез (шт.)	Цвет каллуса	Плотность каллуса
зародыш	30	27	светло-лимонный	плотный
лист*	30	16	белый	средней плотности
корень	30	3	белый	средней плотности

* - высечки листьев брались из базальной зоны листа

Самым высоким морфогенетическим потенциалом обладал каллус, индуцированный из зиготических зародышей. Пассирование его с питательной среды МС + 2,22 мкМ БАП + 18,1 мкМ 2,4-Д на среду QL + 8,9 мкМ БАП + 2,15 мкМ НУК вызывало активный морфогенез, реализуемый через геммо- (рис. 3, а, б) и эмбриоидогенез (рис. 3, а, в).

В наших экспериментах, реализация морфогенеза в культуре изолированных листовых эксплантов ювинильных растений *Y. torreyi* и *Y. aloifolia* происходила только через

каллусогенез. Прямой морфогенез нами не отмечен. При этом, наиболее активный каллусогенез из высечек листа (из базальной зоны), так же, как и в случае с зиготическими зародышами, наблюдался на питательной среде МС, дополненной 2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д.

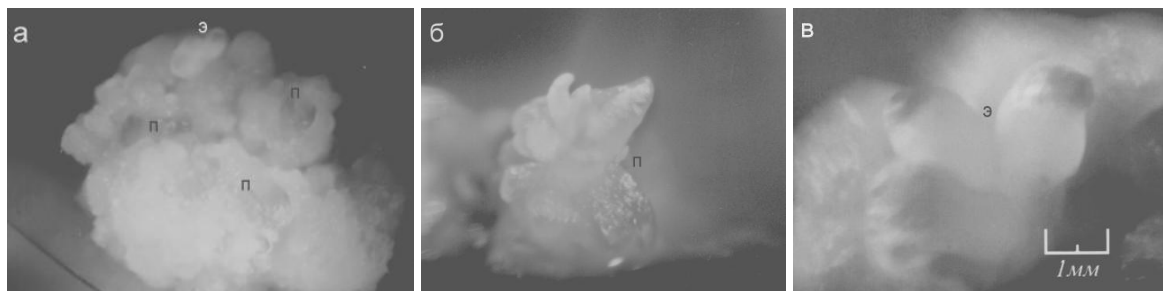


Рис. 3. Геммогенез (а, б) и эмбриоидогенез (а, в) в каллусной ткани зародышевого происхождения при перенесении с МС+2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д, на QL + 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК (п - почки; э-эмбрииды)

Каллус листового происхождения (рис. 4, а) был белый, рыхлый и не содержал проводящих элементов. При многократном пассировании на данной питательной среде был выделен каллус *Y. torreyi* без признаков морфогенеза, продолжавший активно нарастать даже после переноса на безгормональную среду МС и среды для регенерации. (рис. 4, а). Также отсутствовали проявления морфогенеза при помещении его на среды, вызывавшие морфогенез в каллусах зародышевого происхождения.

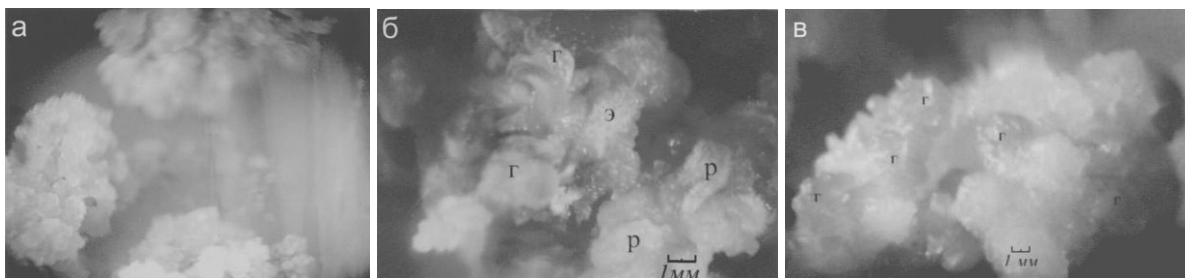


Рис. 4. Каллус *Y. torreyi* листового происхождения
а - нарастание каллуса на питательной среде МС+2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д; б - каллус листового происхождения на среде МС, дополненной 8,9 мкМ БАП + 2,15 мкМ НУК; в - геммогенез в каллусе листового происхождения на среде ½ QL, дополненной 8,9 мкМ БАП + 2,15 мкМ НУК (г - геммогенез; э - эмбриогенная зона; р - ризогенез)

Иногда, при культивировании листовых эксплантов *Y. torreyi* на среде МС, содержащей 2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д, происходило образование каллуса, отличавшегося от вышеописанного по морфологии. Что, вероятно, обуславливается гетерогенностью индуцирующих (эмбриогенных) клеток тканей листа. Последний отличался способностью к морфогенезу. При пассировании его со среды МС + 2,22 мкМ БАП + 18,1 мкМ 2,4-Д на среды для регенерации, наблюдалось образование корней различной морфологии и единичный геммогенез. Подобные процессы наблюдались и при перенесении каллуса на среду МС + 8,9 мкМ БАП + 2,15 мкМ НУК (рис. 4, б). Субкультивирование этого каллуса на среде QL полвинной концентрации и дополненной 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК индуцировало геммогенез (рис. 4, в). Дальнейшее развитие адвентивных почек отмечалось только при перенесении каллуса на безгормональные среды МС и QL, содержащие полные концентрации макро- и микросолей. Эмбриоидогенез в таком каллусе обнаружен не был.

Наряду с этим, слабое каллусообразование наблюдалось при культивировании высечек листа *Yucca torreyi* на среде QL, содержащей 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК. К концу второго-третьего месяца культивирования на данной питательной среде или при перенесении

каллуса на безгормональную среду QL, наблюдали активный соматический эмбриоидогенез. Пассирование на другие безгормональные среды (МС, $\frac{1}{2}$ МС, $\frac{1}{2}$ QL) не вызывало формирование эмбриоидов. Культивирование образовавшихся эмбриоидов на безгормональных средах стимулировало развитие вплоть до торпедовидной стадии. Однако дальнейшее развитие эмбриоидов не отмечалось.

Помещение высечек корней (2-3 см) ювенильных растений *Y. torreyi* и *Y. aloifolia*, полученных в культуре изолированных зиготических зародышей и семян, на питательные среды, содержащие различные концентрации НУК (0,54; 2,15; 2,69; 5,37; 10,74; 16,11 мкМ) или ИМК (0,49; 1,97; 2,46; 4,9; 9,8; 14,7 мкМ), способствовало непродолжительному росту апексов. Причем, как показали опыты, проведенные на высечках корней *Y. aloifolia*, рост в темноте был значительно более активным. По истечении 1-1,5 месяцев, как правило, рост прекращался, корни темнели и отмирали. Нарастания изолированных корней, регенерировавших из каллуса, также не происходило. Прямая регенерация из корневых эксплантов также не была отмечена ни на средах с НУК и ИМК, ни при введении БАП (0,44; 1,78; 2,22; 4,4; 8,9; 13,3 мкМ).

Помещение высечек корней *Y. torreyi* на среду МС + 2,22 мкМ БАП + 18,1 мкМ 2,4-Д индуцировало нарастание каллуса только у 9 % эксплантов. Каллусогенез отличался низкой интенсивностью и происходил по всей длине экспланта. Спустя месяц образование каллуса постепенно прекращалось и не возобновлялось при пассировании на свежие питательные среды. Реализация гемморизогенеза или эмбриоидогенеза в каллусе корневого происхождения у исследованных нами видов не отмечена.

Таким образом, реализация морфогенетических потенций тканей и органов *Y. torreyi* и *Y. aloifolia* зависела от целого ряда факторов. Основными из которых являлись: тип первичного экспланта, состав питательной среды, концентрация и соотношение регуляторов роста, продолжительность культивирования и количество пассажей.

Адвентивное побегообразование

В отличие от непрямого морфогенеза, прямое образование почек, минуя каллусогенез, обеспечивает генетическую однородность растений и позволяет избежать появления соматической изменчивости [5, 8]. Как было показано, в результате ранее проводившихся исследований [12, 15, 19, 20, 25, 26, 32], закладка адвентивных побегов в культуре изолированных побегов *Yucca sp.* чаще всего достигается при совместном использовании БАП и низкой концентрацией ауксина.

В результате подбора оптимальных условий культивирования, времени взятия первичного экспланта, подбора питательных сред (МС, QL) и соотношения фитогормонов (ИМК, НУК, БАП), нами были разработаны три способа индукции закладки придаточных почек в культуре *Y. torreyi*

При первом способе изолированные зародыши высаживали на среду QL, содержащую 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК. На этой среде закладка адвентивных почек начиналась сразу после прорастания зародыша. Сначала происходило формирование основного побега, а затем у его основания закладывались адвентивные почки (1-6 шт.) без образования корней (рис. 5, а). При последующих пассажах аналогичную закладку адвентивных почек наблюдали и в основании множественных побегов. Для данного способа было характерно очень незначительное каллусообразование между множественными побегами в местах соприкосновения с питательной средой. Нарастание каллуса в основании побегов оказывало угнетающее влияние на адвентивное побегообразование, поэтому при последующих пассажах каллус удаляли.

При втором способе изолированные зародыши высаживали на среду QL, содержащую 8,9 мкМ БАП и 1,97 мкМ ИМК. При этом происходило образование единичных микропобегов и активное нарастание каллуса в основании побегов. Ризогенез не наблюдали. Пассирование побегов на среду QL, дополненную 8,9 мкМ и 2,15 мкМ НУК, вызывало активную закладку адвентивных почек (от 2 до 14 шт.). Образование почек при условии предварительного субкультивирования на среде QL, дополненной 8,9 мкМ БАП и 1,97 мкМ ИМК, было более эффективным по сравнению с первым способом, а развивающиеся побеги (рис. 5, б)

отличались большей силой роста. Способность к активной закладке придаточных почек и высокая сила роста сохранялись и при дальнейшем пассировании на среде QL, дополненной 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК. После нескольких пассажей каллусообразование в основании побегов заметно снижалось.

Третий способ клонального микроразмножения *Y. torreyi* был разработан на основе среды, содержащей макро- и микросоли по Мурасиге и Скугу [31]. При этом изолированные зародыши высаживали на среду МС, не содержащую фитогормоны. Через две недели после прорастания зародышей и образования растений с розеткой из двух-трех листьев, эпикотель переносили на среду МС, содержащую 0,54 мкМ НУК и 4,4 мкМ БАП. На данной среде происходила активная закладка адвентивных почек (2-10 шт.), в дальнейшем развивавшихся в полноценные побеги. (рис. 5, в). Для этого пути характерно отсутствие оводненности листьев, а также нарастание плотного каллуса в месте контакта побегов с питательной средой, не затрагивающего розетки листьев.



Рис. 5. Адвентивное побегообразование в культуре изолированных побегов *Y. torreyi* а - на среде QL, содержащей 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК; б - на среде QL, содержащей 8,9 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК, после субкультивирования на среде QL + 8,9 мкМ БАП + 1,97 мкМ ИМК; в - на среде Мурасиге и Скуга, содержащей 4,4 мкМ БАП и 0,54 мкМ НУК

При работе с *Yucca aloifolia*, из-за меньших размеров семян, извлечение зиготических зародышей было значительно затруднено. Поэтому, оптимальным первичным эксплантом являлись семена, полученные в условиях интродукции. Все дальнейшие исследования проводились на эпикотелях проростков, полученных *in vitro* на безгармональной питательной среде МС. Апробация питательных сред, разработанных для индукции адвентивного побегообразования в культуре эпикотеля *Y. torreyi*, показала их неэффективность применительно к *Y. aloifolia*. Поэтому была проведена работа по подбору питательных сред и условий культивирования применительно к данному объекту исследования.

За основу была взята питательная среда QL [36], хорошо зарекомендовавшая себя при работе с *Y. torreyi*. Эпикотили помещались на питательную среду QL, содержащую 2,15 мкМ НУК и различные концентрации БАП (2,22; 4,4; 6,62; 8,9; 24,42 мкМ). При этом рост изолированных эпикотилей наблюдался в диапазоне концентрации БАП от 2,22 до 24,42 мкМ, а адвентивное побегообразование – исключительно в диапазоне концентраций от 4,4 до 8,9 мкМ БАП. Причем, более интенсивным оно было на питательной среде, дополненной 6,62 мкМ БАП и 2,15 мкМ НУК. При понижении концентрации НУК до 0,215 мкМ и добавлении БАП в концентрациях равных 2,22, 4,4 и 6,62 мкМ, адвентивное побегообразование было отмечено только на питательной среде, содержащей 6,62 мкМ БАП.

Понижение концентрации НУК с 0,215 до 0,107 мкМ, а также замена НУК на ИМК, ИУК или 2,4-Д в концентрациях эквивалентных 2 мг/л, показало, что более активное побегообразование происходило на питательной среде QL, дополненной 8,9 мкМ БАП и 0,098 мкМ ИМК. Питательная среда QL, содержащая 6,62 мкМ БАП и 0,107 мкМ НУК, оказалась не эффективной для адвентивного побегообразования. В дальнейшем, при повышении

концентрации НУК, ИМК, ИУК и 2,4-Д до концентрации эквивалентной 0,04 мг/л (0,215 мкМ НУК, 0,197 мкМ ИМК, 0,228 мкМ ИУК, 1,81 мкМ 2,4-Д) на фоне 6,62 мкМ БАП, адвентивное побегообразование отмечали только на питательных средах, содержащих НУК и ИМК. При этом коэффициент микроразмножения (K) был выше на питательной среде с НУК ($K=0,8$), чем на среде, содержащей ИМК ($K = 0,73$). Хотя, частота регенерации (R) в последнем случае была выше – 42,3 % против 29,3 % в варианте с НУК.

Также было исследовано влияние на адвентивное побегообразование разбавления питательной среды QL в два раза ($\frac{1}{2}$ QL). При этом, значение pH, концентрации сахарозы, мезоинозитола и регуляторов роста оставались неизменными. Адвентивное побегообразование происходило только на питательной среде $\frac{1}{2}$ QL дополненной 6,62 мкМ БАП и 0,197 мкМ ИМК ($K = 0,4$; $R = 40\%$). Во всех других вариантах (6,62 мкМ БАП / 0,215 мкМ НУК, 6,62 мкМ БАП / 0,228 мкМ ИУК; 6,62 мкМ БАП / 0,181 мкМ 2,4-Д), адвентивное побегообразование не наблюдали.

При применении питательной среды QL, содержащей 6,62 мкМ БАП и 0,322 мкМ НУК, максимальное число адвентивных побегов *Y. aloifolia* достигало семи при ($K = 0,83$; $R = 56,5\%$) (рис. 6). При этом замена НУК на ИМК оказалась менее эффективной ($K = 0,38$; $R = 40\%$).



Рис. 6. Адвентивное побегообразование *Y. aloifolia* на питательной среде QL, дополненной 6,62 мкМ БАП и 0,322 мкМ НУК

Дальнейшая работа по оптимизации питательных сред показала, что в случае с *Y. aloifolia* наиболее эффективное адвентивное побегообразование происходило на питательных средах QL, дополненных 6,62 мкМ БАП и 0,43 мкМ НУК (max – 8 побегов; $K = 0,95$; $R = 64,2\%$) и 6,62 мкМ БАП и 0,54 мкМ НУК (max – 7 побегов; $K = 1,04$; $R = 76\%$). Дальнейшее увеличение концентрации НУК вызывало гипертрофию и каллусогенез.

Ризогенез

В случае с *Y. torreyi* для индукции ризогенеза было достаточно перенести микропобеги на безгормональные питательные среды, содержащие полный или половинный состав макро- и микросолей МС, или QL. Недостатком данного способа являлся длительный период (около месяца), проходящий от момента посадки до начала ризогенеза. В отдельных случаях ризогенез вообще не наблюдали. Наиболее эффективным оказалось использование для укоренения микропобегов *Y. torreyi* питательной среды МС, содержащей 1,07 мкМ НУК. В этом случае к началу второй недели с момента пассажа наблюдали образование корней нормальной морфологии.

Применение данной питательной среды для укоренения *Y. aloifolia* не способствовало стабильному ризогенезу. Поэтому была проведена работа по подбору оптимальной питательной среды для укоренения микропобегов данного вида. Во всех работах по клональному микроразмножению представителей рода *Yucca* успешное укоренение микропобегов достигалось на различных модификациях питательной среды МС [12, 13, 15,

27, 32]. Поэтому для укоренения *Y. aloifolia* именно эта питательная среда была выбрана нами за основу при подборе оптимального соотношения и концентрации регуляторов роста.

Обычно для укоренения микропобегов используют ИУК, ИМК и НУК. 2,4-Д стимулирует ризогенез только в очень низких концентрациях, часто не влияет на укоренение или оказывается токсичным для растения [10]. Хорошо зарекомендовали себя смеси ауксинов. Так, комбинация из ИУК и ИМК, как правило, оказывает больший эффект, чем использование этих стимуляторов по отдельности. При этом комбинация ИМК, НУК и 2,4-Д дает значительно более сильный ризогенный эффект, чем раздельное использование этих регуляторов роста [17].

В опытах с микропобегами *Y. aloifolia*, были испытаны как отдельные регуляторы роста, так и их комбинации (табл. 2). Контролем служила питательная среда МС без регуляторов роста. Ризогенез был отмечен на шестой день на питательных средах, содержащих 4,9 мкМ ИМК и 2,85 мкМ ИУК + 2,46 мкМ ИМК. На 30-й день ризогенез был отмечен на питательных средах: МС + 5,71 мкМ ИУК, МС + 4,9 мкМ ИМК, МС + 2,85 мкМ ИУК + 2,46 мкМ ИМК, МС + 4,83 мкМ НУК + 0,45 мкМ 2,4-Д, а также на контрольной среде МС, не содержащей регуляторы роста (табл. 2).

Таблица 2

Укоренение микропобегов *Y. aloifolia* L. и их морфология под воздействием различных ауксинов (спустя 30 суток от начала культивирования)

Среда	Количество побегов			Нарастание каллуса в основании побега		Хлороз	
	укоренившихся, %	общее, шт.	укоренившихся, шт.	+/-	% побегов	+/-	к-во хлоротичных листьев, шт.
К (МС)	83,3	12	10*	-	0	+	4±2
5,71 мкМ ИУК	12,5	16	2	-	0	+	2±2
5,37 мкМ НУК	0	20	0	+	70	+	3,5±1,5
4,9 мкМ ИМК	70,5	17	12	-	0	+	1±1
4,52 мкМ 2,4-Д	0	17	0	+	100	+	2±2
2,85 мкМ ИУК + 2,69 мкМ НУК	0	21	0	+	100	+	2±2
2,85 мкМ ИУК + 2,46 мкМ ИМК	36,4	22	8	-	0	+	1,5±1,5
2,69 мкМ НУК + 2,46 мкМ ИМК	0	21	0	+	42,9	+	1,5±0,5
5,14 мкМ ИУК + 0,45 мкМ 2,4-Д	0	18	0	+	38,9	+	2±2
4,83 мкМ НУК + 0,45 мкМ 2,4-Д	12,5	16	2	+	33,3	+	2,5±2,5
4,43 мкМ ИМК + 0,45 мкМ 2,4-Д	0	18	0	+	100	+	1,5±1,5

* - недоразвитые корни

Наибольшее количество микропобегов (83,3%) укоренялось на контрольной среде МС, не содержащей регуляторы роста. Однако качество регенерантов было низким и растения погибали на этапе адаптации. Лучшей для укоренения микрочеренков *Y. aloifolia* оказалась среда МС, дополненная 4,9 мкМ ИМК. На данной питательной среде отмечали высокий процент укоренившихся микропобегов (70%) и высокое качество полученных растений. При увеличении концентрации ИМК с 4,9 мкМ до 9,8 мкМ вместо ризогенеза наблюдалось активное нарастание каллуса.

Существенное влияние на укоренение микропобегов также оказывала интенсивность освещения. Нормальный ризогенез наблюдали в диапазоне от 800-1200 лк. При увеличении

интенсивности освещения до 2000 лк происходило нарастание каллуса в основании микропобегов и полное подавление ризогенеза.

Выводы

Таким образом, высоким морфогенетическим потенциалом обладали изолированные зиготические зародыши, реализовывавшие все три пути морфогенеза, а низким – экспланты корней. Листовые экспланты также показали высокий морфогенетический потенциал, но реализация его происходила только через каллусогенез, при этом индукция образования морфогенных структур из листового каллуса происходила достаточно трудно, чем в каллусе, индуцированном из зиготических зародышей.

Полученные нами результаты подтвердили данные литературы о том, что решающим фактором при индукции каллусных культур растений рода *Yucca*, вне зависимости от первичного экспланта и видовой принадлежности, является присутствие в питательной среде 2,4-Д [3, 4, 9, 12, 20, 24, 29, 33-35, 40]. Так, у исследованных видов оптимальной питательной средой для индукции каллуса, вне зависимости от типа первичного экспланта оказалась питательная среда МС, дополненная 2,22 мкМ БАП и 18,1 мкМ 2,4-Д. Наряду с этим, высоким морфогенетическим потенциалом обладали каллусы, полученные от зиготических зародышей и листовых эксплантов, при работе с которым удалось индуцировать геммогенез, гемморизогенез и соматический эмбриогенез. Несмотря на это, получить растения рода *Yucca* путем регенерации из каллуса пока не удается. Анализ литературы также показал, что в отношении других исследованных видов рода *Yucca* подобные данные пока отсутствуют.

Размножение юкк путем индукции закладки придаточных побегов на данный момент представляется наиболее перспективным и реализовано на примере шести видов рода [12, 13, 15, 20-21, 22, 32]. В таблице 3 представлены сводные данные по результатам наших исследований и данных литературы, отображающие основные характеристики питательных сред для индукции адвентивного побегообразования в культуре изолированных побегов *Yucca* sp.

Таблица 3

Питательные среды и соотношения регуляторов роста использовавшиеся для индукции адвентивного побегообразования (по данным литературы и результатам исследований)

Вид	Питательная среда	БАП	Ауксин	Источник информации
<i>Y. aloifolia</i>	МС	4,4-17,8 мкМ БАП 1,1-4,5 мкМ (TDZ)	1,1-2,7 мкМ НУК 0,5-1,1 мкМ НУК	[13]
	QL	6,62 мкМ	0,266-0,44 мкМ НУК	результаты исследований
<i>Y. elephantipes</i>	МС	4,4 мкМ	-	[32]
<i>Y. glauca</i>	МС	4,4-8,9 мкМ	3,2 мкМ НУК	[15]
<i>Y. torreyi</i>	QL	8,9 мкМ	2,15 мкМ НУК	результаты исследований
	МС	4,4 мкМ	0,54 мкМ НУК	результаты исследований
<i>Y. schidigera</i>	МС	1,33 мкМ	-	[20]
<i>Y. valida</i>	МС	5-20 мкМ	1 мкМ ИУК	[12]

Как видно из таблицы 3, основным фактором индукции адвентивного побегообразования в культуре *Yucca* sp., как правило, является присутствие в питательной среде БАП в концентрации от 1,33 до 20 мкМ на фоне низкой концентрации НУК (0,266-3,2 мкМ). Также имеются данные о возможности индукции адвентивного побегообразования у *Y. aloifolia* с применением TDZ в комбинации с НУК [13]. И, хотя, многие вопросы еще остаются открытыми, наработанный рядом исследователей экспериментальный материал и результаты

данных исследований позволяют составить общую схему размножения представителей рода *Yucca* (рис. 7), применимую при массовом размножении на основании реализации морфогенетической программы индукции адвентивного побегообразования в культуре изолированных побегов.

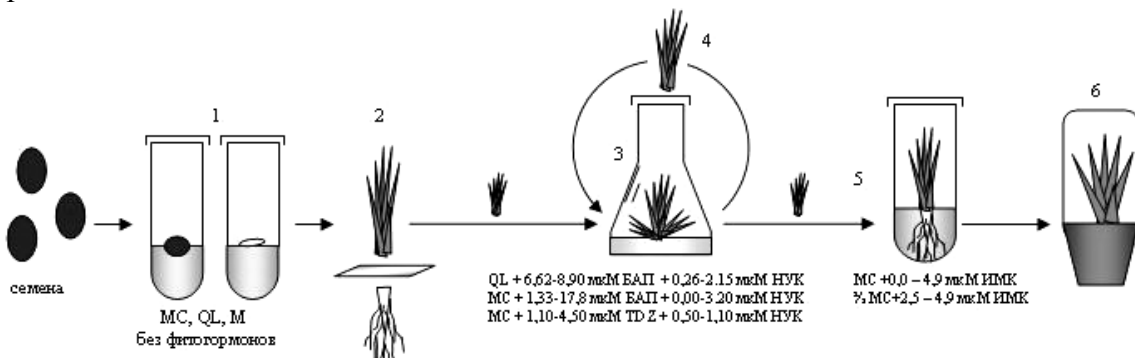


Рис. 7. Общая схема клонального микроразмножения представителей рода *Yucca* L. 1 – культура изолированных семян и зиготических зародышей; 2 – отделение эпикотеля; 3 – культивирование эпикотеля на питательных средах для адвентивного побегообразования; 4 – культивирование дочерних побегов на средах для массового клонального микроразмножения; 5 – укоренение микропобегов на средах, стимулирующих ризогенез; 6 – адаптация растений-регенерантов

Список литературы

1. А.с. №515498. СССР, кл. А 01 Н 1/02. Способ искусственного опыления растений *Yucca spp.* L. / Голубев В.Н., Максимов А.П., Волокитин Ю.С., Новикова В.М. (СССР). Оpubл. 1973.
2. Анисимова А.И., Воинов В.Г., Клайда Ф.К., Чернова Н.М., Эггерс Е.В. Деревья и кустарники // Труды Гос. Никит. ботан. сада. – 1939. – Т. 22, Вып. 2. – С. 115.
3. Гогоберидзе М.К., Мамаладзе М.Н. Изучение влияния компонентов среды на рост ткани бутонов юкки славной // Сообщения АН ГССР. – 1980. – Т. 10, № 2. – С. 477.
4. Гогоберидзе М.К., Мамаладзе М.Н., Джаошвили М.Р., Каранова С.Л., Пхеидзе Т.А., Сулаквелидзе Ц.П. Характеристика суспензионной культуры клеток *Yucca gloriosa* L. // Физиология растений. – 1988. – Т. 35, Вып. 2. – С. 378-384.
5. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
6. Максимов А.П., Новикова В.М., Карпов П.А. Перспективы размножения юкки крупноплодной (*Yucca macrocarpa* Engelm.) в условиях интродукции // Ботанические сады – центры сохранения биологического разнообразия мировой флоры: Сессия Совета ботан. садов Украины, 13-16 июня, 1995, Ялта, Украина. Тез. докл. – Ялта. – 1995. – С. 136.
7. Максимов А.П., Мухортова Т.Г., Новикова В.М., Кузнецов В.Н. Биоэкологические характеристики и качество семян видов *Yucca* (Dill.) интродуцированных в Крым // Растительные ресурсы. – 1988. – Т. 24, № 2. – С. 230-237.
8. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.
9. Месхи А.Б., Гогоберидзе М.К., Кацитадзе П.К. Культура тканей юкки славной – *Yucca gloriosa* // Изв. АН ГССР. Сер. биол. – 1978. – Т. 4, № 1. – С. 79.
10. Полевой В.В. Физиология растений: Учеб. для биол. спец. вузов. – М.: Высшая школа, 1989. – 464 с.
11. Руссанов Ф.Н. Новые взаимосвязи в новых условиях жизни на примере юкки // Узбекистон Биология журнали / Узбекский биологический журнал. Изд-во Академии Наук Узбекской ССР. – 1959. – № 5. – С.54-57.

12. Arce-Montoya M., Rodríguez-Álvarez M., Hernández-González J.A., Robert. M.L. Micropropagation and field performance of *Yucca valida*. // Plant Cell Rep. – 2006. – Vol. 25. – P. 777-783.
13. Atta-Alla H., Van Staden J. Micropropagation and establishment of *Yucca aloifolia*. // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1997. – Vol. 48, N 3. – P. 209-212.
14. Baker H.G. Yuccas and Yucca Moths – a historical commentary. // Annals of Missouri Botanical Garden. – 1986. – Vol. 73, N 3. – P.556-564.
15. Bentz S.E., Parlman B.J., Talbott H.J., Ackerman W.L. Factors affecting *in vitro* propagation of *Yucca glauca*. // Plant Cell Tiss. Org. Cult. – 1988. –Vol. 14. – P. 111-120.
16. Davis D.R. 1967. A revision of the moths of subfamily Prodoxinae (Lepidoptera: Incurvariidae). U.S. Natl. Mus. Bull. N.255. Smithsonian Institution, Engelmann G. George Engelmann's Notes on the Pollination of *Yucca*. // Annals of Missouri Botanical Garden. – 1974. – Vol. 61. – P. 907.
17. Hartmann H.T. & D.E. Kester Plant propagation. Principles and practices. 4th edition. – Prentice-Hall Inc.: Englewood Cliffs, 1983. – 727 p.
18. Hostettmann K. and Marston A. Saponins. – Cambridge: Cambridge University Press, 1995. – 548 p.
19. Jones O.P., Hopgood M.E., O'Farrel D. Propagation *in vitro* of M 26 apple rootstocks. // J. of Horticultural Science. – 1977. – Vol. 52. – P. 235-238.
20. Kaneda N., Nakanishi H., Staba J.E. Steroidal constituents of *Yucca schidigera* plants and tissue culture // Phytochemistry. – 1987. – Vol. 26. – P. 1425-1429.
21. Karpov P.A. Clonal propagation of *Yucca aloifolia* L. // Acta Universitatis Latviensis. Biology. – 2004. – Vol. 676. – P.177-182.
22. Karpov P.A. Features of clonal micro propagation of Torrey Yucca. // Plant Physiol. Biochem. – 2000. – Vol. 38. – P. 19.
23. Kausch A.P. and Horner H.T. Differentiation of raphide crystal idioblasts in isolated root cultures of *Yucca torreyi* (Agavaceae) // Can. J. Bot. – 1984. –Vol. 62. – P. 1474-1484.
24. Khanna S.C., Purohit P.V. Studies of steroidal sapogenins from *Yucca alaeifolia* L. // Basic Life Sciences / Eds. Sen S.K., Giles K.L. – New York: Plenum Publ., 1983. – Vol. 22. – P. 65-69.
25. Kukuczanka K. and K.D. Kromer. Regeneracja *Yucca* sp. z rozmnożeń w kulturze *in vitro*. // Acta Univ. Wratisl.: Pr. Bot. – 1984. – N.30. – P.39-48.
26. Litz R.E. and R.A. Conover. Tissue culture propagation of some florage plants. // Proceedings of the Florida State Horticultural Society. – 1978. –Vol. 90. – P. 301-303.
27. MacCarthy J.J. and Staba E.J. Morphogenesis in *Yucca schidigera* Roezl. Root organ cultures // Ann. Botany. - 1985 – Vol. 56. – N 2. – P. 205-210.
28. McKelvey S.D. Yuccas of Southwestern United States. Part II. – Massachusetts. USA: Publ. Arnold Arboretum of Harvard Univ.: Jamaica Plants. Mass. – 1947. – P. 1-193.
29. Meskhi A.B., Gogoberidze M.K., Katsitadze K.P. Tissue culture of *Yucca gloriosa*. // Chem Abstr. – 1978. – Vol. 89. – P.358-359.
30. Monnier M. Comparison development of unripe embryos of *Capsella Bursa-pastoris* *in vitro* and *in situ*. // Bull. Soc. bot. France. – 1968. – Vol. 115. – P. 15-29.
31. Murashige T., Skoog T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Plant Physiol. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473-497.
32. Pierik R.L.M., Steegmans H.H.M. Vegetative propagation of a chimerical *Yucca elephantipes* Regel *in vitro* // Sci. Hort. – 1983. – Vol. 21. – P. 261-272.
33. Quintero A., Rosas V., Zamudio F., Capella S., Romo de Vivar A. Tissue culture of *Yucca filifera* cells. Identification of steroidal precursors // Tissue culture / Ed. Fujiwara A. – Japan: Maruzen, 1982. – P. 295-296.
34. Quintero A. *Yucca* // Hand book of plant cell culture. Ornamental Species / Eds. Ammirato P.V., Evans D.R., Sharp W.R., Bajaj Y.P.S. – New York: McGraw-Hill Publishing Co., 1983. – P. 783-799.

35. Quintero A., Zamudio F., Rasas V., Capella S., Romode Vivar A. Sarsasapogenin in *Yucca filifera* callus culture // Rev. Latinoam Quim. – 1987. – Vol. 18. – P. 24-28.
36. Quorin M. and P. Lepover. Etude de milieux adaptés aux cultures aux cultures *in vitro* de *Prunus* // Acta Hort. – 1977. – Vol. 78. – P. 437.
37. Robert M.L., Herrera J.L., Contreras F., Scorer K.N. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem (Henequen) // Plant Cell Tissue Organ Cult. – 1987. – Vol. 8. – P. 37-48.
38. Romo de Vivar A. Productos naturales de la flora Mexicana. – Mexico: Editorial Limusa, 1985. – P. 194-202.
39. Rout G.R., Mohapatra A., Mohan Jain S. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects // Biotechnology Advances. – 2006. – Vol. 24. – P. 531-560.
40. Stohs S.J., Sabatka J.J., Obrist J.J., Rosenberg H. Sapegenins of *Yucca glauca* tissue culture. // Lloydia. – 1974. – Vol. 37. – P. 504-505.
41. White P.R. A handbook of plant tissue culture. – New York: Jacques Cattell Press, 1943. – Vol. 4. – P. 791-794.
42. White P.R. The cultivation of plant and animal cells. 2nd ed. - New York: The Roland Press, 1963. – 239 p.

Tissue and organ culture of *Yucca* L.

Karpov P.A.

The optimal nutrient mediums and concentrations of growth regulators providing an effective cultivation of the isolated seeds and zygotic embryos of *Yucca torreyi* and *Y. aloifolia*, axillary microshoots regeneration, rooting, callus formation and realisation of different ways of morphogenesis have been determined. The literature review regarding the *in vitro* cultivation and micropropagation of yuccas have been provided. Based on literature data and results of individual experimental studies the general diagram of clonal micropropagation of representatives of the genus *Yucca* L. have been done.