

УДК 57.017.35:633.31/.37

Б.А. Жумабаева, Э.Д. Джангалина, З.Г. Айташева*, А.Д. Жигитбекова, Ж.Н. Бекебаева

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

*E-mail: Zaire.Aitasheva@kaznu.kz

Морфогенетические особенности каллусных культур фасоли обыкновенной

Аннотация. Целью данной работы являлось получение соматических растений-регенерантов в культуре *in vitro* фасоли обыкновенной. Изучены способы стерилизации семян и различных типов эксплантов. Определена частота каллусогенеза от типа экспланта и состава питательной среды у различных сортообразцов. Оптимизированы питательные среды для индукции процессов каллусогенеза, морфогенеза и регенерации в культуре изолированных соматических тканей растений.

Ключевые слова: фасоль, культура *in vitro*, эпикотиль, гипокотиль, каллусогенез, морфогенез, регенерация.

Одним из наиболее динамично развивающихся направлений, ориентированных на создание нового исходного материала для селекции, является использование биотехнологических методов. Культура клеток и тканей *in vitro* в настоящее время находит применение в широком диапазоне биологических исследований. Это стало возможным в результате разработки технологий культивирования тканей и клеток с последующей регенерацией из них фертильных растений. Подобные технологии отстают в своем развитии применительно к такой экономически важной зернобобовой культуре как фасоль [1]. Фасоль является перспективным объектом в области экологических исследований, с помощью которого можно пополнить плодородие почвы и повысить ее биологическую ценность.

При культивировании клеток и тканей бобовых культур на искусственных средах имеются многочисленные доказательства проявления генетической изменчивости, как на клеточном уровне, так и у растений-регенерантов [2, 3]. Одновременно наблюдается и генетическая стабильность регенерантов, полученных из каллусной культуры, подтвержденная анализом генетических маркеров [4]. В методическом аспекте изучение этих вопросов предполагает создание системы культивирования каллусных тканей,

имеющих высокий морфогенетический потенциал и получение растений-регенерантов.

Цель настоящего исследования состояла в разработке методов культивирования тканей фасоли в культуре клеток и тканей *in vitro*. В задачи исследований входило:

– разработка протоколов стерилизации семян и эксплантов фасоли обыкновенной для введения в культуру *in vitro*;

– оптимизация минерального и гормонального состава питательных сред для индукции каллусогенеза, морфогенеза и ризогенеза в культуре соматических тканей фасоли.

Материалы и методы исследований

В качестве исходного материала использовали сорта фасоли местной (Актати, Джунгарская), американской (Камелия, Red Goya) и ирано-турецкой селекции («Иранская»).

В качестве эксплантов использовали эпикотили, гипокотили и черешки 7-14-дневных асептических проростков. Для получения асептических проростков семена стерилизовали с использованием различных протоколов стерилизации, которые различались по времени экспозиции в стерилизующих растворах. Семена высаживали на безгормональную среду Мураси-

ге-Скуга (МС). Листья, эпикотили и гипокотили нестерильных растений промывали проточной водой, инкубировали в 70% этаноле в течение 5-7 минут, трижды промывали стерильной дистиллированной водой и высаживали на среду для индукции каллусогенеза.

Для получения первичной культуры каллусов экспланты размером 2-3 см культивировали на стандартной (МСС) и модифицированной (МСМ) среде Мурасиге-Скуга, содержащей повышенные концентрации витаминов (PP, B₁, B₆, C – 10 мг/л). В качестве индуктора каллусогенеза использовали 2 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д). Каллусы культивировали в термостате при температуре +25°C. Для индукции процесса морфогенеза каллусные ткани культивировали на среде МС, содержащей 2,25 мг/л бензинаминопурина (БАП) и 1,5 мг/л индолуксусной кислоты (ИУК).

Результаты исследований и их обсуждение

На первом этапе были проведены исследования по разработке эффективных протоколов стерилизации семян и эксплантов фасоли. Протоколы стерилизации семян отличались по времени экспозиции в растворах хлорамина и спирта. Концентрация хлорамина во всех вариантах составляла 5%, спирта 70%. Было установлено, что оптимальное время стерилизации в хлорамине и спирте составляло 5 мин и 1-2 минуты соответственно (рис.1).

Для стерилизации молодых листьев, эпикотилей и гипокотилей проростков, выращенных в нестерильных условиях экспланты вычленили и инкубировали в течение 5-9 мин в 70% этаноле. Наилучшее время экспозиции составляло 5 минут. В остальных вариантах через 2-3 дня после посадки наблюдался некроз эксплантов.

Формирование каллусов на всех питательных средах начиналось через 7-10 дней. Сравнительный анализ зависимости частоты каллусогенеза от типа экспланта показал, что только эпикотиль и гипокотиль обладают каллусо-

образующей способностью, причем эпикотиль являлся наиболее подходящим эксплантом для индукции каллуса. При использовании среды МСС способность к каллусообразованию проявляли 4 сорта фасоли, но при этом частота каллусогенеза была очень низкой и не превышала 15,3 % (табл. 1).



Рис. 1 – Асептические проростки фасоли сорта Red Goya

На модифицированной среде МСМ частота каллусообразования резко возрастала и варьировала от 50 до 95%. Отмечена сортовая зависимость каллусообразующей способности эксплантов. У сортов «Актати» и «Red Goya» выход каллуса был наибольшим и составлял 75% и 95% соответственно. Относительно низкий процент каллусообразования отмечен у генотипов «Джунгарская» и «Иранская».

После 30 дневного культивирования каллусы пересаживали на среду для индукции морфогенеза.

Известно, что культивируемые *in vitro* каллусные ткани растений характеризуются высокой степенью гетерогенности, даже в тех случаях, когда они получены от одних и тех же донорных генотипов, эксплантов и одинаковых условиях культивирования [5, 6].

Таблица 1 – Зависимость частоты каллусогенеза от типа экспланта и состава питательной среды у различных сортообразцов фасоли обыкновенной

Генотип	Эксплант	Частота каллусогенеза, %	
		Среда МСС	Среда МСМ
Актатти	эпикотиль	10,0 ± 1,2	75,0 ± 0,9 ***
	гипокотиль	7,5 ± 1,4	48,1 ± 1,4 ***
	черешок	0	8,3 ± 1,1
Джунгарская	эпикотиль	12,2 ± 1,1	51,1 ± 1,5***
	гипокотиль	14,4 ± 1,3	31,2 ± 0,8***
	черешок	0	5,4 ± 1,6
Камелия	эпикотиль	11,1 ± 0,9	69,3 ± 1,4***
	гипокотиль	9,1 ± 1,0	41,5 ± 1,7***
	черешок	0	7,3 ± 0,8
Red Goya	эпикотиль	15,3 ± 0,8	95,3 ± 1,7***
	гипокотиль	13,3 ± 1,6	57,2 ± 0,4***
	черешок	0	8,6 ± 1,5
Иранская	эпикотиль	0	50,0 ± 0,7
	гипокотиль	0	24,4 ± 1,0
	черешок	0	6,7 ± 1,2

Примечание: *** P<0,001

Исследователи отмечают связь морфологии каллусов с их способностью к регенерации растений. Конкретные признаки морфогенных каллусов у разных видов растений могут различаться [7]. В наших исследованиях также было показано, что изучаемые сортообразцы фасоли обыкновенной отличались по степени формирования морфогенных каллусов (рис. 2).

Плотный, компактный каллус отличался пониженной морфогенной активностью. Образование морфогенных структур отмечено только для сорта Red Goya и Джунгарская, которые

формировали рыхлый глобулярный каллус. В каллусной культуре фасоли через две-три недели культивирования на среде, содержащей 2,25 мг/л БАП и 1,5 мг/л ИУК, наблюдалась индукция геммогенеза (рис. 3). Образованию почек предшествовало возникновение на светлой поверхности каллусов зеленых меристематических очагов. Частота морфогенеза у эпикотилей была значительно выше и варьировала от 11,1% до 19,3% (таблица 2). Для гипокотилей отмечена низкая морфогенетическая способность в пределах 6,5 % – 14,2 %.

Таблица 2 – Зависимость частоты морфогенеза от типа экспланта у различных сортообразцов фасоли обыкновенной

Генотип	Частота морфогенеза, %	
	эпикотиль	гипокотиль
Актати	19,3 ± 0,7	9,1 ± 1,1
Джунгарская	11,1 ± 1,4	8,2 ± 0,8
Камелия	17,2 ± 1,2	10,5 ± 1,3
Red Goya	18,0 ± 0,6	14,2 ± 0,5
Иранская	12,3 ± 1,4	6,5 ± 1,2

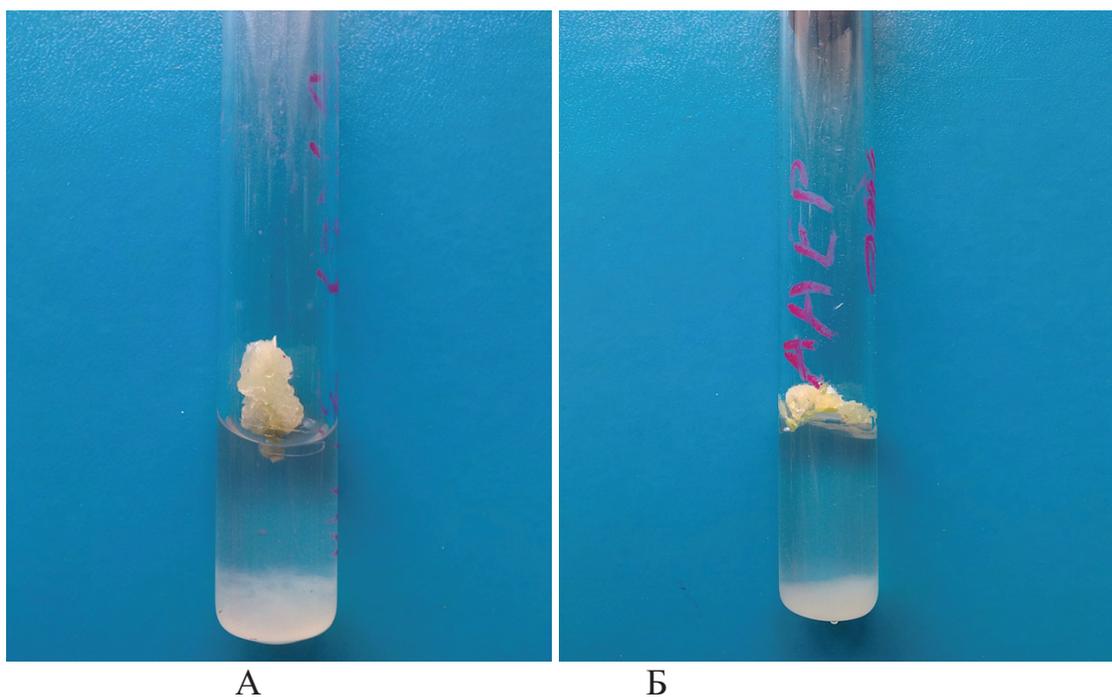


Рис. 2 – Индукция морфогенных куллузов в культуре тканей фасоли сорта Red Goya (А) и Камелия (Б)



Рис. 3 – Индукция геммогенеза в культуре тканей фасоли сорта Red Goya

Таким образом, отработаны условия стерилизации различных типов эксплантов фасоли обыкновенной, определен оптимальный состав

среды и выявлена сортовая зависимость процессов каллусогенеза и морфогенеза. Наибольшей каллусообразующей способностью обладали эпикотили сортов Актати и Red Goya при культивировании на модифицированной среде Мурасиге-Скуга. Выявлена взаимосвязь между морфологической структурой каллуса и его морфогенетической способностью. Установлено, что введение в состав питательной среды БАП в сочетании с ИУК стимулировало побегообразование. Дальнейшая работа будет проводиться по оптимизации гормонального состава питательных сред для индукции морфогенеза в культуре тканей различных сортообразцов фасоли.

Литература

- 1 Эберт Д., Фоке И., Клейн В. и др. Выращивание зернобобовых культур на промышленной основе. – М., 1981. – 160 с.
- 2 Кунах В. А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro*. Физиология растений. 1999. – Т. 46. – №6. – С. 919-929.
- 3 Амирова А.К., Манапбаев Д.Р., Бишимба

ева Н.К., Булатова К.М., Богданова Е.Д., Рахимбаев И.Р. Морфологическое и биохимическое изучение растений-регенерантов из длительно культивируемых каллусных тканей пшеницы // Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2002. – № 3 (18). – С. 52-58.

4 Кузнецова, О. И., Аш О.А., Гостимский С. А. Изучение влияния продолжительности культивирования каллусов на накопление генетических изменений у регенерантов гороха (*Pisum sativum L.*) // Генетика. – 2006. – Т. 42. – N 5. – С. 684-692

5 Джангалина Э. Д. Биотехнология получе-

ния эмбрионных солеустойчивых клеточных линий люцерны: автореф. дис. канд. – Алматы, 2002. – 26 с.

6 Фоменко Т.И., Малюш М.К. Особенности морфогенеза и регенерации растений в культуре *in vitro* люпина узколистного // Физиология и биохимия культ. растений. – 2010. – Т. 42. – № 4. – С. 306–314.

7 Рахимбаев И.Р., Тивари Ш., Бишимбаева Н.К., Кушнарченко С.В., Азимова Е.Д. Биотехнология зерновых культур. – Алма-Ата: Ғылым, 1992. – 240 с.

Б.Ә. Жұмабаева, Э.Д. Джангалина, З.Ғ. Айташева, А.Д. Жігітбекова, Ж.Н. Бекебаева
Кәдімгі үрмебұршақтың каллустық дақылының морфогенетикалық ерекшеліктері

Кәдімгі үрмебұршақтың әртүрлі сорт үлгілерінің каллус түзетін қабілеті зерттелді. Әртүрлі эксплант типтерін залалсыздандыру жүйелері өңделді. Каллус түзу жиілігінің эксплант түріне және қоректік орта құрамына байланыстылығы зерттелді. Салыстырмалы талдау эпикотильдің каллус пайда болуына қолайлы эксплант екенін көрсетті. Үрмебұршақтың каллус түзуі эксплант алынған сортқа байланысты екені белгілі болды. Борпылдақ каллустары алынған Red Goya және Актати сорттарынан үлкен пайызды морфогенді құрылымдар түзу байқалды. БАП гормонының кәдімгі үрмебұршақтың ұлпалар дақылында морфогенез үдерісіне әсері анықталды.

B.A. Zhumabayeva, E.D. Dzhangalina, Z.G. Aytasheva, A.D. Zhigitbekova, Zh.N. Bekebayeva
Morphogenetic properties of calli cultures for common bean

Callus formation ability of different varieties and accessions for common bean has been studied. Composition of sterilization media for seeds and different types of explants has been developed. Dependence of the callus formation frequency on the explant type and composition of nutrition media for different varieties has been established. Comparative analysis has shown that the epicotyl is the most appropriate explant for callus induction. It has been noticed that callus formation in common bean would be determined by the specificity of the variety producing an explant. A large percentage of formation for morphogenic structures has been observed for cv. “Red Goya” and “Aktati”, which formed a loose globular callus. The effect of BAP on formation of morphogenic callus in tissue culture of common bean has been indicated.