

# РАСТЕНИЕВОДСТВО

## ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ РЕГУЛЯТОРОВ РОСТА В КУЛЬТУРЕ ЦВЕТОЛОЖА КАПУСТЫ БРОККОЛИ (*BRASSICA OLERACEA VAR. ITALICA*)

С.В. Старцев<sup>1</sup>, А.В. Поляков<sup>2</sup>,  
В.В. Введенский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра генетики, растениеводства и защиты растений  
Российский университет дружбы народов  
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

<sup>2</sup>ВНИИ овощеводства  
д. Верея, стр. 500, Раменский район,  
Московская область, Россия, 140153

В статье приведены результаты культивирования эксплантов капусты брокколи *in vitro* в присутствии различных регуляторов роста. Установлено влияние концентраций регуляторов роста на морфогенез трансплантов капусты брокколи. Выявлены оптимальный возраст бутона и тип экспланта. Полностью описан весь технологический процесс получения растений-регенерантов *in vitro*, включая их адаптацию к условиям открытого грунта. Представлен ряд новых технологических решений в методе микроклонального размножения данной культуры.

**Ключевые слова:** культура тканей, питательная среда, брокколи эксплант, цветоложе, регулятор роста.

**Введение.** Метод культуры тканей представляет собой выращивание изолированных тканей, органов, клеток и протопластов растительного происхождения на искусственных питательных средах определенного гормонального состава [1]. На сегодняшний день разработан и широко применяется ряд методических указаний по культуре *in vitro* ткани и органов различных растений, в том числе и овощных [4].

Метод культуры тканей широко применяется для быстрого вегетативного размножения ценных биологических объектов и их оздоровления. Растения, полученные в культуре тканей, обладают высокой генетической однородностью, процесс их производства гораздо короче, количество регенерантов значительно выше, чем при размножении семенным путем. Этот метод позволяет к тому же выращивать в культуре изолированные зародыши отдаленных гибридов, которые в естественных условиях нежизнеспособны [2].

Питательная среда является важным и ответственным этапом при культивировании клеток и тканей растений *in vitro*. Она содержит много разнообразных

компонентов, которые можно разделить на макро- и микроэлементы, источники железа, витамины, источник углерода (сахар) и регуляторы роста. В зависимости от поставленной задачи среды могут содержать разные компоненты каждой из этих групп в разных количествах. Существует ряд основных и часто используемых в биотехнологии сред, например: MS [6], Гамборга В<sub>5</sub> [5]. Твердые среды содержат агар-агар — экстракт из водорослей, образующий желеобразный студень.

Значительное влияние на развитие и морфогенез растений *in vitro* оказывают регуляторы роста. Как правило, среды содержат разнообразные цитокинины и ауксины. В связи с этим большой интерес представляют собой исследования по подбору определенных комбинаций гормонов и их концентрации.

**Методика проведения исследований.** Исследования проведены на капусте брокколи сорта Тонус. В исследованиях использовали бутоны, длина которых изменялась от 4 мм до 12 мм (рис. 1).

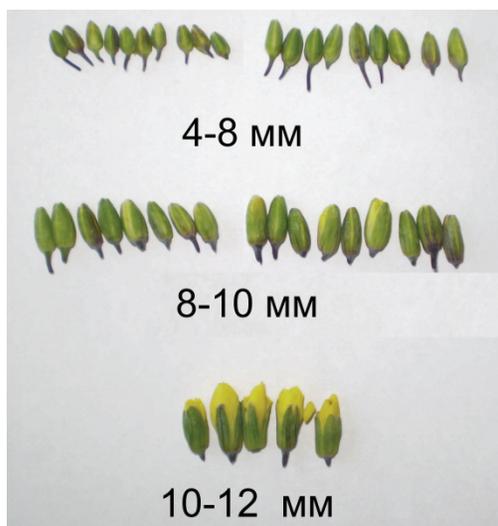
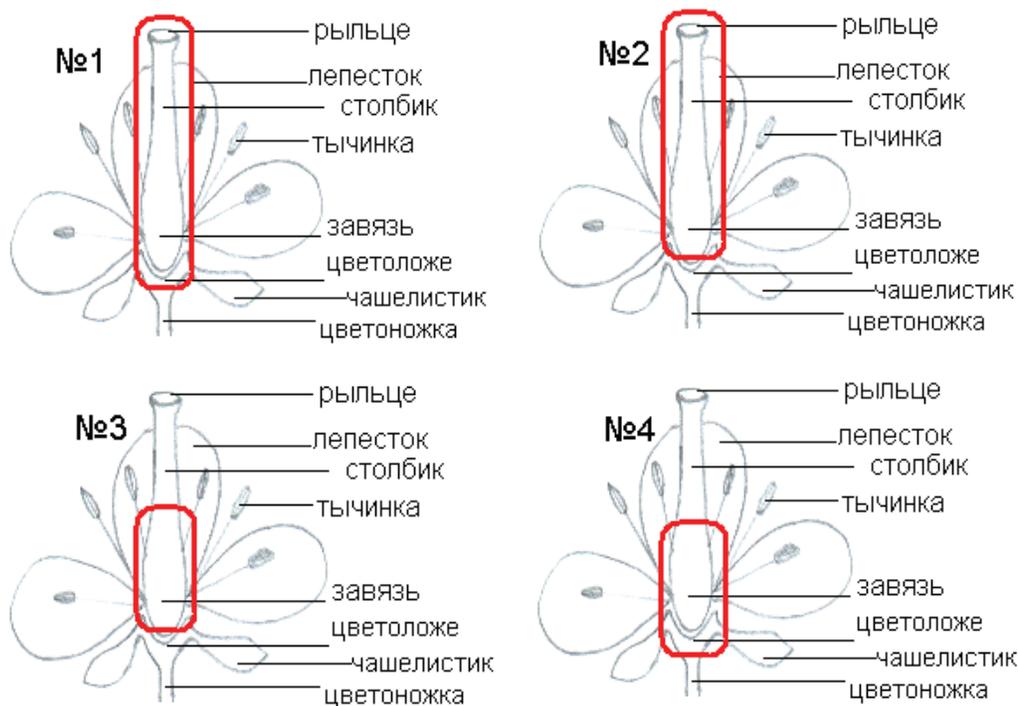


Рис. 1. Бутоны, используемые в опытах

Для стерилизации использовали 0,01% водный раствор перманганата калия и 1% раствор гипохлорита кальция при экспозиции 10 минут. После стерилизации бутоны трижды промывали стерильной дистиллированной водой в течение 15—20 минут. Для введения в культуру использовали экспланты, содержащие следующие части: пестик, рыльце, столбик, завязь и части цветоложа в различных сочетаниях (рис. 2).

После введения *in vitro* экспланты выдерживали в темноте в течение суток. Экспланты культивировали на жидкой среде MS [6], содержащей следующие регуляторы роста: ТДА (N-фенил-N'-(1,2,3-тиадиазол-5-ил)мочевина) в концентрации 1 мг/л и 3-индолилуксусную кислоту (ИУК) — 0,5 мг/л; либо 6-бензиладенин (БА) — 4 мг/л и  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК) — 0,3 мг/л, с добавлением сахарозы в концентрации 3% в обоих вариантах. Питательные среды готовили согласно методическим рекомендациям [3].



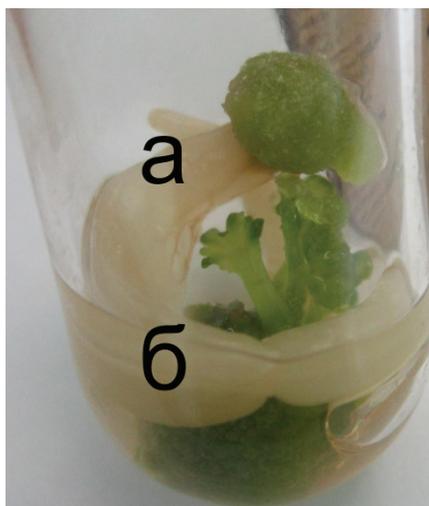
**Рис. 2.** Типы культивируемых эксплантов:

1 — пестик с рыльцем и столбиком, завязь и цветоложе; 2 — пестик с рыльцем и столбиком, завязь; 3 — базальный фрагмент пестика и завязь; 4 — базальный фрагмент пестика, завязь и цветоложе

По истечении трех недель культивирования морфогенные ткани отделяли и переносили на агаризованную среду MS с пониженным содержанием регуляторов роста: среда 1 содержала тидиазурон в концентрации 0,5 мг/л и ИУК 0,1 мг/л; среда 2 содержала БА 1 мг/л и НУК 0,1 мг/л. В обоих вариантах присутствовала сахароза в концентрации 3% и агар — 0,6%.

Для адаптации пробирочных растений к обычным условиям среды использовали растения-регенеранты при наличии трех-четырех корней и не переросшим стеблем длиной 4—6 см (рис. 4). При адаптации в крышке культивационных сосудов проделывали отверстие размером 1—2 мм, которое через двое суток расширяли, а по истечении 7 суток растения извлекали, отмывали от питательной среды корни, погружали их в 0,01% водный раствор перманганата калия и высаживали в простерилизованный почвенный субстрат, состоящий из торфа, песка и плодородной почвы в соотношении 1 : 1 : 2 [4]. Перед высадкой в открытый грунт растения выдерживали 5—10 суток во влажной камере при 16-часовом фотопериоде и температуре воздуха 18—20 °С.

**Результаты исследований.** Проведенные исследования показали, что вначале трогаются в рост завязи, размер которых к концу трех — шести недель культивирования составлял 30—40 мм в длину и 2—5 мм в ширину. Цвет их чаще был белым. Одновременно наблюдалось разрастание цветолож, на которых, формировались почки и зачатки листьев (рис. 3).



**Рис. 3.** Новообразования в культуре эксплантов на 107-е сутки культивирования:  
а — морфогенная ткань, б — почки и зачатки листьев регенеранта

Определена подходящая форма экспланта, вводимого в культуру, и другие факторы, влияющие на его жизнеспособность (табл. 1).

Таблица 1

**Жизнеспособность эксплантов капусты брокколи на жидкой среде MS в зависимости от размера и типа экспланта**

Длина экспланта, мм	Тип экспланта*	Регулятор роста**	Общее кол-во эксплантов, шт.	Обнаружено морфогенных эксплантов, шт.	Обнаружено почек, шт.	Обнаружено побегов, шт.	Коефф. размножения
4—8	1	I	10	10	8	7	0,7
		II	10	9	5	3	0,3
	2	I	10	7	1	0	0
		II	10	6	0	0	0
	3	I	10	7	0	0	0
		II	10	3	0	0	0
	4	I	10	8	6	3	0,3
		II	10	8	5	1	0,1
8,1—10	1	I	10	9	7	5	0,5
		II	10	10	3	2	0,2
	2	I	10	7	0	0	0
		II	10	8	0	0	0
	3	I	10	4	1	0	0
		II	10	6	0	0	0
	4	I	10	9	4	3	0
		II	10	7	2	2	0
10,1—12	1	I	10	7	5	3	0,3
		II	10	6	2	1	0,1
	2	I	10	5	0	0	0
		II	10	5	0	0	0
	3	I	10	3	0	0	0
		II	10	4	0	0	0
	4	I	10	7	3	1	0,1
		II	10	5	1	1	0,1

Примечание: \*Тип экспланта: 1 — пестик с рыльцем и столбиком, завязь и цветоложе; 2 — пестик с рыльцем и столбиком, завязь; 3 — базальный фрагмент пестика и завязь; 4 — базальный фрагмент пестика, завязь и цветоложе. \*\*Регулятор роста: 1 — ТДА, ИУК (1 мг/л; 0,5 мг/л); 2 — БА, НУК (4 мг/л; 0,3 мг/л).

В вариантах, где у эксплантов отсутствовало цветоложе, морфогенез не наблюдался. В варианте, в котором использовали эксплант с удаленными рыльцем и столбиком пестика, отмечена более низкая морфогенная активность. Число почек и побегов было в 1,4 и 2 раза меньше по сравнению с эксплантом, состоящим из рыльца, столбика, завязи и цветоложа.

Образование почек и побегов на среде, содержащей ТДА, ИУК (1 мг/л; 0,5 мг/л); было в 2 и 3 раза (по количеству почек и побегов) активнее, чем на среде, содержащей БА, НУК (4 мг/л; 0,3 мг/л).

Экспланты, длина которых была в диапазоне 4—8 мм, характеризовались более высоким морфогенетическим потенциалом. На таких эксплантах число почек и побегов было в 2 раза выше по сравнению с эксплантами большего размера.

Лучший результат в культуре ткани капусты брокколи достигнут при использовании эксплантов, состоящих из рыльца, столбика, завязи и цветоложа (см. рис. 2, № 1), изолированных из бутонов длиной 4—8 мм, при культивировании на среде, содержащей тидиазурон в концентрации 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л. При данном варианте количеством почек и побегов в пересчете на один эксплант соответственно составило 8 шт. и 7 шт. (см. табл. 1).

Ткани с почками, перенесенные на агаризованную среду, содержащую ТДА в концентрации 0,5 мг/л и ИУК 0,1 мг/л, характеризовались высокой морфогенетической активностью. На 175 изученных трансплантах образовалось 824 почки и 708 побегов, что составляло 4,7 шт. и 4,1 шт. на 1 трансплант соответственно. При этом образование корней не отмечено. На конгломератах, состоящих из ткани и почек, культивируемых на среде с БА в концентрации 1 мг/л и НУК 0,1 мг/л, образовалось меньше почек и побегов. В пересчете на один трансплант число почек составило 3,4 шт., а побегов — 2,9 шт. (табл. 2). При этом на трансплантах наблюдалось образование корней, число которых в пересчете на 1 трансплант составило 5,0 шт. (рис. 4).



**Рис. 4.** Корневая система трансплантов капусты брокколи

**Морфогенез трансплантов брокколи на агаризованной среде MS  
при разных вариантах регуляторов роста**

Вариант регуляторов роста	Про-анализировано побегов, шт.	Обнаружено морфогенных трансплантов		Образовалось побегов		Образовалось почек		Образовалось корней	
		шт.	%	всего	в т.ч. на 1 трансплант	шт.	в т.ч. на 1 трансплант	шт.	в т.ч. на 1 трансплант
ТДА 0,5 мг/л, ИУК 0,1 мг/л	175	172	98,3	708	4,1	824	4,7	0	0
БА 1 мг/л, НУК 0,1 мг/л	160	148	92,5	468	2,9	546	3,4	805	5,0

**Выводы.** Культивирование эксплантов капусты брокколи, состоящих из рыльца, столбика, завязи и цветоложа, изолированных из бутонов длиной 4—8 мм, на жидкой среде MS, содержащей тидиазурон в концентрации 1 мг/л и ИУК 0,5 мг/л, приводит к образованию 8 почек и 7 побегов на эксплант.

Культивирование конгломератов, состоящих из ткани и почек, на агаризованной среде MS, содержащей ТДА в концентрации 0,5 мг/л и ИУК 0,1 мг/л, сопровождается формированием в среднем 4,7 почки и 4,1 побега на 1 трансплант при отсутствии корней.

При культивировании трансплантов на среде, содержащей БА в концентрации 1 мг/л и НУК 0,1 мг/л, образуется меньше почек и побегов, но наблюдается формирование корней, число которых в пересчете на 1 трансплант составило 5,0 шт.

## ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей как метод изучения процессов роста и морфогенеза растений. — М.: Наука, 1964.
- [2] Марьяхина И.Я. Методические указания по размножению кочанной капусты в культуре ткани для использования в селекции. — М.: ВАСХНИЛ, 1985.
- [3] Поляков А.В., Ткачева А.А., Тарасенков И.И., Бирюкова Н.К. Получение растений огурца с повышенной устойчивостью к фузариозному увяданию методами *in vitro*. Методические рекомендации. — М.: ГНУ ВНИИО Россельхозакадемии, 2006.
- [4] Поляков А.В. Получение регенерантов овощных культур и их размножение *in vitro*. Методические рекомендации. — М.: ГНУ ВНИИО Россельхозакадемии, 2005.
- [5] Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell. Res.* — 1968. — 21. — P. 359—368.
- [6] Murashige T.A., Skoog F. Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiologia Plantarum.* — 1962. — V. 15. — P. 473—497.

## EFFECT OF CONCENTRATION OF GROWTH REGULATORS IN THE CULTURE RECEPTACLE BROCCOLI (*BRASSICA OLERACEA VAR. ITALICA*)

S.V. Startsev<sup>1</sup>, A.V. Polyakov<sup>2</sup>,  
V.V. Vvedensky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of genetics, plant growing and protection of plants  
Peoples' Friendship University of Russia  
*Miklukho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198*

All-Russian research institute of vegetable growing  
*Vereja, 500, Ramensky area, Moscow region, Russia, 140153*

The results of the cultivation of different explants of broccoli in vitro in the presence of different growth regulators. The influence of the concentration of growth regulators on the morphogenesis of broccoli transplants. The optimal age and type of bud explants. Fully described the whole process of obtaining plants regenerated in vitro, including their adaptation to the open ground. A number of new technological solutions in the method of micropropagation of this culture.

**Key words:** tissue culture, medium, broccoli explant, receptacle, a growth regulator.

### REFERENCES

- [1] *Butenko R.G.* Kul'tura izolirovannyh tkanej kak metod izuchenija processov rosta i morfogeneza rastenij. — M.: Nauka, 1964.
- [2] *Mar'jahina I. Ja.* Metodicheskie ukazaniya po razmnozheniju kochannoj kapusty v kul'ture tkani dlja ispol'zovaniya v selekcii. — M.: VASHNIL, 1985.
- [3] *Poljakov A.V., Tkacheva A.A., Tarasenkov I.I., Birjukova N.K.* Poluchenie rastenij ogurca s povyshennoj ustojchivost'ju k fuzarioznomu uvjadjaniju metodami in vitro. Metodicheskie rekomendacii. — M.: GNU VNIIO Rossel'hozakademii, 2006.
- [4] *Poljakov A.V.* Poluchenie regenerantov ovoshhnyh kul'tur i ih razmnozhenie in vitro. Metodicheskie rekomendacii. — M.: GNU VNIIO Rossel'hozakademii, 2005.
- [5] *Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.* Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells // *Exp. Cell. Res.* — 1968. — 21. — P. 359—368.
- [6] *Murashige T.A., Skoog F.* Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures // *Physiologia Plantarum.* — 1962. — V. 15. — P. 473—497.