

В.Б. БЕЛОКУРОВА, И.С. ГОЛОВАЧ,
Н.Л. ЩЕРБАК, Н.В. КУЧУК

Институт клеточной биологии
и генетической инженерии НАН Украины, Киев

РЕГЕНЕРАЦИЯ IN VITRO РАСТЕНИЙ *NICOTIANA AFRICANA* ИЗ ЭКСПЛАНТОВ РАЗНОГО ТИПА И МЕЗОФИЛЬНЫХ ПРОТОПЛАСТОВ



Разработаны методы культивирования *in vitro* африканского эндемичного вида *Nicotiana africana* (Solanaceae), обладающего рядом ценных хозяйственных признаков. Проанализировано влияние различных концентраций ауксина (нафтилуксусная кислота) и цитокининов (бензил-аминопури, зеатин, тидиазурон) на морфогенез и регенерацию растений *N. africana* при использовании листовых пластинок и междоузлий в качестве эксплантов. Оптимальной методикой регенерации растений *N. africana* в эксплантах листовых пластинок является культивирование на среде, содержащей 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП, в эксплантах междоузлий — на среде, содержащей 0,5 мг/л НУК и 1 мг/л зеатина. Использование тидиазурана было наиболее эффективным в концентрации 0,4 мг/л при последующей пересадке эксплантов на безгормональную среду. Предложена методика выделения и культивирования мезофильных протопластов, позволяющая регенерировать растения *N. africana* в течение 3–4 месяцев.

© В.Б. БЕЛОКУРОВА, И.С. ГОЛОВАЧ, Н.Л. ЩЕРБАК,
Н.В. КУЧУК, 2004

Введение. Одним из перспективных направлений современной биотехнологии растений является поиск у представителей дикорастущих видов генов, определяющих хозяйственно ценные признаки, с целью их переноса в родственные культурные растения. Одним из таких видов является *Nicotiana africana* Merxm., относительно недавно описанный африканский эндемик, единственный представитель рода *Nicotiana*, происходящий из Африки [1]. Показано, что *N. africana* обладает природной устойчивостью к Y-вирусу картофеля и является источником цитоплазматической мужской стерильности [2–5]. Имеется ряд публикаций по половой гибридизации *N. africana* с *N. tabacum* [3, 6, 7]. Опыление *N. tabacum* пыльцой *N. africana* предложено в качестве метода получения гаплоидов *N. tabacum* как альтернатива или дополнение к методу культуры пыльников [6]. Получена дигаплоидная линия *N. tabacum* с дополнительной хромосомой *N. africana* [3]. Публикации по культивированию *N. africana* *in vitro* немногочисленны. Сообщалось о регенерации растений из протопластов, полученных из суспензионной культуры *N. africana* [2]. Метод культуры зародышей был использован для преодоления несовместимости между *N. africana* и *N. tabacum* [4]. Слияние протопластов *N. tabacum* и облученных протопластов *N. africana* применяли для переноса признака цитоплазматической мужской стерильности, но цитируемая работа не содержит информации об особенностях их культивирования *in vitro* [8].

Включение любого нового вида в биотехнологические программы и/или в фундаментальные исследования невозможно без создания эффективных и воспроизводимых методов регенерации растений из культивируемых клеток и тканей. Целью настоящей работы была оценка регенерационного потенциала и разработка эффективных методов культивирования и регенерации *N. africana* в культуре *in vitro*.

Материалы и методы. Получение и культивирование асептических растений. В качестве исходного материала использовали семена *N. africana* из созданной в нашем институте коллекции зародышевой плазмы представителей мировой флоры. Семена стерилизовали последовательной обработкой 70°-ным этанолом (1 мин) и 1%-ным гипохлоритом натрия (5 мин), промывали стерильной водой и инкубировали на агаризованной безгормональной среде Мура-

сиге и Скуга (MS) [9] при 23 °С и 16-часовом фотопериоде. Проростки выращивали на безгормональной среде в тех же условиях с интервалом субкультивирования 2 мес.

Регенерация растений из листовых пластинок и междоузлий. Листовые пластинки асептических растений нарезали на сегменты площадью 1–1,5 см², междоузлия — на сегменты шириной 0,3–0,5 см и помещали на регенерационные среды. В каждом варианте опыта использовали 30 эксплантов листовых пластинок и 60 эксплантов междоузлий. Среда для регенерации содержала макро- и микрокомпоненты по Мурасиге и Скугу [9], 100 мг/л мезоинозита, 2 мг/л глицина, 10 мг/л тиамин-НCl, 1 мг/л пиридоксина-НCl, 1 мг/л никотиновой кислоты, 30 г/л сахарозы, 0,8% агар и различные комбинации ауксина (нафтилуксусная кислота — НУК) и цитокининов (6-бензиламинопурин — БАП; зеатин; тидиазурон — TDZ). Было изучено 20 вариантов сред (таблица), различающихся по содержанию регуляторов роста. Культивирование проводили при 23 °С и 16-часовом фотопериоде. Регенеранты укореняли на безгормональной среде MS.

Выделение и очистка изолированных протопластов. Ферментацию листьев проводили в ферментном растворе, содержащем 0,3 % Cellulase Onozuka, 0,2 % Dricellase, 0,3 % Macerozyme, 0,1 % CaCl₂ и 0,4 М маннитол (pH 5,7) в

течение 16–18 ч при 26 °С в темноте. Протопласты очищали согласно методике, предложенной для протопластов *Nicotiana* [10], которая была модифицирована и включала последовательную отмывку в солевой среде W5 (9 г/л NaCl, 18,4 г/л CaCl₂ · 2H₂O, 0,8 г/л KCl, 1 г/л глюкозы) путем центрифугирования (300 g, 3–4 мин) и далее в 0,5 М растворе сахарозы, содержащем 0,55 г/л CaCl₂ · 2H₂O, 7,5 г/л глицина, 1,95 г/л MES, на который наслаивали 1 мл среды W5 (700g, 7–8 мин). Флотирующие протопласты собирали и отмывали в среде W5 (300 g, 3–4 мин). Осадок протопластов ресуспендировали в среде для культивирования.

Культивирование протопластов. Протопласты *N. africana* культивировали в модифицированной среде KM8p [11] или в PCN [12]. Модифицированная среда KM8p, обозначенная как KM8p_м, отличалась измененным составом регуляторов роста (1 мг/л 2,4-Д, 0,1 мг/л НУК и 0,5 мг/л БАП) и не содержала биологических добавок (гидролизата казеина и кокосового молока). В состав среды PCN в качестве регуляторов роста входили 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП.

В течение первого месяца протопласты культивировали в темноте при 26 °С, разбавляя вдвое свежей средой каждые 7 дней. Эффективность высева определяли как отношение числа протопластов, сформировавших колонии, к общему числу культивируемых протопластов. Через 4 нед микроколонию высевали на подложку из фильтровальной бумаги, которую помещали на агаризованную среду для регенерации NB₂, содержащую 0,2 М маннитол, 0,1 мг/мл НУК и 1 мг/мл БАП. Культивирование продолжали на рассеянном свете в условиях 16-часового фотопериода при 23 °С. Колонии величиной 3–4 мм переносили на среду NB₂ без маннитола и выращивали до образования каллуса, а затем побегов. Побеги отделяли от каллусной ткани и укореняли на безгормональной среде MS.

Результаты исследований и их обсуждение. Семена *N. africana* прорастали в течение 3–4 нед. Темпы роста растений *N. africana* в культуре in vitro оказались довольно низкими — растения формировали 4–5 листьев в течение 2–3 мес. Особенности морфологии *N. africana*, сохраняющимися in vitro, являются тол-

Варианты питательных сред, исследованных для регенерации растений *N. africana* из листовых пластинок и междоузлий

Цитокинины, мг/л	Ауксины (НУК), мг/л	
	0,1	0,5
БАП		
0,1	NB ₁	NB ₄
1	NB ₂	NB ₅
2	NB ₃	NB ₆
Зеатин		
0,1	NZ ₁	NZ ₄
1	NZ ₂	NZ ₅
2	NZ ₃	NZ ₆
TDZ		
0,1	NT ₁	NT ₅
0,4	NT ₂	NT ₆
1	NT ₃	NT ₇
2	NT ₄	NT ₈

стый, быстро древеснеющий стебель и очень короткие междоузлия.

Регенерация растений из разных типов эксплантов. С целью создания эффективной методики регенерации растений *N. africana* в культуре *in vitro* в качестве эксплантов использовали листовые пластинки и междоузлия, а также различные комбинации и концентрации регуляторов роста. БАП и зеатин являются цитокининами, которые широко применяются в практике культуры тканей для индукции обра-

зования побегов. Сильной цитокинин-подобной активностью обладает тидиазурон — одно из производных фенилмочевины. Сообщалось, что применение TDZ значительно усиливало ростовой ответ *in vitro* и индуцировало регенерацию различных видов растений; при этом максимум стимулирующей активности TDZ приходится на значительно меньшие концентрации, чем для других цитокининов — производных аденина [13]. Для оценки эффективности регенерации *N. africana* мы исполь-

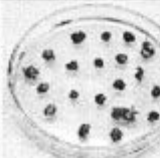
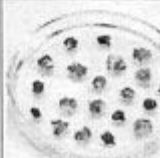
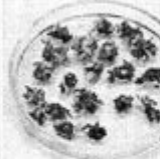
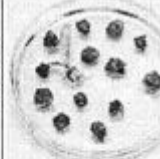
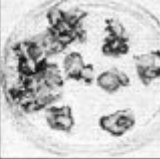
Цито- кинины		Листовые пластинки		Междоузлия	
		НУК		НУК	
		0,1 мг/л	0,5 мг/л	0,1 мг/л	0,5 мг/л
БАП	0,1 мг/л				
	1 мг/л				
	2 мг/л				
Зеатин	0,1 мг/л				
	1 мг/л				
	2 мг/л				

Рис. 1. Влияние различных концентраций БАП и зеатина на морфогенез в эксплантах *N. africana* (6 нед после начала культивирования)

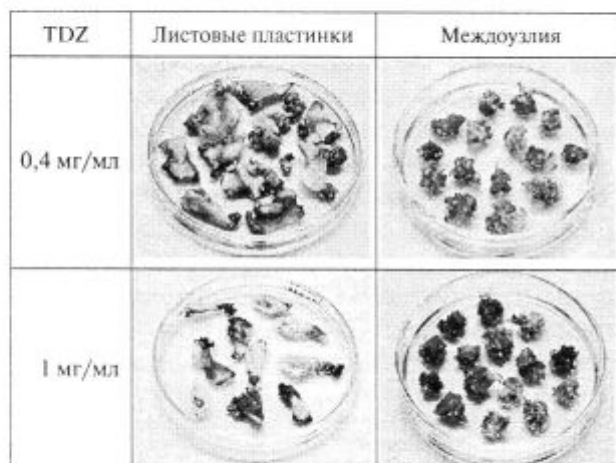


Рис. 2. Зависимость морфогенеза в эксплантах *N. africana* от концентрации тидиазура (6 нед после начала культивирования)

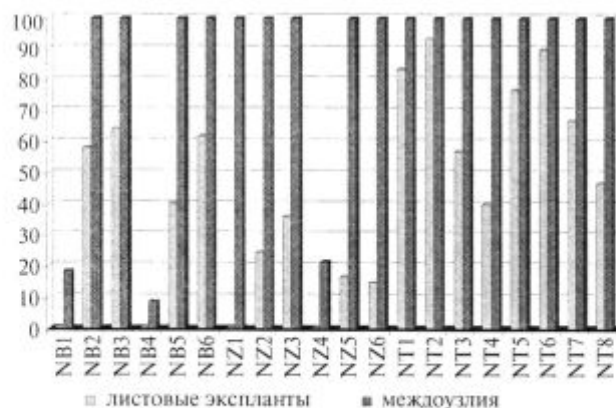


Рис. 3. Влияние состава питательной среды на морфогенез в культивируемых эксплантах *N. africana*: по вертикали — проц. эксплантов, в которых происходил морфогенез; по горизонтали — питательная среда

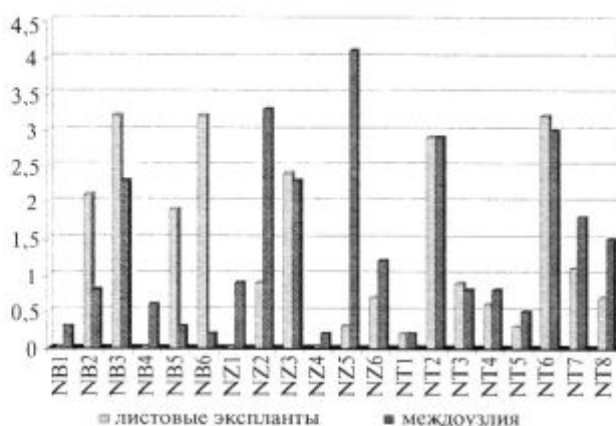


Рис. 4. Влияние состава питательной среды на число регенерирующих побегов *N. africana*: по вертикали — среднее число побегов на эксплант; по горизонтали — питательная среда

зовали два показателя: 1) процент морфогенных эксплантов (отношение числа эксплантов, в которых происходил морфогенез, к общему числу эксплантов); 2) среднее число образовавшихся побегов в пересчете на один культивируемый эксплант. Результаты экспериментов по регенерации растений *N. africana* из листовых пластинок и междоузлий на питательных средах с различным составом регуляторов роста иллюстрируют рис. 1 и 2.

Регенерация *N. africana* происходит по типу органогенеза. В течение первых 1–2 нед наблюдали формирование плотного зеленого каллуса по краю среза листа и по всей поверхности междоузлий. Независимо от состава среды образование адвентивных почек в эксплантах междоузлий начиналось в течение первых трех недель культивирования, в эксплантах листовых пластинок — в течение 4–5 нед.

Как видно из рис. 1 и 2, тип экспланта и гормональный состав среды влияли на эффективность дальнейшего формирования побегов. Изменение концентрации ауксина (0,1 и 0,5 мг/л НУК) не оказывало заметного влияния на органогенез, в то время как результаты, полученные при использовании разного состава и концентраций цитокининов, значительно различаются.

На рис. 3 представлена зависимость морфогенеза в культивируемых эксплантах *N. africana* от состава регуляторов роста в питательной среде. При использовании сред, в которых содержание цитокинина превышало содержание ауксина, морфогенез наблюдали в 100 % междоузлий. Для листовых пластинок этот показатель был значительно ниже, особенно при использовании БАП и зеатина.

Оценка влияния регуляторов роста на число регенерирующих побегов (рис. 4) показала, что для индукции регенерации в листовых дисках наиболее эффективен БАП. На средах NB₃ и NB₆ среднее число побегов на эксплант составило 3,2; при использовании зеатина наибольший показатель (2,4) отмечен на среде NZ₃, однако при этом часть полученных растений были витрифицированными. На среде NB₂ среднее число побегов на эксплант было меньшим (2,1), но при этом все регенеранты имели нормальную морфологию. Зеатин был гораздо более эффективным для индукции регенерации в эксплантах междоузлий. Если при

культивировании в присутствии БАП максимальный показатель (2,3 побега на эксплант) отмечен для среды NB₃, то при использовании зеатина этот показатель составил 3,3 и 4,1 (среды NZ₂ и NZ₃ соответственно).

На средах, содержащих тидиазурон, в 100 % эксплантов междоузлий начинался морфогенез; для эксплантов листовых пластинок этот показатель был ниже — от 40,0 до 93,3 % (рис. 3). Несмотря на закладку большого числа адвентивных почек, дальнейшее развитие побегов происходило успешно только на средах с 0,4 мг/л тидиазурана. Повышение концентрации тидиазурана не только не приводило к усилению морфогенетических процессов, но вызывало частичный некроз тканей листовых пластинок. И хотя сохранившиеся экспланты регенерировали нормально, в целом эффективность регенерации на средах, содержащих 1 и 2 мг/л TDZ, была значительно ниже. Это согласуется с данными о том, что повышение концентрации тидиазурана выше 1 мкМ приводит к подавлению морфогенетических процессов и даже к гибели культивируемых тканей [13]. При использовании для регенерации сред, содержащих тидиазурон, экспланты через 2 мес культивирования переносили на безгормональную среду МС. Такой подход позволил значительно повысить эффективность регенерации. При использовании эксплантов междоузлий эффективность образования адвентивных почек была равной при различных concentra-

циях TDZ; при этом не наблюдалось некроза тканей. Однако среднее число регенерантов на эксплант не превысило 3, так как часть регенерантов были витрифицированными и не укоренялись на безгормональной среде.

Регенерация растений из изолированных протопластов. Для получения мезофильных протопластов *N. africana* изучали различные протоколы ферментации. Оптимальной оказалась ферментная смесь, содержащая 0,3 % Cellulaze Onozuka, 0,2 % Dricellase, 0,3 % Macerozyme, 0,1 % CaCl₂ и 0,4 М маннитол (pH 5,7), инкубацию в которой проводили при 26 °С в темноте в течение 16–18 ч. Это позволяло получить достаточное количество неповрежденных жизнеспособных протопластов, которые далее культивировали при начальной плотности посева $5-6 \cdot 10^5$ /мл в разных по составу питательных средах (рис. 5, а).

На начальных стадиях культивирования синтез клеточной стенки и первые деления наблюдались практически одновременно как в среде PCN, так и в KM8p_M — через 48 ч культивирования 50 % протопластов, а еще через сутки 90 % протопластов формировали клеточную стенку. На пятые сутки культивирования в среде KM8p_M и на шестые сутки в среде PCN появлялись первые делящиеся клетки.

Различия в дальнейшем развитии протопластов наблюдались на более поздних стадиях культивирования. В частности, при выращивании в среде KM8p_M наблюдали множествен-

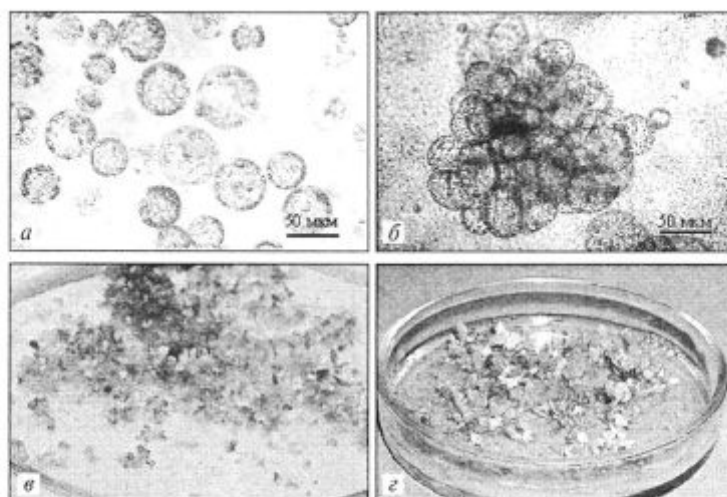


Рис. 5. Регенерация растений из изолированных протопластов *N. africana*: а — мезофильные протопласты, б — клеточная колония в жидкой среде, в — морфогенный каллус на твердой среде, г — регенерация побегов

ные (до 20 % клеток) случаи почкования протопластов и появления вытянутых изогнутых клеток, которые впоследствии не делились и не формировали колоний, что, по-видимому, является результатом действия 2,4-Д. В то же время культивирование протопластов в среде PCN, т.е. в отсутствие 2,4-Д, позволяло индуцировать нормальные клеточные деления и формирование микроколоний, хотя это занимало несколько больше времени.

Через 2,5–3 нед культивирования в среде КМ8p_м и через 3,5–4 нед в среде PCN формировались колонии, состоящие из нескольких десятков клеток (рис. 5, б). Подсчет клеточных колоний в 4-недельных культурах показал, что эффективность высева протопластов в среде КМ8p_м составила около 25 %, в среде PCN — около 35 %.

Колонии, достигшие величины 1–2 мм, переносили на твердую среду для регенерации NB₂ и выращивали на рассеянном свете в условиях 16-часового фотопериода при 23 °C, постепенно понижая содержание осмотика в среде. Применение среды КМ8p_м требовало изменения состава регуляторов роста для индукции морфогенеза и регенерации, в частности, удаления 2,4-Д на более поздних стадиях культивирования. При использовании среды PCN все стадии развития (от синтеза протопластами клеточной стенки до регенерации побегов) происходили на среде с одним и тем же гормональным составом.

При дальнейшем культивировании на агаризованной среде NB₂ колонии формировали рыхлый зеленый каллус, в котором в течение 2 мес. развивались побеги (рис. 5, в, г). В ранее опубликованной работе при культивировании протопластов, полученных из суспензионной культуры, формирование клеточных колоний величиной 1–2 мм происходило в течение 3 мес, а первые побеги сформировались в каллусной ткани через 10 мес культивирования [2]. В наших экспериментах общая длительность культивирования от выделения протопластов до регенерации растений составила 3–4 мес.

Таким образом, оптимальной методикой регенерации растений *N. africana* в эксплантах листовых пластинок является культивирование на средах, содержащих 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л БАП; в эксплантах междоузлий — на средах,

содержащих 0,5 мг/л НУК и 1 мг/л зеатина. При использовании тидиазулона для индукции морфогенеза *N. africana* в обоих типах эксплантов наиболее эффективной была концентрация 0,4 мг/л. В целом междоузлия являются лучшим исходным материалом для регенерации растений *N. africana* in vitro благодаря большему числу формирующихся побегов нормальной морфологии и меньшему времени регенерации (4–6 нед для листовых дисков, 3–4 нед для междоузлий). Предложенная методика культивирования изолированных протопластов *N. africana* позволяет получать растения-регенеранты в течение 3–4 мес культивирования.

SUMMARY. Methods of *in vitro* cultivation of an African endemic species *Nicotiana africana* (Solanaceae) possessing some valuable traits have been elaborated. Influence of different concentrations of auxin (α -naphthaleneacetic acid) and cytokinins (6-benzylaminopurine, zeatin, thidiazuron) on morphogenesis and plant regeneration has been analysed using leaves and internodes as explants. The optimum method of regeneration of *N. africana* shoots in leaf explants is cultivation in the presence of 0,1 mg/l NAA and 1 mg/l BA; in internode explants — cultivation on the medium containing 0,5 mg/l NAA and 1 mg/l zeatin. The use of thidiazuron was the most effective at the concentration of 0,4 mg/l with subsequent transfer of explants to hormone-free medium. Method of isolation and culture of mesophyll protoplasts enabling to regenerate *N. africana* plants during 3–4 months has been proposed.

РЕЗЮМЕ. Розроблено методи культивування in vitro африканського ендемічного виду *Nicotiana africana* (Solanaceae), який має ряд цінних господарських ознак. Проаналізовано вплив різних концентрацій ауксину (нафтилоцтова кислота) і цитокінінів (бензиламінопурин, зеатин, тидіазурон) на морфогенез та регенерацію рослин *N. africana* при використанні листових пластинок і міжвузлів як експлантів. Оптимальною методикою регенерації рослин *N. africana* в експлантах листових пластинок є культивування на середовищі, що містить 0,1 мг/л НОК і 1 мг/л БАП; в експлантах міжвузлів — на середовищі, що містить 0,5 мг/л НОК і 1 мг/л зеатину. Використання тидіазурону було найбільш ефективним в концентрації 0,4 мг/л з наступним перенесенням експлантів на безгормональне середовище. Запропоновано методику виділення і культивування мезофільних протопластів, яка дозволяє регенерувати рослини *N. africana* протягом 3–4 міс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Merxmüller H., Buttler K.P. *Nicotiana* in der africanischen Namib — ein pflanzengeographisches und phy-

- logenetisches ratsel // Mitt. Bot. Munchen. — 1975. — № 12. — P. 91–104.
2. Rakosy-Tican L., Menczel L. Plant regeneration from cell suspension-derived protoplasts of *Nicotiana africana* // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. — 1998. — 54. — P. 93–95.
3. Campbell K.G., Wernsman E.A., Fitzmurice W.P., Burns J.A. Construction of a designer chromosome in tobacco // Theor. Appl. Genet. — 1994. — 87. — P. 837–842.
4. Milanova V.N., Zagorska N.A. Overcoming hybrid incompatibility between *Nicotiana africana* Merxm. and *N. tabacum* and development of cytoplasmically male sterile tobacco forms // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. — 1990. — 23. — P. 71–75.
5. Lucas G.B., Gooding G.V.Jr, Sasser J.N., Gerstel D.U. Reaction of *Nicotiana africana* to black shank, granville wilt, root knot, tobacco mosaic virus, and potato virus Y // Tobacco Sci. — 1980. — 24. — P. 141–142.
6. Burk L.G., Gerstel D.U., Wernsman E.A. Maternal haploids of *Nicotiana tabacum* L. from seed // Science. — 1979. — 206, № 2. — P. 585.
7. Gerstel D.U., Burns J.A., Burk L.G. Interspecific hybridization with an African tobacco, *Nicotiana africana* Merxm. // J. Hered. — 1979. — 70. — P. 342–344.
8. Kumashiro T., Asahi T., Komari T. A new source of cytoplasmic male sterile tobacco obtained by fusion between *Nicotiana tabacum* and X-irradiated *N. africana* protoplasts // Plant Sci. — 1988. — 55. — P. 247–254.
9. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. — 1962. — 15. — P. 473–497.
10. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. — Киев: Наук. думка, 1985. — 129 с.
11. Kao K.N., Michayluk M.R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media // Planta. — 1975. — 126. — P. 105–110.
12. Dovzhenko A., Bergen U., Koop H.-U. Thin-alginate-layer technique for protoplast culture of tobacco leaf protoplasts: shoot formation in less than two weeks // Protoplasma — 1998. — 204. — P. 114–118.
13. Visser C., Qureshi J.A., Gill R., Saxena P.K. Morphoregulatory role of thidiazuron // Plant Physiol. — 1992. — 99. — P. 1704–1707.

Поступила 12.04.04