

8. Eriksen B., Tupel M.H. Molecular phylogeography and hybridization in members of the circumpolar *Potentilla* sect. *Niveae* (Rosaceae) // Amer. J. of Bot. – 2006. – V. 93, N 3. – P. 460-469.
9. Gabrielsen T.M., Brochmann C. Sex after all: high levels of diversity detected in the arctic clonal plant *Saxifraga cernua* using RAPD-markers // Molecular ecology. – 1998. – V. 7. – P. 1701-1708.
10. Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia* / Gabrielsen T.M., Bachmann K., Jakobsen K.S., Brochmann C. // Mol. ecology. – 1997. – V. 6. – P. 831-842.
11. Gregor V.T., Vechta, J. R., Weising K. RAPD-Untersuchungen und Chromosomenzählungen in der *Potentilla collina*-Gruppe (Rosaceae) // Ber. Bayer. Bot. Ges. Kassel. – 2003. – V. 72. – 159-167.
12. Hansen K. T., Elven R., Brochmann C. Molecules and morphology in concert: tests of some hypotheses in arctic *Potentilla* (Rosaceae) // Am. J. Bot. – 2000. – V. 87. – P. 1466-1479.
13. Hombergen E.J., Bachmann K. RAPD mapping of three QTLs determining trichome formation in *Microseris* hybrid H27 (Asteraceae: Lactuceae) // Theor. App. Genet. – 1995. – V. 90, N 6. – P. 853-858.
14. Martins M., Tenreiro R., Oliveira M.M. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR-markers // Plant Cell Rep. – 2003. – V. 22. – P. 71-78.
15. Nei M., Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // PNAS. – 1979. – V. 76, N 10. – P. 5269-5273.
16. Roy A., Bandyopadhyay A., Mahapatra A.K. Evaluation of genetic diversity in jute (*Cochchorus* species) using STMS, ISSR and RAPD-markers // Plant Breeding. – 2006. – V. 125. – P. 292-297.
17. Zhang J.Y., Yuan Q.H., Meng Y.Q. A genetic diversity analysis of wild *Lespedeza* populations based on morphological characters, allozyme and RAPD-methods // Plant Breeding. – 2007. – V. 126. – P. 89-94.

## **КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ И СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ У ЭФИРОМАСЛИЧНЫХ РАСТЕНИЙ**

Н.А. ЕГОРОВА, кандидат биологических наук;  
 И.В. СТАВЦЕВА, кандидат сельскохозяйственных наук;  
 А.Г. ИНЮТКИНА, Л.Н. ЧУБ, А.А. ЛОЛОЙКО

Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН, Симферополь, Украина

### **Введение**

Селекция большинства эфиромасличных растений в основном ведется с использованием традиционных методов гибридизации и отбора, которые не всегда позволяют получать достаточно разнообразный исходный материал, отвечающий современным требованиям производства. Внедрение в селекционный процесс новых биотехнологических подходов позволяет существенно повысить его эффективность и конструировать генотипы на базе клеточной и генной инженерии, что было успешно продемонстрировано для ряда сельскохозяйственных растений [2, 5, 6].

Один из наиболее эффективных и относительно простых методов создания исходного селекционного материала основан на использовании сомаклональной изменчивости культивируемых *in vitro* соматических клеток. Разработка этого направления для эфиромасличных растений весьма перспективна и связана, прежде всего, с оптимизацией условий длительного пассирования каллусных тканей и регенерации из них растений. В литературе имеется небольшое количество работ, посвященных исследованию процессов каллусо- и морфогенеза у отдельных эфиромасличных растений [8-12]. Однако для

основных возделываемых в Украине видов и сортов этой группы растений остаются не изученными многие методические вопросы, касающиеся оптимизации условий получения регенерантов в культуре изолированных тканей. Кроме того, очень важен анализ потомства полученных в культуре *in vitro* регенерантов для выявления возникающих сомаклональных изменений.

Целью проводимых исследований было изучение каллусо- и морфогенеза у некоторых эфиромасличных растений и анализ полученных регенерантов.

### **Объекты и методы исследования**

Материалом для исследований служили ткани и органы эфиромасличных растений: лаванды – сорта Степная, Синева, Ранняя, Крымчанка, Вдала (*Lavandula angustifolia* Mill.); шалфея – сорта С-785, С-1122 (*Salvia sclarea* L.); кориандра – сорта Янтарь, Ранний, Нектар (*Coriandrum sativum* L.); фенхеля – сорт Мэрцишор (*Foeniculum vulgare* Mill.); герани – сорт Розовая (*Pelargonium roseum* Willd.); полыни эстрагон (*Artemisia dracunculus* L.) и тысячелистника (*Achillea filipendulina* Lam.; *A. millefolium* L.).

В качестве эксплантов для получения каллусных культур использовали сегменты стеблей, листьев, черешков, соцветий, зародыши и меристемы. Культивирование проводили на различных модификациях среды Мурасиге и Скуга с применением традиционных методов культуры тканей [4]. Пассирование каллуса осуществляли каждые 30-40 сут. Каллусные ткани культивировали при + 26°C, 70%-ной влажности и освещенности 600 люкс, а при индукции морфогенеза – при освещенности 2-3 тыс. люкс с 16-часовым фотопериодом. Потомство полученных регенерантов изучали в полевых условиях в научном севообороте ИЭЛР (с. Крымская Роза Белогорского района АРК). Полученные данные обрабатывали с применением традиционных методов математической статистики на компьютере, используя пакет программ Microsoft Office XP.

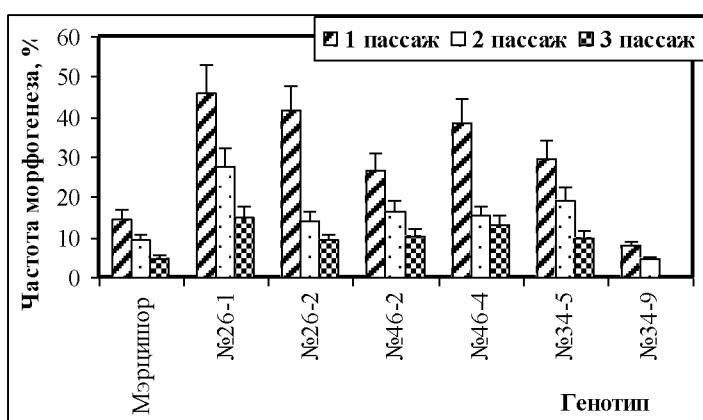
### **Результаты и обсуждение**

Получение каллусных тканей для всех изученных нами видов растений не представляло значительной сложности, при этом было показано, что частота каллусообразования и ростовой индекс каллуса при его длительном культивировании зависели от генотипа, типа экспланта, гормонального состава среды, пассажа и режимов культивирования. Максимальный индекс роста каллусной ткани был отмечен у лаванды (более 18-20), а минимальный – у фенхеля и тысячелистника (до 5-8), тогда как у остальных изученных видов этот показатель был в пределах 12-16. У большинства изученных видов (лаванда, шалфей, фенхель, герань) прирост массы каллуса достоверно не отличался при различных режимах освещения, а у полыни – был в 1,7 раза выше при освещенности 2-3 тыс. люкс по сравнению с культивированием без освещения или при 600 люкс.

Показано, что у всех изученных нами видов возможна индукция морфогенеза из каллусных культур и регенерация растений. Частота регенерации *in vitro* зависела от генотипа, типа экспланта, состава среды и длительности пассирования каллуса. Были оптимизированы питательные среды и подобраны типы эксплантов для индукции морфогенеза и получения проростков. Эмбриогенные каллусные ткани у кориандра были получены из генеративных органов (соцветий и завязей), а у фенхеля – из стеблевых сегментов и зародышей. У лаванды формирование побегов происходило в каллусных культурах, полученных из листьев и меристем, у шалфея – в каллусах из меристем или основания микрочеренков, у полыни – в каллусах из листьев и стеблей, а у тысячелистника – из листового каллуса. У герани все проанализированные экспланты (стебель, черешок и листовая пластинка, цветок) образовывали каллус, способный к индукции морфогенеза при переносе на регенерационную среду. Для ряда видов было установлено, что высокая частота морфогенеза наблюдалась при использовании в качестве эксплантов меристем или зародышей. Так, у лаванды сорта Степная максимальная частота морфогенеза из листового

каллуса была 45,5%, а из меристемного – 90,9%. У фенхеля сорта Мэрцишор у каллусов стеблевого происхождения этот показатель достигал 31,8%, а у каллусов, полученных из меристем, – 94,5%.

Для получения сомаклональных вариантов важно регенерировать растения из длительно культивируемых каллусных тканей, поскольку при их пассировании возрастает генетическая изменчивость клеток, и следовательно, вероятность возникновения измененных форм [2, 5]. Индукиция морфогенеза у изученных нами видов в значительной степени лимитировалась длительностью культивирования каллуса. У большинства видов и сортов регенерация растений *in vitro* ограничивалась 3-4 пассажами. Только у герани каллусные ткани обладали способностью к индукции морфогенеза при переносе на среду для регенерации в течение трех лет культивирования. Установлено, что у лаванды, кориандра и шалфея иногда формировались штаммы, сохраняющие морфогенетические потенции при культивировании в течение 1-2-х лет. Следует отметить, что у всех изученных видов при увеличении длительности культивирования наблюдали снижение частоты морфогенеза, что показано на примере каллусной ткани фенхеля 1-3-го пассажей (рис.).



**Рис. Влияние генотипа и пассажа на индукцию морфогенеза в каллусных культурах фенхеля**

Выявлена значительная сортовая вариабельность по способности каллусных культур к регенерации *in vitro*, при этом у некоторых сортов или образцов при испытанных условиях не наблюдали морфогенез. Так, у лаванды из 7 изученных сортов и селекционных образцов только у пяти в листовом каллусе отмечали формирование почек и побегов с частотой от 7,8 до 47,8%. Аналогичные закономерности были выявлены у полыни, кориандра и тысячелистника.

Частота индукции каллусо- и морфогенеза зависели не только от сорта, но и генотипа индивидуального донорного растения. В частности, у фенхеля было показано, что растения в пределах одного сорта Мэрцишор варьировали не только по частоте каллусогенеза (от 0 до 100%), но и по частоте соматического эмбриогенеза (от 0 до 54,5%).

Установлено, что у некоторых эфиromасличных растений (лаванды, тысячелистника, фенхеля, кориандра) при использовании в качестве донорных растений-регенерантов происходило повышение частоты индукции морфогенеза в каллусной культуре. В частности, у фенхеля показано, что при получении каллусов из регенерантов не только повышалась в 2-4 раза частота морфогенеза, но и продлевалась до 5-9 пассажа их способность к регенерации по сравнению с исходным сортом. Как видно из представленных данных, частота морфогенеза в 1-3 пассажах в каллусных тканях, полученных из регенерантов (№№ 26-1; 26-2; 46-2; 46-4; 34-5) в несколько раз выше, чем у сорта Мэрцишор (рис.). Однако при общем повышении морфогенетического потенциала среди регенерантов изредка обнаруживались образцы (№ 34-9) с низкой способностью к морфогенезу (рис.). У люцерны и подсолнечника также были получены данные о более высокой регенерационной способности регенерантов по сравнению с исходными генотипами [1, 7].

Полученные в культуре каллусных тканей регенеранты у изученных нами видов растений отличались от исходных сортов по многим морфологическим признакам. Среди

регенерантов  $R_o$ , особенно полученных из каллусов 6-10 пассажей, иногда встречались растения со слабым ростом, нежизнеспособные, с пониженной fertильностью. Большинство этих негативных изменений были эпигенетическими и исчезали в следующем поколении, что, судя по литературным данным, характерно и для некоторых других видов растений [2, 6].

Изучение вегетативного потомства регенерантов герани показало наличие большого числа морфологически измененных форм (до 33-56%), которое зависело от сорта и типа экспланта, при этом число сомаклонов возрастало с увеличением количества пассажей [3]. Следует отметить, что у одного сомаклона могли быть измененными сразу несколько признаков – например, форма и окраска листа и толщина стебля. Кроме того, была выявлена значительная вариабельность регенерантов по числу хромосом и основным хозяйствственно ценным признакам. У герани, в отличие от других изученных нами видов, отмечена значительная вариабельность по качественному составу эфирного масла. Так, содержание одного из основных компонентов – цитронеллола варьировало у разных образцов от 5,6 до 61,4%; выделялись также хемотипы с высоким содержанием гераниола, ментона [3].

У лаванды до 23 % регенерантов имели морфологические отклонения по сравнению с исходными сортами, что проявлялось в изменении окраски и размеров листьев, длины соцветия, количества цветков; появлении утолщенных антоциановых побегов, укороченных междуузлий. Наблюдали также вариабельность некоторых хозяйствственно полезных признаков. Однако значительной изменчивости по компонентному составу эфирного масла, как это было показано для регенерантов *L. vera* [12], среди изученных нами образцов не выявлено.

Анализ семенного потомства регенерантов кориандра позволил выявить образцы, отличающиеся от исходного сорта Янтарь по высоте растений, форме листьев, окраске стебля и цветков, количеству соцветий, а также «кустистые» формы с увеличенным числом побегов. Варьировали и некоторые хозяйствственно ценные признаки (масса плодов, урожайность, массовая доля эфирного масла). У шалфея семенное потомство регенерантов также проявило большую изменчивость по морфологии (форме куста и листьев, окраске венчика) и некоторым количественным признакам по сравнению с сортом С-785 (табл.).

Таблица

**Варьирование некоторых количественных признаков у регенерантов шалфея (2006-2008 гг.)**

Признак	Исходный сорт С-785	Регенеранты	
	среднее	лимиты изменчивости	V, %
Высота растения, см	131,9±8,8	79,6 – 166,0	20,7
Длина центрального соцветия, см	60,2±1,7	22,3 – 74,3	18,9
Количество боковых ответвлений 2 порядка, шт.	11,9±1,9	0,0 – 19,3	171,1
Количество боковых соцветий, шт.	6,6±1,5	1 – 13	52,7
Масса соцветий, г/растения	593,2±74,7	90,8 – 1035,0	53,3
Массовая доля эфирного масла, %	0,25±0,04	0,08 – 0,47	40,2
Сбор эфирного масла, г/растения	2,01±0,80	0,04 – 2,46	74,6
Содержание линалилацетата, %	55,3±3,8	46,6 – 63,1	6,7

### Выводы

В результате проведенных исследований были изучены особенности каллусо- и морфогенеза *in vitro* у некоторых эфиромасличных растений и выявлены способы,

позволяющие повысить частоту морфогенеза, а также получить регенерацию из длительно пассируемых тканей – выделение морфогенных штаммов, отбор индивидуальных растений с высокой регенерационной способностью, использование регенерантов в качестве донорных.

Анализ полученных в культуре каллусных тканей растений исследуемых видов выявил их вариабельность по морфологии и хозяйственно ценным признакам. При этом были выявлены перспективные для селекции формы, превышающие до 30-80% исходные сорта по урожайности и сбору эфирного масла.

### Список литературы

1. Соматический эмбриогенез в каллусе из семядолей незрелых зародышей подсолнечника / Антонова Т.С., Краснянский С.Ф., Челюстникова Т.А., Зезуль Т.Г. // Докл. ВАСХНИЛ. – 1991. – № 4. – С. 9-13.
2. Долгих Ю.И. Сомаклональная изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): Автореф. дис... докт. биол. наук: 03.00.12 / Институт физиологии растений РАН. – М., 2005. – 35 с.
3. Егорова Н.А., Бугара А.М., Ермилова А.М. Получение исходного материала для селекции эфиромасличной герани методами культуры тканей // Труды ИЭЛР. – Симферополь, 1998. – Т. 24. – С. 98-110.
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
5. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
6. Чеченева Т.Н. Изменчивость злаков в культуре *in vitro* и в процессе регенерации растений // Физиология и биохимия культ. растений. – 2006. – Т. 38, № 2. – С. 163-175.
7. Atanassov A., Vlachova M. Somatic embryogenesis in callus and cell suspension cultures in three species of medicago // Tissue Cult., Forest and Agr.: Proc. 3rd Tenn. Symp. Plant Cell and Tissue Cult., Knoxville, Tenn., 9-13 Sept., 1984. – New York; London, 1985. – P. 301-302.
8. Hunault G., Maatar A. Enhancement of somatic embryogenesis frequency by gibberellic acid in fennel // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 1995. – V. 141, N 2. – P. 171-176.
9. Murthy B. N. S., Singh R. P., Saxena Praveen K. Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv. Ringo Roso) cotyledonary cultures // Plant Cell Repts. – 1996. – V. 15, N 6. – P. 423-426.
10. Murthy H.N., Hahn E.J., Paek K.Y. Recurrent somatic embryogenesis and plant regeneration in *Coriandrum sativum* L. // Scientia Hort. – 2008. – V. 118, N 2. – P. 168-171.
11. Skala E., Wysokinska H. *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants // In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. – 2004. – V. 40, N 6. – P. 596-602.
12. Tsuro M., Inoue M., Kameoka H. Variation in essential oil components in regenerated lavender (*Lavandula vera* DC) plants // Scientia Hort. – 2001. – V. 88, N 4. – P. 309-317.