

## ВЛИЯНИЕ КОЛХИЦИНА НА КАЛЛУСОГЕНЕЗ И РЕГЕНЕРАЦИЮ РАСТЕНИЙ ЭФИРОМАСЛИЧНОЙ ГЕРАНИ *IN VITRO*

Н.А. ЕГОРОВА, кандидат биологических наук

Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН, Украина

Различные клеточные технологии в настоящее время широко используются в селекции основных сельскохозяйственных видов растений для создания новых генотипов и ускорения традиционного селекционного процесса [1, 7, 11]. Одной из относительно простых, но довольно эффективных биотехнологий является получение соматклонов, основанное на генетической изменчивости культивируемых соматических клеток. В литературе приводится много данных о появлении среди растений-регенерантов форм, отличающихся от исходных генотипов по морфологии, числу хромосом, хозяйственно полезным признакам [7, 11, 13]. Тем не менее, у некоторых видов растений был выявлен невысокий уровень соматклональной вариабельности [1]. Значительно расширить генетическую вариабельность в изолированной культуре можно при сочетании спонтанной соматклональной изменчивости и индуцированного мутагенеза *in vitro*. Такое сочетание позволяет существенно повысить частоту соматклональных вариаций, а возможно, и расширить спектр изменчивости [11, 13]. С другой стороны, метод мутагенеза *in vitro* имеет ряд преимуществ по сравнению с традиционным мутагенезом на уровне целых растений так как позволяет более быстро и с меньшими затратами получить желаемые признаки, но самое важное – снизить вероятность развития химерных форм.

К настоящему времени накоплен обширный фактический материал о действии различных химических и физических мутагенов на изолированные ткани и органы у ряда видов растений [1, 7, 8, 11, 13]. Мутагенную обработку применяют для расширения генетической изменчивости при получении соматклонов, а также в качестве предварительного этапа в клеточной селекции на устойчивость к биотическим и абиотическим факторам или создании клеточных линий-продуцентов [11, 13]. При разработке методических основ мутагенеза в культуре тканей для каждого нового вида растения необходимо, прежде всего, подобрать тип и оптимальные дозы мутагена. Большое значение имеет выбор объекта мутагенной обработки (в качестве которого можно использовать изолированные органы, каллусы, суспензии, протопласты) и фазы его развития, а также условий обработки и адекватных критериев оценки действия мутагена.

Среди разнообразных химических мутагенов в культуре тканей и клеток достаточно часто используется колхицин, в основном для полиплоидизации растений. Так, обработку колхицином применяли для получения полиплоидных форм лука [8], винограда [5], котовника [3], отдаленных гибридов тритикале и ячменя [1]. Однако имеются сведения о получении в культуре тканей под действием этого антимиотического агента анеуплоидов [5, 14]. На мутагенный эффект колхицина указывает в своей работе В.С. Гирко, получивший из каллусов тритикально-ячменных гибридов на средах с колхицином регенеранты с комплексом отклонений по морфологии и хромосомным числам [1]. В каллусных культурах гречихи татарской, подвергшихся действию колхицина, выявлена высокая частота хромосомных aberrаций и генетическая нестабильность на генном уровне [9]. Такие данные свидетельствуют о возможности использования колхицина *in vitro* не только для получения полиплоидов, но и хромосомных и генных мутаций.

Эфиромасличная герань является ценной сельскохозяйственной культурой, возделываемой во многих странах мира (Франции, Алжире, Грузии, Армении, Таджикистане и других). Гераниевое эфирное масло отчасти заменяет более дорогостоящее розовое и применяется в парфюмерно-косметической и пищевой промышленности, медицине, ароматерапии [12]. В специальной практической литературе под общим названием «эфиромасличная герань» обычно объединяют ряд видов (а чаще гибридов), относящихся к роду *Pelargonium* семейства *Geraniaceae*, которые имеют приятный запах и могут использоваться для получения эфирного масла [6, 12]. Селекционная работа с геранью проводится в основном с использованием межвидовой гибридизации. Подключение биотехнологических подходов может повысить эффективность традиционной селекции и

решить ряд проблем, в частности повышения содержания и качества эфирного масла, преодоления стерильности отдаленных гибридов. В литературе имеются данные об изучении процессов каллусо- и морфогенеза у различных видов *Pelargonium* [15, 16]. В наших исследованиях ранее была показана возможность получения растений-регенерантов из каллусных культур у эфиромасличных сортов герани и их широкая вариабельность по морфологии, числу хромосом и хозяйственно полезным признакам [2, 10].

Целью данной работы было изучение действия колхицина на каллусогенез, морфогенез и регенерацию растений у сортов эфиромасличной герани, а также морфологический анализ полученных *in vitro* растений.

### Материалы и методы

Материалом для исследования служили сорта эфиромасличной герани из коллекции ИЭЛР – Розовая, Аист, Крунк, которые имеют сложное гибридное происхождение и были получены при участии видов *Pelargonium roseum* Willd., *P. radula* (Cav.) L'Herit., *P. capitatum* (L.) Ait., *P. graveolens* (Jacq.) L'Herit. [6]. Для получения каллусных тканей в качестве эксплантов использовали сегменты черешков и стеблей взрослых растений. Приготовление питательных сред, введение в культуру и субкультивирование проводилось с применением традиционных методик, принятых в работах по культуре тканей [4]. Культивирование каллусных культур проводили на различных модификациях агаризованной среды Мурасиге и Скуга (МС), дополненной фитогормонами. Для инициации и пассирования каллуса использовали среду МС с добавлением 2,4,5-Т (1,0 мг/л) и кинетина (0,5 мг/л). Пассирование каллусных тканей осуществляли каждые 30-40 суток. Масса транспланта составляла примерно 80 мг.

В опытах по изучению влияния колхицина каллусные транспланты переносили на среду для каллусогенеза с добавлением колхицина в концентрациях 1; 10; 100; 1000; 2000 мг/л. Колхициновую обработку проводили при двух экспозициях (6 и 12 суток), после чего каллусные ткани переносили на свежую среду без колхицина для дальнейшего культивирования. Контролем служило культивирование на среде без колхицина. В конце цикла выращивания определяли массу сырого каллуса при взвешивании. Ростовой индекс рассчитывали как отношение прироста массы каллусной ткани к массе транспланта [4].

Для индукции морфогенеза каллусные ткани герани переносили на среду МС с добавлением БАП (0,5 мг/л). Через месяц культивирования на регенерационной среде определяли частоту морфогенеза как количество каллусов с почками и побегами в % от общего числа анализируемых трансплантов. Регенерированные микропобеги переносили на свежую среду для дорастивания, а затем укореняли на среде МС с половинным набором макро- и микроэлементов и 0,1 мг/л НУК. Каллусные культуры культивировали при температуре + 26°C, 70 %-ой влажности и интенсивности освещения 600 люкс, с 16-часовым фотопериодом. Морфогенные каллусные ткани и проростки выращивались при интенсивности освещения 2-3 тыс. люкс.

Полученные в каллусной культуре проростки адаптировали в условиях *in vivo* в торфо-перлитной смеси, а затем высаживали в сосуды с землей и выращивали в условиях закрытого грунта. Растения-регенеранты герани анализировали по морфологии вначале в теплице, а затем оценивали в течение 2-3 лет их вегетативное потомство в полевых условиях.

Все эксперименты были повторены не менее 2-3 раз, а полученные данные обработаны статистически на персональном компьютере с использованием программы Microsoft Office Excel 2003. На графиках представлены средние арифметические и доверительные интервалы.

### Результаты и обсуждение

Экспериментальные исследования по мутагенезу *in vitro* у герани проводили с использованием неморфогенных каллусных тканей. Несмотря на то, что каллусные культуры имеют некоторые недостатки по сравнению с суспензиями или протопластами [11], они наиболее удобны для обработки, особенно у герани. Это связано с тем, что ранее для ряда

сортов эфиромасличной герани нами были разработаны эффективные методики получения и длительного пассирования каллуса, обеспечивающие стабильный высокий прирост биомассы (ростовой индекс до 10-12). При переносе каллусных тканей на регенерационную среду с высокой частотой (до 70-90%) происходила индукция морфогенеза, а затем регенерация растений (рис. 1). Очень важно, особенно для работ по мутагенезу и клеточной селекции, что способность к регенерации растений у герани сохранялась в течение длительного времени (до 3-4 лет). Кроме того, при морфогенезе, наряду с органогенезом наблюдался соматический эмбриогенез. Такое развитие регенерантов из одной инициальной эмбриогенной клетки значительно снижает вероятность получения *in vitro* химерных форм.



Рис. 1. Морфогенез и регенерация растений в каллусной культуре эфиромасличной герани сорта Розовая

Значительный объем исследований был проведен на основном возделываемом сорте Розовая, при этом использовались различные концентрации (от 1 до 2000 мг/л) и экспозиции (6 и 12 суток) колхицина (рис. 2, 3). В этом эксперименте для мутагенной обработки применяли каллусные культуры третьего пассажа, полученные из черешка листа. Каллусная ткань была светло-бежевого цвета, рыхлой консистенции, оводненная, без признаков морфогенеза. Каллусные транспланты культивировали на средах с колхицином, а затем переносили на среду для каллусогенеза и определяли прирост биомассы. Как видно из полученных данных, при минимальной концентрации 1 мг/л не было достоверного изменения ростового индекса по сравнению с контролем (рис. 2). Более высокие концентрации колхицина вызывали достоверное снижение прироста биомассы каллуса. При этом ростовой индекс варьировал в зависимости от дозы и экспозиции от 7,2 до 1,2 (в контроле 10,5-10,7). Наиболее сильное угнетение роста происходило при культивировании каллусной ткани на среде с 2000 мг/л колхицина в течение 12 суток, после которого лишь половина трансплантов была способна к дальнейшей пролиферации, а остальные чернели и гибли.

Использованные экспозиции колхициновой обработки (6 и 12 суток) не оказывали достоверного влияния на ростовую активность каллусной ткани почти при всех концентрациях мутагена. Исключение составляет только максимальная доза 2000 мг/л, при которой с увеличением длительности обработки колхицином происходило достоверное четырехкратное снижение ростового индекса (рис. 2).

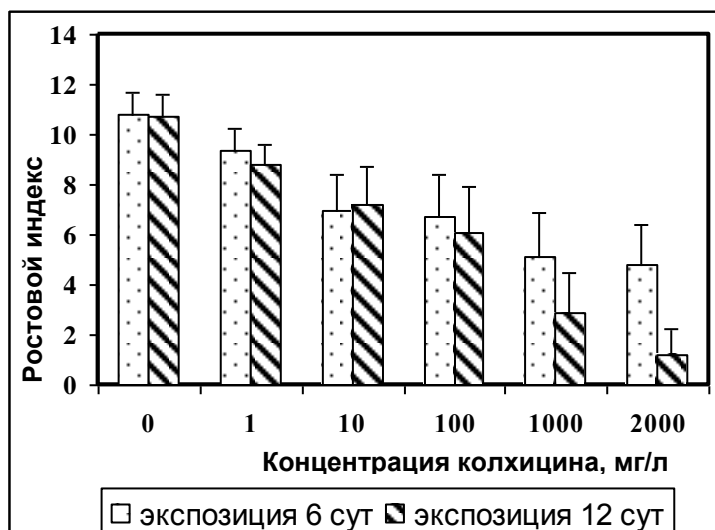


Рис. 2. Влияние различных концентраций и экспозиций колхицина на прирост каллусной ткани герани сорта Розовая

Такое снижение ростовой активности каллусной ткани под действием химических мутагенов отмечается во многих работах, хотя иногда низкие дозы могли вызывать стимуляцию индукции или пролиферации каллуса [1, 11, 13].

Важной проблемой при определении оптимальных режимов мутагенного воздействия является сохранение не только ростовой, но и регенерационной способности каллусных культур. Для получения измененных регенерантов необходимо, с одной стороны, обеспечить максимальный мутагенный эффект при сублетальных дозах мутагена, а, с другой стороны, – получить жизнеспособные растения. Как видно из представленных данных, при переносе каллусных тканей герани после колхициновой обработки на среду для регенерации при всех испытанных режимах сохранялась способность к индукции морфогенеза (рис. 3). При концентрациях от 1 до 100 мг/л частота морфогенеза была почти на уровне контроля. Только при введении в питательную среду 1000 мг/л (экспозиция 6 суток) и 2000 мг/л колхицина происходило достоверное снижение частоты индукции морфогенеза по сравнению с контрольными каллусными культурами. Экспозиция при всех испытанных концентрациях мутагена не оказывала достоверного влияния на морфогенетическую способность культивируемых тканей.

В каллусных культурах после обработки колхицином и последующей индукции морфогенеза, также как и в контроле, происходило формирование зеленых меристематических зон, почек, а затем побегов. Однако при высоких концентрациях (1000 и 2000 мг/л), наряду со снижением частоты морфогенеза наблюдалось более медленное развитие побегов из почек и формирование аномальных или ослабленных проростков, которые плохо приживались *in vivo*. При максимальной концентрации колхицина (2000 мг/л) не было получено ни одного жизнеспособного растения. Поэтому для герани концентрацию колхицина 1000 мг/л, при которой были получены единичные растения-регенеранты, можно считать сублетальной. В ряде работ отмечается угнетающее действие химических мутагенов на процессы регенерации и дальнейшее развитие полученных растений [1, 3, 11]. В частности, каллусные ткани гречихи после обработки колхицином вообще утрачивали способность к соматическому эмбриогенезу [9].

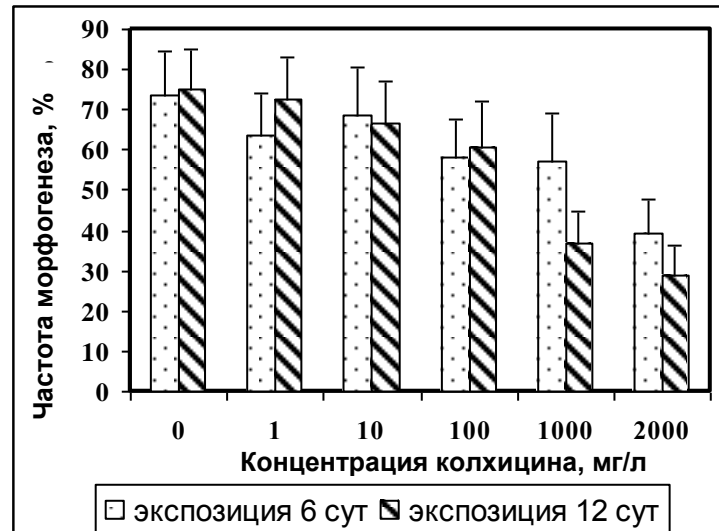


Рис. 3. Влияние различных концентраций и экспозиций колхицина на индукцию морфогенеза в каллусной культуре герани сорта Розовая

Вегетативное потомство полученных в культуре тканей растений-регенерантов герани в течение 2-3 лет анализировалось по морфологии и некоторым другим признакам. При этом были выявлены морфологические изменения как у растений, полученных из контрольных каллусов, так и у регенерантов после обработки колхицином (табл.).

**Влияние обработки колхицином на образование в каллусной культуре герани сорта Розовая растений-регенерантов с морфологическими изменениями**

Обработка колхицином		Количество регенерантов			Измененный признак
концентрация, мг/л	экспозиция, сут	всего проанализировано, шт.	с изменениями		
			шт.	%	
контроль, без обработки		22	4	18,2	окраска и форма листовой пластинки; укороченные междоузлия; фертильность мужского гаметофита
1	12	13	8	61,5	размер и форма листовой пластинки; высота растения; фертильность мужского гаметофита
10	6	6	3	50,0	окраска и форма листовой пластинки; габитус куста
100	6	7	4	57,1	окраска, размер и форма листовой пластинки; габитус куста
всего с колхициновой обработкой		26	15	57,7	

Было бы некорректным оценивать влияние различных концентраций колхицина на частоту возникновения измененных форм из-за небольшого числа проанализированных растений. Тем более что наряду с морфологическими изменениями возможно появление других типов мутаций. Однако следует отметить, что значительное число измененных форм появлялось даже при минимальной концентрации колхицина 1 мг/л. Полученные данные весьма убедительно свидетельствуют о том, что в целом число регенерантов с морфологическими изменениями после обработки колхицином было гораздо выше, чем без обработки (соответственно 57,1% и 18,2%). Кроме того, при цитогенетическом анализе этих регенерантов герани было установлено, что введение колхицина в питательную среду

способствовало появлению большего, чем в контроле числа анеуплоидов, среди которых были формы с увеличенным числом хромосом [10].

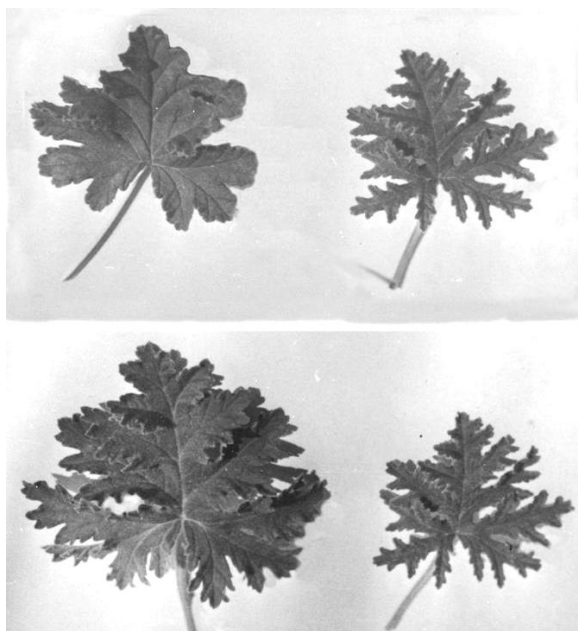


Рис. 4. Изменчивость листовых пластинок у растений-регенерантов герани, полученных в каллусной культуре на питательной среде с колхицином (1000 мг/л). Справа – листья исходного сорта Розовая. Слева – лист регенеранта № 2005,1 (вверху) и регенеранта № 2008,4 (внизу)

Типы измененных признаков у растений-регенерантов в контроле и после различных вариантов обработки колхицином были достаточно схожи и в основном касались габитуса куста, фертильности, размера и формы листовой пластинки (табл.). Необходимо отметить, что у некоторых растений наблюдалось одновременное изменение нескольких признаков – например, цвета и формы листовой пластинки (№ 874,9); размера листа и фертильности (№ 2094,3). При сублетальной концентрации колхицина 1000 мг/л также были получены несколько жизнеспособных растений, которые отличались от исходного сорта Розовая. Так, регенерант № 2005,1 имел менее изрезанную листовую пластинку более светлого цвета (рис. 4). У регенеранта № 2008,4 по сравнению с сортом Розовая были более крупные листья (рис. 4), утолщенный стебель, цветки большего размера с фертильными пыльниками и увеличенное число хромосом – 72 (у сорта – 56 хромосом). Использование обработки колхицином было особенно актуально у сорта Розовая, который из-за наличия мужской стерильности имеет редуцированные пыльники, не размножается семенами и его невозможно

использовать в скрещиваниях в качестве отцовского компонента. Поэтому было желательно получить не только образцы с хозяйственно полезными признаками, но и полиплоидные формы с восстановленной фертильностью. Следует обратить внимание на то, что в различных вариантах нашего эксперимента (с колхицином и в контроле) были получены несколько регенерантов с восстановленной фертильностью мужского гаметофита, у которых формировались нормальные пыльники и при самоопылении завязывались семена. В одной из первых работ по герани сообщалось о выделении среди растений-регенерантов, полученных в каллусной культуре *P. graveolens*, полиплоидного фертильного сорта [17].

Таким образом, в результате проведенных исследований было изучено влияние различных концентраций и экспозиций колхицина на прирост каллуса и его способность к морфогенезу у сорта Розовая. Для других испытанных сортов герани (Аист, Крунк) и типов эксплантов (стебель) были получены аналогичные данные о действии колхицина на каллусо- и морфогенез и показана возможность регенерации измененных форм. Установлено, что применение разработанного биотехнологического подхода позволяет увеличить морфологическую вариабельность регенерантов по сравнению с контролем без мутагенеза. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования обработки колхицином *in vitro* у герани в качестве самостоятельного методического приема, позволяющего повысить уровень изменчивости и получить новые генотипы для селекции.

#### Список литературы

1. Гирко В.С. Нетрадиционные методы создания селекционного материала пшеницы: Дис... докт. с.-х. наук: 06.01.05. – Киев, 1999. – 305 с.

2. Егорова Н. А., Бугара А. М., Ермилова А. М. Получение исходного материала для селекции эфиромасличной герани методами культуры ткани // Труды ИЭЛР. – 1998. – Т. 24. – С. 98-110.
3. Зільберварг І.Р. Біотехнологічні основи одержання поліплоїдних рослин м'яти котячої із застосуванням антимікротрубочкових сполук для цілей селекції: Автореф. дис...канд. биол. наук: 03.00.20. – Ялта, 2002. – 21 с.
4. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наукова думка, 1980. – 488 с.
5. Куксова В.Б. Регенерация тетраплоидных растений в культуре *in vitro* винограда// Современные методы и подходы в селекции растений. – Кишинев: Штиинца, 1991. – С. 56-61.
6. Кучулория Т.Л. Итоги селекции герани розовой // Эфирномасличные растения, их культура и переработка. – М.: Пищевая промышленность, 1968. – С. 39-51.
7. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.
8. Марьяхина И.Я., Полумордвинова И.В., Шевченко Н.П. Возможность использования метода полиплоидизации *in vitro* в селекции лука // С/х биология. – 1994. – № 5. – С. 32-37.
9. Мухитов А.Р., Румянцева Н.И. Высокомутабельные каллусы гречихи татарской, полученные в результате длительного действия колхицина на исходные каллусные культуры // Цитология. – Т. 43, № 4. – 2001. – С. 369-370.
10. Потемкина Н. В., Егорова Н. А., Бугара А. М. Цитогенетические исследования растений эфиромасличной герани, полученных в культуре тканей // Цитология и генетика. – 2004. – № 2. – С. 26-30.
11. Сидоров В.А. Биология растений. Клеточная селекция. – Киев.: Наукова думка, 1990. – 280 с.
12. Смолянов А.М., Ксендз А.Т. Эфиромасличные культуры. – М.: Колос, 1976. – 336 с.
13. Шамина З.Б. Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток растений в культуре. (Дис. докт. биол. наук / 03.00.15 - генетика). – Ленинград, 1988. – 35 с.
14. Dolezel J., Binarova P. The effect of colchicine on ploidy level, morphology and embryogenic capacity of alfalfa suspension cultures // Plant Sci. – 1989. – Vol. 64, N 2. – P. 213-219.
15. Dunbar K.B., Stephens C.T. Shoot regeneration of hybrid seed geranium (*Pelargonium x hortorum*) and regal geranium (*Pelargonium x domesticum*) from primary callus cultures // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 1989. – Vol. 19. – P. 13-21.
16. Murthy B. N. S., Singh R. P., Saxena P. K. Induction of high-frequency somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey cv. *Ringo Rosso*) cotyledonary cultures. // Plant Cell Repts. – 1996. – Vol. 15, N 6. – P. 423-426.
17. Skirvin R.M., Janick J. "Velvet Rose" Pelargonium, a Scented Geranium // Hort. Science. – 1976. – Vol. 11, N 1. – P. 61-62.

### **The influence of colchicine on callusogenesis and plants regeneration of essential oil geranium *in vitro***

Yegorova N.A.

The influence of different colchicine concentrations and expositions on the calluso- and morphogenesis of essential oil geranium has been investigated. It was shown that under increasing of colchicine concentration (from 10 up to 2000 mg/l) the reduction of callus growth index (from 1,5 up to 9 times) was observed, however the morphogenesis ability was kept. The quantity of regenerants with morphology deviations after colchicine treatment was greater in connection with control plants, obtained from untreated calluses.