

# БИОТЕХНОЛОГИЯ

## РАЗРАБОТКА ЭФФЕКТИВНОЙ СИСТЕМЫ РЕГЕНЕРАЦИИ PAULOWNIA SHANG TONG (P. FORTUNEI X P. TOMENTOSA)

Б.В. Шурганов<sup>1</sup>, Я.В. Мишуткина<sup>2</sup>,  
Я.Б. Нескородов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Кафедра ботаники, физиологии растений и агробиотехнологии  
Российский университет дружбы народов  
ул. Миклухо-Маклая, 8/2, Москва, Россия, 117198

<sup>2</sup>Лаборатория системной биологии  
Центр «Биоинженерия» РАН  
пр-т 60-летия Октября, 7/1, Москва, Россия, 117312

Проведено исследование регенерационной способности различных типов эксплантов (сегменты листьев, черешков, междоузлий и узлов), а также проведена оценка влияния разных концентраций (от 1 до 10 г/мл) различных регуляторов роста растений (ТДЗ, БАП, ИУК) на частоту регенерации павлонии *Paulownia Shang Tong*. Показано, что узловые экспланты обладают более сильной регенерационной способностью по сравнению с другими типами эксплантов, а ТДЗ наиболее эффективно индуцирует побегообразование, чем БАП. Добавление к цитокининам низких концентраций ауксина способствует лучшему развитию побегов. Оптимальное соотношение ауксин/цитокинин в среде для регенерации —  $1/10$ . При таком соотношении наблюдается наибольшая частота образования адвентивных побегов. Оптимизированные в представленной работе способы регенерации побегов *Paulownia Shang Tong* могут быть использованы для эффективного микроразмножения *in vitro*, а также для генетической трансформации.

**Ключевые слова:** *Paulownia Shang Tong*, клональное микроразмножение, прямая регенерация растений, узловые экспланты, культура клеток и тканей.

Павлония (*Paulownia* spp.) — одна из самых быстрорастущих древесных культур, способная достигать 20—25 м в возрасте десяти лет [1; 3; 6]. Древесина павлонии прочная, легкая по весу и широко применяется в различном производстве [2; 5; 8]. Из-за способности этого дерева к быстрому росту оно используется для восстановления лесных массивов и биоремедиации [13—16]. Каждое из этих направлений чрезвычайно интересно, так как из-за высокого темпа потребления древесины за последние 100 лет лесные массивы сильно истощились [18], а это, в свою очередь, приводит к изменению климата, нарастающему опустыниванию, засолению почв и снижению биоразнообразия.

В настоящее время потребление древесины не только не снизилось, но и немало выросло по причине того, что выросли потребности целлюлозно-бумажной промышленности [18]. Эффективное и экологически рациональное лесное хозяйство способно существенно уменьшить скорость и масштабы этого негативного процесса посредством создания плантаций древесных пород. До недавнего времени основным методом создания таких плантаций являлось искусственное восстановление семенами. Главные недостатки данных подходов — генетическая пестрота получаемого посадочного материала и длительность ювенильного периода. Другой подход — вегетативное размножение — позволяет сохранить генотип материнского растения и сократить продолжительность ювенильного периода.

Однако не все породы, даже на ювенильной стадии, могут размножаться вегетативным способом. Методы культуры клеток и тканей, такие как клональное микроразмножение, органогенез и соматический эмбриогенез, представляют собой вегетативный способ размножения растений *in vitro*. Растения, полученные путем клонального микроразмножения, органогенеза или соматического эмбриогенеза, практически не имеют признаков соматической вариации, что обеспечивает генетическую стабильность клонов [6; 11].

Таким образом, эти методы представляют собой эффективную технологию размножения растений, позволяющую сохранять лучший генетический материал, который может быть использован для создания плантаций древесных пород [10]. В контексте повышенного спроса на промышленную древесину производство плантаций является актуальным, а благодаря клональному микроразмножению можно получить популяцию генетически выравненных деревьев, что позволит точно прогнозировать динамику развития плантаций.

Существует несколько видов павловнии, а также ряд межвидовых гибридов. Разработанные протоколы для регенерации побегов павловнии, использующие различные типы экплантов, соотношения и концентрации регуляторов роста растений, показали зависимость данного процесса от генотипа [4; 7; 9]. Бергманн и Мун в своем исследовании показали, что вариабельность клонов, даже в пределах одного генотипа, довольно высока [3]. Это указывает на необходимость корректировки состава среды для каждого используемого генотипа, чтобы максимизировать производство адвентивных побегов.

**Объект и методика исследования.** Для наших исследований мы выбрали морозостойкий китайский гибрид — *Paulownia Shan Tong*. Данный гибрид выдерживает понижение температуры до  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , он также менее требователен к увлажнению и обладает высокой устойчивостью к болезням. До сегодняшнего дня не было опубликовано данных об эффективности регенерации побегов данного гибрида. В работе использовали коллекцию растений Павловнии (*Paulownia*) гибрида Шанг Тонг (*Shan Tong*), культивируемую *in vitro*, любезно предоставленную проф. д.б.н. А. Тураевым (Биологический факультет, МГУ им. Ломоносова).

Донорные асептические растения павловнии Шанг Тонг культивировали при температуре  $23\text{--}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , с 16 часовым фотопериодом (16/8 — день/ночь). Для освещения использовали лампы Osram L36/77 FLUORA и F36W/33 Cool White. В состав всех питательных сред входили макро- и микросоли MS [12], витамины B-5,

30 г/л сахарозы, 500 мг/л гидролизата казеина, 7 г/л агара и регуляторы роста растений (табл. 1). рН среды доводили до 5,7—5,8 перед автоклавированием. Стерилизацию среды осуществляли в автоклаве при давлении 1,2 атмосферы в течение 15 минут.

Таблица 1

**Гормональный состав сред для культивирования эксплантов Павловнии *in vitro***

Гормоны	Варианты сред для культивирования								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
БАП мг/л	—	1	5	10	10	—	—	—	—
ТДЗ мг/л	—	—	—	—	—	1	5	10	10
НУК мг/л	—	—	—	—	1	—	—	—	1

Примечание: НУК — 1-нафтил-уксусная кислота, БАП — 6-бензиламинопурин, ТДЗ — тидиазурон.

Побеги с тремя-четырьмя парами листьев помещали в чашку Петри и скальпелем отсекали листья и черешки листьев. Оставшийся побег разрезали на узлы и междоузлия. Листья рассекали на фрагменты по 0,5 см<sup>2</sup>. Полученные экспланты помещали в чашки Петри (D = 90 мм), содержащие 25 мл питательной среды, по 10 шт. на чашку. Частоту регенерации анализировали по прошествии 6—8 недель (в зависимости от типа экспланта). Пересадку проводили каждые две недели. В качестве контроля использовали экспланты, культивируемые на MS-среде без регуляторов роста растений в течение 6—8 недель.

Результаты экспериментов представлены в табл. 2, 3, 4. Статистическую обработку данных проводили с помощью теста критических диапазонов Дункана ( $p = 0,05$ ) [17] с заданным значением достоверности 95%.

**Результаты и обсуждение.** Как уже отмечалось, регенерация растений *in vitro* при культивировании изолированных тканей зависит от взаимодействия таких факторов, как генотип исследуемого объекта, состав питательной среды и тип экспланта. Основной целью данной работы было оценить регенерационный потенциал различных типов эксплантов *Paulownia Shan Tong* в присутствии цитокининов (БАП и ТДЗ) в различных концентрациях и в сочетании с ауксинами (ИУК) (табл. 1). Нами была поставлена серия опытов, позволяющих выявить и установить некоторые закономерности процесса регенерации побегов из листьев, черешков листьев, узлов и междоузлий у данного гибрида.

Результаты нашего исследования показали, что прямая регенерация побегов при культивировании изолированных тканей павловнии *in vitro* зависит прежде всего от типа экспланта.

При сравнении различных типов эксплантов было выявлено их различие в эффективности регенерации побегов. Так, на междоузлиях и черешках листьев наблюдалось единичное формирование побегов на местах срезов (рис. 2). На листовых эксплантах, вдоль жилок, происходило образование небольшого количества каллуса, в некоторых случаях с формированием единичных побегов (рис. 3). Наилучшим же типом экспланта, на котором наблюдалась множественная регенерация, являются узлы (рис. 1, 4, 5).

Наиболее эффективным регулятором роста оказался тидиазурон (табл. 2).



**Рис. 1.** Узловые экспланты, культивируемые на среде с 10 мг/л ТДЗ, с очагами образования множественной регенерации



**Рис. 2.** Черешки листьев, культивируемые на среде с добавлением ТДЗ 5 мг/л



**Рис. 3.** Нарезанные на сегменты листья, культивируемые на среде с добавлением ТДЗ 1 мг/л

Таблица 2

**Влияние концентрации ТДЗ и типа экспланта на частоту регенерации павловнии**

Взаимодействие факторов: 1 (концентрация гормона, мг/л) x 2 (тип экспланта)	Среднее значение частоты (коэффициента) регенерации**	Гомогенные группы*
0 x листья	0	A
10 x листья	0	A
0 x черешки	0	A
0 x междоузлия	0	A
1 x междоузлия	0	A
10 x междоузлия	0	A
10 x черешки	0	A

Окончание

Взаимодействие факторов: 1 (концентрация гормона, мг/л) x 2 (тип экспланта)	Среднее значение частоты (коэффициента) регенерации**	Гомогенные группы*
5 x листья	0,00825	A
1 x листья	0,0145	A
5 x междоузлия	0,0225	A
1 x черешки	0,025	A
5 x черешки	0,075	A
0 x узлы	1,575	B
1 x узлы	1,6	B
5 x узлы	2,3375	B
10 x узлы	5,9	C

\*Значения, обозначаемые одной буквой, существенно не отличаются друг от друга, при уровне достоверности  $p = 0,05$ ; по тесту критического диапазона Дункана [17].

\*\*Примечание: коэффициент регенерации рассчитывали как отношение числа образовавшихся побегов к общему числу эксплантов.

Так, частота регенерации узловых эксплантов, культивируемых на средах с содержанием этого цитокинина, была намного выше, нежели на средах, содержащих бензиламинопурин (табл. 3), особенно при добавлении относительно высоких концентраций ТДЗ (5 и 10 мг/л).

Таблица 3

**Влияние концентрации БАП и типа экспланта на частоту регенерации павловнии**

Взаимодействие факторов: 1 (концентрация гормона, мг/л) x 2 (тип экспланта)	Среднее значение частоты (коэффициента) регенерации	Гомогенные группы
0 x листья	0	A
10 x черешки	0	A
0 x черешки	0	A
0 x междоузл.	0	A
1 x листья	0	A
5 x черешки	0	A
1 x черешки	0	A
5 x междоузл.	0	A
5 x листья	0	A
10 x листья	0,01	A
10 x междоузл.	0,03	A
1 x междоузл.	0,05	A
1 x узлы	1,35	B
0 x узлы	1,575	B
5 x узлы	1,7925	B
10 x узлы	1,8	B

Культивирование эксалантов на средах, содержащих соотношения цитокининов с индолилуксусной кислотой (1 мг/л), приводило к заметному увеличению частоты регенерации (табл. 4). Наибольшая частота регенерации в вариантах с добавлением ИУК также наблюдалась на узловых эксплантах.



**Рис. 4.** Узловые экспланты, культивируемые на среде с 10 мг/л БАП

Таблица 4

**Влияние концентрации БАП/ТДЗ; типа экспланта и наличия в составе среды ИУК на частоту регенерации павловнии**

Взаимодействие факторов: 1 (тип цитокинина) x 2 (тип экспланта) x 3 (отсутствие/наличие ИУК)	Среднее значение частоты (коэффициента) регенерации	Гомогенные группы
ТДЗ x листья x без ИУК	0	A
ТДЗ x междоузл. x без ИУК	0	A
БАП x черешки x без ИУК	0	A
ТДЗ x черешки x без ИУК	0	A
БАП x листья x без ИУК	0,01	A
ТДЗ x листья x с ИУК	0,015	A
БАП x листья x с ИУК	0,015	A
ТДЗ x междоузл. x с ИУК	0,02	A
БАП x междоузл. x без ИУК	0,03	A
БАП x черешки x с ИУК	0,125	A
БАП x междоузл. x с ИУК	0,45	A
БАП x узлы x без ИУК	1,8	A
БАП x узлы x с ИУК	2,475	A
ТДЗ x черешки x с ИУК	2,6	A
ТДЗ x узлы x без ИУК	5,9	B
ТДЗ x узлы x с ИУК	7,975	B

Таким образом, полученные нами экспериментальные результаты однозначно свидетельствуют о том, что узловые экспланты обладают более сильной регенерационной способностью по сравнению с другими типами эксплантов, использованными в нашей исследовательской работе.

Продемонстрировано, что образование побегов на эксплантах павловнии происходит главным образом под воздействием цитокининов. Была проверена эффективность применения различных цитокининов: БАП, тидиазуронкинетин. Результаты показали, что ТДЗ является наиболее эффективным для индукции множественной регенерации, чем БАП.



Рис. 5. Узловые экспланты, культивируемые на среде с ТДЗ и ИУК

Показано, что добавление к цитокининам низких концентраций ауксина способствует лучшему развитию побегов. Оптимальное соотношение ауксин/цитокинин —  $1/10$ . При таком соотношении наблюдается наибольшая частота образования адвентивных побегов.

Хорошая система регенерации может стать первым шагом к созданию эффективной системы генетической трансформации павловнии.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] Michael Marcotrigiano and Dennis P. Stimart In vitro organogenesis and shoot proliferation of Paulownia tomentosa steud. (empress tree). Plant Science Letters, 31 (1983) 303—310.
- [2] Ipekci Z., Altinkut A., Kazan K., Bajrovic K., Gozukirmizi N. High Frequency Plant Regeneration from Nodal Explants of Paulownia elongate. Plant biol. 3 (2001) 113—115.
- [3] Ben A. Bergmann and Heung-Kyu Moon In vitro adventitious shoot production in Paulownia. Plant Cell Reports (1997) 16:315—319.
- [4] Dimps Rao C., Chong-Jin Goh, and Prakash P. Kumar High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of Paulownia spp. cultured in vitro Plant. Cell Reports (1996) 16:204—209.
- [5] Yang J.C., Chang S.H., Ho C.K. Micropropagation of Paulownia taiwaniana from mature tissues. Ann. Sci. For. (1989) 46 suppl., 165—167.
- [6] Rout G.R., Reddy G.M. and Das P. Studies on in vitro Clonal Propagation of Paulownia tomentosa steud. and Evaluation of Genetic Fidelity through RAPD Marker. Silvae Genetica 50, 208—212 (2001).
- [7] Ben A. Bergmann Propagation method influences first year field survival and growth of Paulownia. (1998) New Forests 16: 251—264.

- [8] *Ipekci Z., Gozukirmizi N.* Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Rep* (2003) 22:16—24.
- [9] *Bergmann B.A. and Whetten R.* In vitro rooting and early greenhouse growth of micropropagated *Paulownia elongata* shoots. *New Forests* 15: 127—138, 1998.
- [10] *Li X.Y., Huang F.H., Murphy J.B., Gbur E.E.* Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Planters' Notes* 47(2):246—250; 1996.
- [11] *Grossnickle S.C., Cyr D., Polonenko D.R.* Somatic Embryogenesis Tissue Culture for the Propagation of Conifer Seedlings: A Technology Comes of Age. *Tree Planters' Notes* 47(2):48—57; 1996.
- [12] *Murashige T.* A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Cultures / T. Murashige, F. Skooge // *Physiol. Plant.* 1962.
- [13] *Bergmann B.A., Rubin A.R., Campbell C.R.* // *Transactions of the Asae.* General edition, november/december. 1997. Vol. 40. № 6. P. 1733—1738.
- [14] *Ступин Д.Ю.* Загрязнение почв и новейшие технологии их восстановления: Учебное пособие. СПб.: Изд-во Лань, 2009.
- [15] *Merkle S.A.* Engineering Forest Trees with Heavy — Metal Resistance Genes for Phytoremediation // NABC rep. / Nat. agr. Biotechnology council — Ithaca (N.Y.). 2005. № 17; *Agricultural biotechnology: beyond food and energy to health and the environment.* P. 117—121.
- [16] *Ferguson B.W.* Systems Agriculture: Towards a Sustainable Agricultural and Environmental Policy // NABC rep. / Nat. agr. Biotechnology council — Ithaca (N.Y.). 2005. № 17; *Agricultural biotechnology beyond food and energy to health and the environment.* P. 93—101.
- [17] *Duncan D.B.* Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11:1—42, 1955.
- [18] *FAO Forestry Series No. 47* *FAO Statistics Series No. 203* *FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS* Rome, 2014.

## DEVELOPMENT OF EFFECTIVE SYSTEMS OF PLANT REGENERATION PAULOWNIA SHAN TONG (*P. FORTUNEI* X *P. TOMENTOSA*)

**B.V. Shurganov<sup>1</sup>, YA.V. Mishutkina<sup>2</sup>,  
YA.B. Neskorođov<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Department of botany, plant physiology and agrobiotechnology  
Peoples' Friendship University of Russia  
*Miklukho-Maklaya str., 8/2, Moscow, Russia, 117198*

<sup>2</sup>Laboratory of system biology  
Center of Bioengineering, Russian Academy of Science  
*Prospect 60th Anniversary of October, 7/1, Moscow, Russia, 117312*

*Paulownia* is an extremely fast growing, short rotation woody crop plant. Recently, there has been increased interest in this genus because of its potential use in reforestation. Tissue culture methods provide the potential for rapidly multiplying valuable genotypes for reforestation and will help in the race to increase forest productivity. The main objective of this work was, therefore, to develop a rapid and efficient regeneration system for *Paulownia Shan Tong*.

**Key words:** *Paulownia Shan Tong*, reforestation, tissue culture, micropropagation, organogenesis, plant regeneration.

## REFERENCES

- [1] Michael Marcotrigiano and Dennis P. Stimart In vitro organogenesis and shoot proliferation of *Paulownia tomentosa* steud. (empress tree). *Plant Science Letters*, 31 (1983) 303—310.
- [2] Ipekci Z., Altinkut A., Kazan K., Bajrovic K., Gozukirmizi N. High Frequency Plant Regeneration from Nodal Explants of *Paulownia elongata*. *Plant biol.* 3 (2001) 113—115.
- [3] Ben A. Bergmann and Heung-Kyu Moon In vitro adventitious shoot production in *Paulownia*. *Plant Cell Reports* (1997) 16:315—319.
- [4] Dimps Rao C., Chong-Jin Goh, and Prakash P. Kumar High frequency adventitious shoot regeneration from excised leaves of *Paulownia* spp. cultured in vitro *Plant. Cell Reports* (1996) 16:204—209.
- [5] Yang J.C., Chang S.H. Ho C.K. Micropropagation of *Paulownia taiwaniana* from mature tissues. *Ann. Sci. For.* (1989) 46 suppl., 165—167.
- [6] Rout G.R., Reddy G.M., Das P. Studies on in vitro Clonal Propagation of *Paulownia tomentosa* steud. and Evaluation of Genetic Fidelity through RAPD Marker. *Silvae Genetica* 50, 208—212 (2001).
- [7] Ben A. Bergmann Propagation method influences first year field survival and growth of *Paulownia*. (1998) *New Forests* 16: 251—264.
- [8] Z. Ipekci, Gozukirmizi N. Direct somatic embryogenesis and synthetic seed production from *Paulownia elongata*. *Plant Cell Rep* (2003) 22:16—24.
- [9] Bergmann B.A., Whetten R. In vitro rooting and early greenhouse growth of micropropagated *Paulownia elongata* shoots. *New Forests* 15: 127—138, 1998.
- [10] Li X.Y., Huang F.H., Murphy J.B., Gbur E.E. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). *Tree Planters' Notes* 47(2):246—250; 1996.
- [11] Grossnickle S.C., Cyr D., Polonenko D.R. Somatic Embryogenesis Tissue Culture for the Propagation of Conifer Seedlings: A Technology Comes of Age. *Tree Planters' Notes* 47(2):48—57; 1996.
- [12] Murashige T. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Cultures / T. Murashige, F. Skooge. *Physiol. Plant.* 1962.
- [13] Bergmann B.A., Rubin A.R., Campbell C.R. *Transactions of the Asae. General edition*, november/december. 1997. Vol. 40. № 6. P. 1733—1738.
- [14] Ступин Д.Ю. Загрязнение почв и новейшие технологии их восстановления: Учебное пособие. СПб.: Изд-во Лань, 2009.
- [15] Merkle S.A. Engineering Forest Trees with Heavy — Metal Resistance Genes for Phytoremediation // NABC rep. / Nat. agr. Biotechnology council — Ithaca (N.Y.). 2005. № 17; Agricultural biotechnology: beyond food and energy to health and the environment. P. 117—121.
- [16] Ferguson B.W. Systems Agriculture: Towards a Sustainable Agricultural and Environmental Policy // NABC rep. / Nat. agr. Biotechnology council — Ithaca (N.Y.). 2005. № 17; Agricultural biotechnology beyond food and energy to health and the environment. P. 93—101.
- [17] Duncan D B. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11:1—42, 1955.
- [18] FAO Forestry Series No. 47 FAO Statistics Series No. 203 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS Rome, 2014.