

УДК 602.6:58

## ИЗУЧЕНИЕ КАЛЛУСОГЕНЕЗА И МОРФОГЕНЕЗА ХЛОПЧАТНИКА СОРТА «ТУРКИСТАН» В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Манабаяева Ш.А., Рахимжанова А.О., Каиржанова А.Д., Раманкулов Е.М.

РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Астана  
manabayeva@biocenter.kz

Важнейшим фактором для морфогенеза и регенерации растений хлопчатника в культуре *in vitro* является генотип растения. Поэтому для изучения морфогенного потенциала и оптимизации процесса регенерации представляется целесообразным детальное исследование конкретных сортообразцов хлопчатника. В связи с этим подбор эффективных регуляторов роста в культуре *in vitro* для казахстанских сортов хлопчатника представляет одну из наиболее актуальных задач и является трудоемким процессом. Изучение процессов каллусо- и морфогенеза и способов регенерации побегов из стеблевых апикальных меристем и пазушных почек являются важнейшей предпосылкой для регенерации растений с участием элитных казахстанских сортов хлопчатника, в частности, сорта хлопчатника *Туркистан* для проведения работ по генетической трансформации.

Разработана эффективная система стерилизации семян хлопчатника с применением стерилизующих агентов, таких как 70% этанол и 10% раствор гипохлорита натрия, которая позволила получить 100% стерильных асептических проростков для дальнейшей работы в культуре *in vitro*.

Изучены особенности каллусогенеза и морфогенеза казахстанского сорта хлопчатника *Туркистан* в культуре вегетативных органов. Установлено, что частота каллусообразования зависит от типа экспланта, концентрации и соотношения регуляторов роста в питательной среде. Максимальная частота каллусообразования была отмечена у эксплантов из семядолей (89,3%) и гипокотилей (100%) при культивировании на варианте среды МСДК, содержащей регуляторы роста в следующих концентрациях: 2,4-Д - 0,1 мг/л и кинетин - 0,5 мг/л.

Разработан эффективный способ регенерации побегов из стеблевых апикальных меристем и пазушных почек.

Ключевые слова: хлопчатник (*Gossypium hirsutum* L.), регуляторы роста, каллусогенез, морфогенез.

---

### ВВЕДЕНИЕ

Хлопчатник (*Gossypium*) относится к семейству Мальвовые (*Malvaceae*), широко распространен и выращивается в промышленных масштабах, как в средней полосе, так и в тропиках, в более чем 50 странах по всему миру [1]. Род хлопчатника состоит из двух групп растений, различающихся числом хромосом в клетке. Большинство видов хлопчатника диплоидные, то есть обладают двойным набором хромосом. В другой группе – тетраплоидные растения, в неполовых клетках которых 52 хромосомы, то есть 4 набора по 13 хромосом. Выращивают культурные формы в основном 4 видов: диплоидные виды *G. herbaceum* – в Индии, Китае, Японии, Средней Азии и *G. arboreum* – встречается только под тропиками, тетраплоидные виды *G. hirsutum* – в Средней Азии, США, Бразилии, Мексике и *G. barbadense* – в Судане, Средней Азии, США и др. [2].

Основной продукт, получаемый из хлопчатника, волокно - важное сырье для текстильной промышленности. Оно используется для изготовления не только хлопчатобумажных тканей, но и искусственного шелка, кожи, резины и целлулоида (раствор целлюлозы в эфире). Хлопковое волокно является также сырьем для производства пороха. Из семян получают хлопковое масло, которое используется и в пищевой отрасли, и в медицине. Листья применяются как сырьё при получении лимонной и яблочной кислот. В корнях, и особенно в коре корней, в значительном количестве содержится специфический пигмент госсипол – (1,6,7-триокси-3-метил-5-изопропил-8-нафталдегид) – природный полифенол, обладающий химиотерапевтической активностью в отношении различных вирусов и бактерий.

В Казахстане наблюдается тенденция расширения посевов хлопчатника, причем 75% посевных площадей занимают сорта хлопчатника селекции Казахского НИИ хлопководства. Хлопок занимает второе место после зерна в объеме экспорта сельскохозяйственной продукции страны. По данным сельхозуправления ЮКО, в 2011 году хлопок выращивался на площади 138 тыс. гектаров. Основными районами возделывания в ЮКО являются Мактааральский (70% валового сбора) и Шардаринский (15%

валового сбора) районы. По прогнозам Министерства сельского хозяйства РК, устойчивое применение мер государственной поддержки растениеводческой отрасли в течение 5 лет может привести к повышению урожая хлопчатника.

На урожайность хлопчатника оказывают влияние множество факторов: почвенно-климатические условия, рациональный водный режим, используемые механизмы средств борьбы с инфекционными болезнями растений, сорняками и вредителями, кратность и сбалансированность минерального питания, используемые агрохимические приемы, соблюдение основных требований технологии возделывания, уборки и послеуборочной обработки почвы.

Одно из основных направлений инновационного развития аграрного сектора – это применение биотехнологий на основе генетической инженерии, преимуществом которой является возможность получения улучшенных растений коммерчески важных сортов без изменения их агрономических и технологических признаков. С помощью традиционных методов не всегда удается получить сорт устойчивый к абиотическим и биотическим факторам среды, поэтому существует повышенный интерес к применению биотехнологических методов в качестве альтернативного подхода для генетического улучшения хлопчатника. Применение методов культивирования изолированных тканей и органов хлопчатника является наиболее значительным вкладом в изучении морфогенеза в целях его дальнейшего практического применения и основным шагом генетического преобразования данной культуры. Для изучения соматического эмбриогенеза и морфогенеза хлопчатника все чаще используются вегетативные органы, такие как листья, корни, сегменты побега или стебля. Имеющиеся многочисленные литературные данные по вопросам каллусо- и морфогенеза у хлопчатника свидетельствуют о необходимости проведения индивидуальной оптимизации режимов и питательных сред для регенерации растений *in vitro* для каждого сорта. Для районированных сортов, представляющих интерес, в последние годы проведен ряд исследований, направленных на усовершенствование методов регенерации *in vitro* и разработку протоколов каллусогенеза и морфогенеза. В этих работах наблюдали, что только из ограниченного количества сортов хлопчатника можно индуцировать соматический эмбриогенез и регенерацию растений. Например: соматический эмбриогенез был индуцирован из сегментов семядоли, гипокотилей и корней [3, 4]; органогенез из каллусов [5, 6]; регенерация через соматический эмбриогенез из суспензионных культур [7, 8]. Среди ряда исследованных сортов был выделен сорт *Coker*, обладающий высокой регенерационной способностью, однако не имеющий особой хозяйственной ценности [9]. Эффективный протокол соматического эмбриогенеза из каллусной культуры был разработан для элитного сорта хлопчатника *Simian-3*, используя сегменты семядоли, гипокотилей и корней в качестве эксплантов на среде МСБ с добавлением от 3,0 до 5,0 мг/л зеатина [3]. Каллусогенез и соматический эмбриогенез из эксплантов гипокотилей был изучен для некоторых иранских сортов хлопчатника, таких как *Hashem abad*, *Kerman*, *Termaz* и *Sepid*, культивированных на среде МСБ, содержащей в различной комбинации и концентрации ростовые регуляторы. Оптимальной средой для пролиферации эмбриогенного каллуса оказалась среда, содержащая 1,0 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетин и 0,5 мг/л зеатин, и оптимальной средой для соматического эмбриогенеза оказалась безгормональная среда богатая азотом. Однако, процент эмбриогенеза у данных сортов был значительно ниже, чем у сорта *Coker 312* [10]. Данные о том, что сочетание 2,4-Д и кинетина в концентрации 0,1 мг/л и 0,5 мг/л соответственно, способствует эффективному каллусообразованию, были опубликованы Sultanna с соавторами [11]. При этом экспланты из сегментов гипокотилей обладали более высокой частотой индукции каллусогенеза по сравнению с семядольными или корневыми эксплантами. Индийскими учеными была выявлена высокая эффективность органогенеза из каллусов, полученных из корневых эксплантов, и был разработан протокол для сорта *SVPR-2* [12].

Эти данные свидетельствуют, что важнейшим фактором для морфогенеза и регенерации растений хлопчатника в культуре *in vitro* является генотип растения. Поэтому для изучения морфогенного потенциала и оптимизации процесса регенерации представляется целесообразным детальное исследование конкретных сортообразцов хлопчатника. В связи с этим подбор эффективных регуляторов роста в культуре *in vitro* для казахстанских сортов хлопчатника представляет одну из наиболее актуальных задач и является трудоемким процессом. Поэтому целью данной работы было изучение процессов каллусо- и морфогенеза и способов регенерации побегов из стеблевых апикальных меристем и пазушных почек, которые будут важнейшей предпосылкой для регенерации растений с участием элитных казахстанских сортов хлопчатника, в частности, сорта хлопчатника *Туркистан* для проведения работ по генетической трансформации.

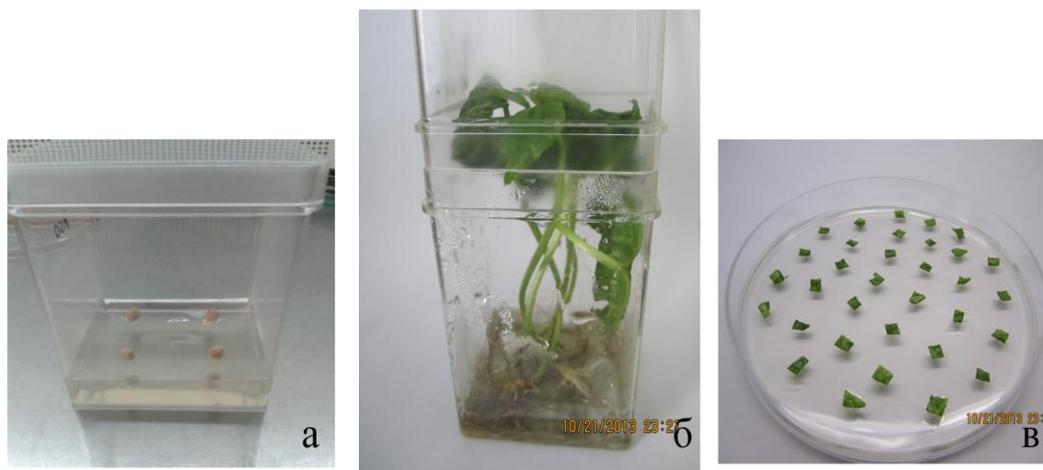
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

*Морфобиологическая характеристика сорта Туркистан.* В работе использовали семена сорта *Туркистан*, районированного в Южно-Казахстанской области. Скороспелый сорт хлопчатника *Туркистан* был выведен в 2002 году. Его вегетационный период всходов до созревания, в зависимости от сроков сева и климатических условий, составляет 108-118 дней. Урожайность составляет в среднем 36-46 ц/га.

*Питательная среда и регуляторы роста.* В качестве основной питательной среды на всех этапах культуры *in vitro* использовали минеральную основу по прописи Мурасиге и Скуга (МС) [13] и МСБ (МС соли с витаминами В5). В качестве регуляторов роста и развития на этапах введения в культуру в

питательную среду вносили ауксины: нафтилуксусную кислоту (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) и индолилмасляную кислоту (ИМК); цитокинины: кинетин, зеатин и гибберелловую кислоту (ГК<sub>3</sub>), N6-2 изопентиладенин (2iP) в различных концентрациях и комбинациях. В качестве источника углерода использовали глюкозу и сахарозу в количестве 30 г/л. Для того чтобы остановить выброс фенольных соединений из культивируемых эксплантов в питательную среду, был использован поливинилпирролидон (ПВП). Сегменты гипокотилей, семядолей и корней культивировали в чашках Петри, содержащей 20-25 мл агаризованной питательной среды МС с различной комбинацией и концентрацией ростовых регуляторов. В качестве источника железирующего агента использовали фитогель в количестве 2 г/л. Полученные каллусы регулярно пересаживали на свежую среду через 28-30 суток. Экспланты культивировали при 16-часовом фотопериоде (освещение люминесцентными лампами 5кЛк), при температуре воздуха 28-30°C и 70% относительной влажности воздуха. Частоту каллусообразования (%) оценивали по количеству эксплантов, продуцирующих каллус, от общего числа эксплантов.

**Стерилизация семян.** Для получения асептического растительного материала проводилось обеззараживание семян хлопчатника с применением стерилизующих агентов – 70% этанола, 3% раствора перекиси водорода и 10% раствора гипохлорита натрия. Перед стерилизацией семена промывали в проточной воде около 8 часов и очищали от линта (волокнистый покров семян, оставшийся после отделения хлопка волокна от семян хлопчатника). Затем последовательно провели двухэтапную стерилизацию семян: 1 - семена, очищенные от линта, обрабатывали в растворе 70% этилового спирта или в 3% растворе перекиси водорода в течение 1 минуты, затем тщательно промывали 3-4 раза стерильной дистиллированной водой; 2 - семена помещали в 10% раствор коммерческого отбеливателя «Белизна», содержащий в качестве активного вещества гипохлорид натрия с добавлением 1-2 капли Твина-20. Время экспозиции составляло 20 минут при постоянном перемешивании, затем промывали в течение 30 минут (3-4 раза меняли воду) стерильной водой. Стерильные семена хлопчатника (3-4 семян в один бокс) высаживали в боксы маджента, содержащие 50 мл безгормональной среды МС, 30% сахарозы, 0,2% фитогель и проращивали в течение от 5 до 14 дней. Достигшие 4-6 см в высоту растения (на стадии первых листьев) извлекали из бокса в асептических условиях и рассекали скальпелем на части (рис. 1.).



а - стерильные семена; б - стерильные проростки; г - изолированные экспланты

**Рис. 1.** Получение асептического растительного материала хлопчатника сорта *Туркистан*

**Экспланты.** Экспланты, в виде сегментов гипокотилей, семядолей и корней 5-7 дневных проростков, использовали для индукции соматического эмбриогенеза и морфогенеза хлопчатника. Апикальные меристемы и пазушные почки двухнедельных стерильных проростков использовали для прямой регенерации в культуре *in vitro*.

**Регенерация.** Регенерационный потенциал сорта хлопчатника *Туркистан* в культуре *in vitro* был изучен путем подбора оптимальных комбинаций ростовых регуляторов и типов экспланта. Первичными эксплантами служили стеблевые апикальные меристемы, гипокотили и пазушные почки двухнедельных стерильных проростков. Стеблевые апикальные меристемы культивировали на среде МС, содержащей 2 мг/л кинетина (Кн) и 1,5 мг/л индолил-3-уксусной кислоты. Для инициации регенерации сегменты гипокотилей и пазушные почки культивировали на среде МСБ с добавлением разных регуляторов роста, в разных концентрациях: 1) МС+0,1 мг/л Кн+1 г/л ПВП; 2) МС+0,1 мг/л Кн+2 мг/л НУК+1 г/л ПВП; 3) МС+1 мг/л гибберелловой кислоты (ГК<sub>3</sub>)+0,2 мг/л НУК; 4) ГК<sub>3</sub> 1 мг/л+0,4 мг/л НУК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первым шагом в генетическом совершенствовании хлопчатника является введение его в культуру ткани. К сожалению, эффективность технологии *in vitro* у хлопчатника лимитирована по сравнению с другими культурами. Нерешенной проблемой, сдерживающей разработку и широкое использование технологий для улучшения хлопчатника, является существенная зависимость процесса морфогенеза *in vitro* от исходного генотипа и отсутствие четко регулируемых систем регенерации растений в культуре клеток и тканей. Стерилизация растительного материала является первым этапом для успешного культивирования растения в условиях *in vitro*. Для стерилизации семян хлопчатника широко используются такие агрессивные стерилизующие агенты как серная кислота ( $H_2SO_4$ ) и сулема ( $HgCl_2$ ). В результате наших экспериментов был отработан более эффективный метод стерилизации семян хлопчатника, с применением других стерилизующих агентов. Разработанная эффективная система стерилизации семян хлопчатника с применением стерилизующих агентов, таких как 70% этанол и 10% раствор гипохлорита натрия позволила получать 100% стерильных семян, что дало возможность получать асептических проростков для дальнейшей работы в культуре *in vitro*.

Известно, что морфологический потенциал культивируемых тканей зависит от органа, из которого взят эксплант, его физиологического возраста, размера, анатомических и функциональных особенностей. На способность изолированных растительных клеток к морфогенезу оказывают влияние как внутренние, так и внешние факторы. К внутренним факторам относятся: видовая принадлежность исходного растения, орган, из которого взят эксплант, возраст экспланта, и даже его масса. В этом случае можно говорить об «эффекте минимальной массы», который сводится к тому, что способность уже детерминированных клеток к дальнейшей дифференцировке зависит от наличия некоторой минимальной массы, необходимой для морфогенеза. К внешним факторам, прежде всего, относятся: состав питательной среды, температура, свет (интенсивность и длина фотопериода). В ряде работ показано, что способность к морфогенезу в условиях *in vitro* у различных органов одного и того же растения различна [14, 15]. Особенности дедифференцировки клеток экспланта и каллусогенеза зависят от эпигенетических характеристик составляющих его тканей. Клетки запасающей паренхимы корня и стебля, мезофилла листа и других специализированных тканей, эксплантационных на питательную среду, содержащую минеральные соли, источники углерода, витамины и гормоны, должны дедифференцироваться, т.е. потерять структуру, характерную для их специфических функций в растении и вернуться к состоянию делящейся клетки. Наибольшей пролиферативной активностью обладают слабо дифференцированные ткани, или ткани, имеющие потенциал к пролиферационной активности в силу своих морфогенетических и функциональных особенностей. В большинстве случаев возникающие в процессе дедифференциации клеток экспланта каллусы характеризуются высокой степенью морфологической и структурной гетерогенности, которая обусловлена наличием различных типов тканей и клеток, их составляющих. Поскольку способность каллусных культур к регенерации растений обусловлена присутствием компетентных к морфогенезу клеток, то сохранение и преимущественное размножение этих клеток, а также подбор условий для их пролиферации может способствовать более длительному сохранению морфогенетического потенциала каллусными культурами.

Способность к каллусообразованию в значительной степени также зависит от типа и концентрации регуляторов роста в питательной среде, как и от типа экспланта. При выборе экспланта мы руководствовались этими условиями и использовали в качестве эксплантов следующие части растения: сегменты гипокотилей, семядолей, корней, апикальные меристемы и пазушные почки. Наиболее мощным индуктором морфогенеза, который принято называть стимулом или сигналом морфогенеза, является изменение соотношения между цитокининами и ауксинами, входящими в состав питательных сред. Присутствие в среде одного ауксина определяет переход специализированной клетки из фазы G0 митоза в S-фазу. Однако для завершения фазы синтеза ядерной ДНК, синтеза белков, стимулирующих переход клеток к митозу и цитокенезу, необходимо добавление к среде кинетина. Фитогормоны в культуре изолированных тканей хлопчатника необходимы для дедифференцировки клеток и индукции клеточных делений. Известны три класса фитогормонов, действующих преимущественно как стимуляторы роста, это ауксины, цитокинины и гиббереллины. Для культуры вегетативных органов хлопчатника широко используются ауксины, такие как ИУК, ИМК, НУК, 2,4-Д [7, 16, 17]; цитокинины, такие как кинетин, БАП, зеатин и N6-(2-изопентил) аденин [18, 19]. Если ауксины вызывают клеточную дедифференцировку, то цитокинины индуцируют деление клеток. Подобно ауксинам, гиббереллины оказывают множественные действия: стимулируют рост в фазе растяжения и деления клеток. При преобладании цитокининов над ауксинами часто начинается стеблевой органогенез, а в случае преобладания ауксина – корневой. Хотя считается, что процесс соматического эмбриогенеза не нуждается в экзогенных гормонах, поскольку сам обеспечивает себя ими, но для хлопчатника в культуре *in vitro* введение дополнительного ауксина является необходимым. У хлопчатника также установлена связь гормонозависимости каллусогенеза с генотипом: при использовании разных регуляторов роста ауксинового и цитокининового типа выявлены значительные различия между видами по способности образовывать каллус на разных составах питательных сред, что, по мнению авторов, определяется генотипом [20].

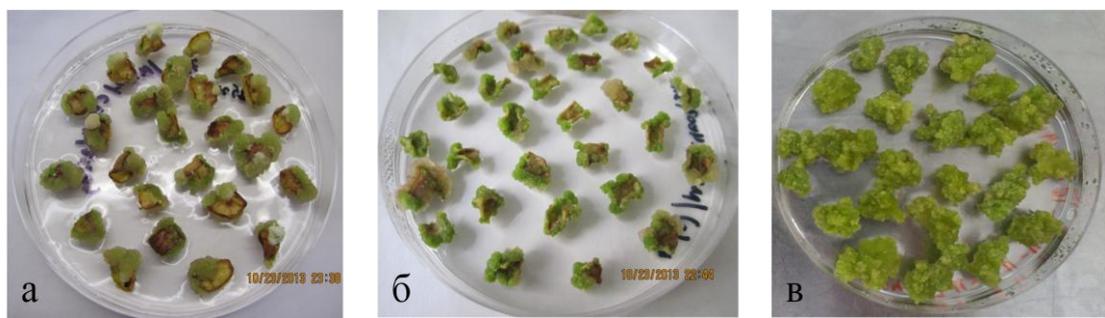
В наших экспериментах при культивировании 5-7-дневных эксплантов через 2 недели происходило формирование каллуса, которое зависело от типа экспланта и состава питательной среды. Как видно из таблицы 1, максимальная частота каллусообразования была отмечена у эксплантов из семядоли (89,3%) и

гипокотилей (100%) при культивировании на варианте среды МСДК, содержащей регуляторы роста в следующих концентрациях: 2,4-Д - 0,1 мг/л и кинетин - 0,5 мг/л (рис. 2а).

**Таблица 1.** Частота каллусообразования в культуре *in vitro* хлопчатника сорта *Туркистан* в зависимости от типа экспланта и состава питательной среды

Среда	Гормоны	Количество, мг/л	Тип эксплантов	Исходное количество эксплантов	Частота каллусогенеза, %
МСАН	НУК+2iP	0,1+5,0	семядоли	260	12,1±0,6
			гипокотиль	128	51,5±2,6
			корень	56	17,8±1,2
МСН	НУК	1,0	семядоли	518	22,3±1,3
			гипокотиль	139	49,7±2,1
			корень	95	2,7±0,3
МСДК	2,4 Д+Кн	0,1+0,5	семядоли	272	89,3±4,3
			гипокотиль	39	100±4,9
			корень	38	86,3±3,5

При культивировании семядольных эксплантов на среде МСН, содержащей НУК в концентрации 1 мг/л, был замечен частичный ризогенез и частичный каллусогенез. На среде МСАН, содержащей 2iP и НУК, в концентрации 5 мг/л и 0,1 мг/л, соответственно, наблюдалась индукция гетерогенных каллусов (рис. 2б). Среда МСДК оказалась оптимальной не только для формирования, но и для длительного субкультивирования каллуса, имеющего разное происхождение. Каллус, полученный из сегментов корней, на данной среде представлял собой рыхлую массу клеток светло-зеленого цвета, тогда как на других средах они были светло-бежевого цвета, как и другие каллусы, образовавшиеся из других эксплантов на данной среде. При пересадке светло-зеленых каллусов на среду, содержащую зеатин в концентрации 0,1 мг/л, формировался каллус темно-зеленого цвета с многочисленными меристемными зонами (рис. 2в).

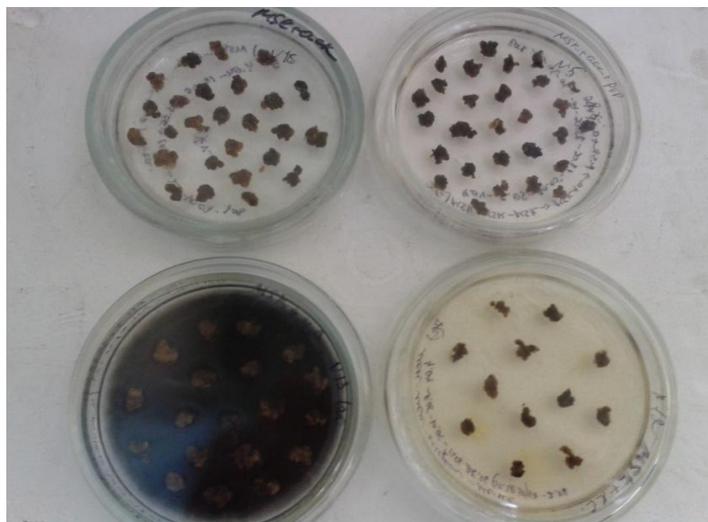


а – формирование каллуса; б – индукция гетерогенных каллусов; в - каллус темно-зеленого цвета с многочисленными меристемными зонами

**Рис. 2.** Типы каллусов, индуцированные у хлопчатника сорта *Туркистан* в культуре *in vitro*

Фенольные соединения являются одними из наиболее распространенных вторичных метаболитов, образование которых свойственно практически всем растительным клеткам. Они принимают участие в самых разнообразных физиологических процессах, таких как фотосинтез, дыхание, формирование клеточных стенок, защите растений от различных патогенов и стрессовых факторов [21]. Одной из сложностей на этапе введения в культуру хлопчатника является ингибирование ростовых процессов токсическими веществами (продуктами окисления фенолов), выделяемыми эксплантом в питательную среду в результате травмы, полученной им при изолировании. Указанные вещества не только подавляют рост эксплантата, но могут привести к его некрозу [22]. Одним из способов снижения влияния продуктов фенольного окисления является включение в питательную среду антиоксидантов и пассирование на свежую питательную среду исходного состава. Одной из основных проблем в получении морфогенного каллуса хлопчатника является «потемнение» каллусов в культурной среде. Для хлопчатника такое высолаживание полифенолов можно избежать путем замены сахарозы глюкозой и путем переноса культуры на свежую

среду каждые 10 дней, или с помощью антиоксидантов. При пассировании светло-бежевых каллусов происходило потемнение каллусов, что свидетельствовало о накоплении фенольных соединений. В качестве антиоксиданта для таких каллусов нами были изучены такие вещества как аскорбиновая кислота (0,1 г/л), ПВП (1 г/л) и активированный уголь (2,0 г/л), нитрат серебра (0,005 г/л), которые могут уменьшить фенольное окисление и способствовать регенерации побегов из эксплантов разного типа.



**Рис. 3.** Каллусы хлопчатника сорта *Туркистан* на средах, содержащих антиоксиданты

В наших экспериментах оптимальной средой для осветления каллусов оказалась среда МСАН, содержащая аскорбиновую кислоту. При визуальной оценке степень осветления каллусов на этой среде была наибольшей. Однако изучение осветленных каллусов для индукции эмбриогенеза не увенчалось успехом. Следует отметить, что содержание фенольных соединений в каллусных клетках привело к их некрозу (гибели).

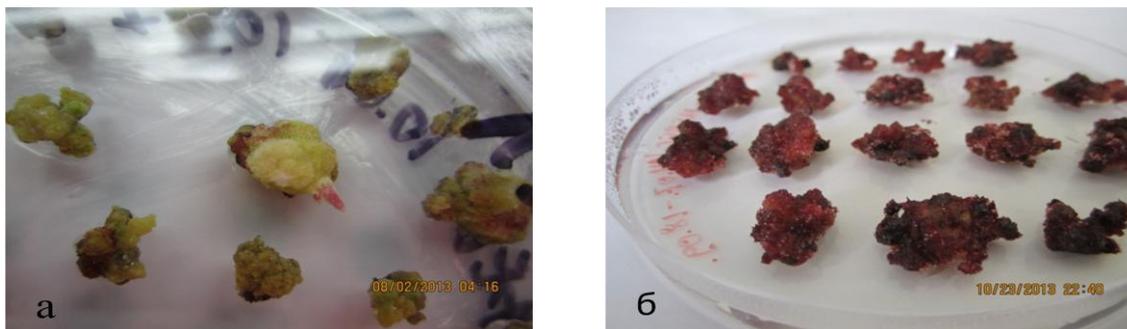
Одним из путей реализации морфогенетической программы клеток *in vitro* является эмбриогенез. Важнейшим условием получения эмбриоидов у хлопчатника является подбор регуляторов роста и их концентраций на каждом этапе эмбриогенеза. В экспериментах для изучения соматического эмбриогенеза были использованы первичные зеленые рыхлые каллусы, полученные на среде МСДК из корневых эксплантов, и плотные зеленые каллусы, полученные на среде МСАН из гипокотильных и семядольных эксплантов. Известно, что существенный стимулирующий эффект на процессы морфогенеза хлопчатника оказывают ионы азота. Для оптимизации питательных сред для индукции соматического эмбриогенеза в питательную среду МС, обогащенную азотом, с помощью добавления 825 мг/л  $\text{NH}_3\text{NO}_3$  и 3800 мг/л  $\text{KNO}_3$ , были внесены в ауксины и цитокинины в различных концентрациях и комбинациях (таблица 2). Известно также, что аминокислоты, такие как глутамин и аспарагин, благотворно влияют на индукцию эмбриоидов. Поэтому среда МСБЕ была также модифицирована с помощью добавления аминокислот глутамин и аспарагин в концентрации 2 г/л и 0,5 г/л соответственно.

**Таблица 2.** Матрица плана эксперимента по оптимизации состава питательной среды для индукции соматического эмбриогенеза у хлопчатника сорта *Туркистан* в культуре *in vitro*

Фитогормоны	МСБЕ-1	МСБЕ-2	МСБЕ-3	МСБЕ-4	МСБЕ-5
ИМК	0,1	0,1	0,3	0,3	1,0
Кинетин	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
2,4- Д	0,01	-	0,01	-	0,1

При пассировании на этих средах длительно культивируемые зеленые каллусы потеряли свою окраску, и образовался гетерогенный каллус, состоящий из рыхлого каллуса желтоватого или коричневатого цвета с белыми уплотнениями. Далее эти каллусы были пересажены на безгормональную питательную среду МСБЕ-6, без аспарагина и глутамин с добавлением хлорида магния. Однако эти гетерогенные каллусы не проявили регенерационную способность. Плотные каллусы формировали корнеподобные выросты (аномальные корни) (рис. 4а), тогда как в рыхлых каллусах индуцировать морфогенез не удалось. На основной массе каллусов была видна антоциановая пигментация (рис. 4б), что предвещает начало эмбриогенеза. Полученные каллусы пассируются с интервалом 3-4 недели на свежую среду, пока на части каллусов не начнет развиваться эмбриогенный каллус.

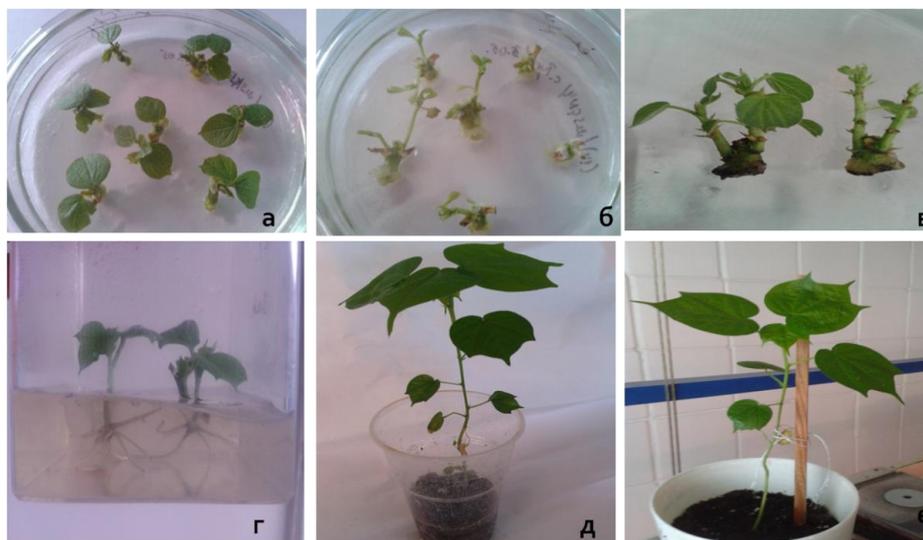
Успех в применении культуры клеток и тканей зависит от оптимизации физиологических процессов, обеспечивающих нормальное деление клеток, их дифференциацию и регенерацию из них взрослых растений, что определяется многими факторами, прежде всего используемыми гормонами. Наиболее сложной является регенерация растений из отдельных клеток.



а – корнеподобные выросты; в - антоциановая пигментация

**Рис. 4.** Изучение соматического эмбриодогенеза у хлопчатника сорта *Туркистан*

У хлопчатника высокая зависимость регенерационной способности эксплантов от генотипа, поэтому оптимизация условий получения растений-регенерантов хлопчатника в культуре *in vitro* остается актуальной. Регенерационный потенциал хлопчатника сорта *Туркистан* в культуре *in vitro* был изучен путем подбора оптимальных комбинаций ростовых регуляторов и типов экспланта. Первичными эксплантами служили стеблевые апикальные меристемы, гипокотили и пазушные почки двухнедельных стерильных проростков. В результате проведенных экспериментов по изучению влияния ростовых веществ на рост и развитие стеблевых апикальных меристем и пазушных почек было установлено, что введение в питательную среду НУК и кинетина в различных соотношениях, хотя и стимулировало образование дополнительных побегов, вызывало в некоторых случаях образование каллуса у основания побега (рис. 5а). Также обнаружено, что внесение в среду фитогормонов в различных комбинациях и концентрациях ингибирует укоренение. Например, у стеблевых апикальных меристем на третий день был обнаружен рост побега и на пятый день выявлено потемнение в базальной части регенерированных эксплантов. Для инициации корнеобразования регенеранты были пересажены на безгормональную среду МС, и спустя две недели было обнаружено корнеобразование у 75% регенерантов (рис. 5г). При культивировании гипокотилей на средах, содержащих НУК и ГК<sub>3</sub>, была обнаружена индукция каллусогенеза (рис. 4а). При культивировании пазушных почек на среде, содержащей 0,1 мг/л кинетина и 1 г/л ПВП, на второй день были обнаружены точки роста, на пятый день – полный рост регенерантов. При повторном культивировании на этой же среде было достигнуто корнеобразование у 68% регенерантов. Известно, что гиббереллины оказывают влияние на рост и вытягивание побегов, стеблей. На среде, содержащей 1 мг/л ГК<sub>3</sub> в комбинации с НУК в концентрации 0,2 и 0,4 мг/л, было обнаружено, что присутствие ГК<sub>3</sub> в обоих вариантах сред стимулировало вытягивание междоузлий стеблей и присутствие ауксина НУК вызывало образование каллуса у основания побега (рис. 5б).



а – апикальные меристемы; б – гипокотили; в – пазушные почки; г – корнеобразующие апикальные меристемы; д, е – растения-регенеранты, высаженные в почву

**Рис. 5.** Хлопчатник сорта *Туркистан* в культуре *in vitro*

Регенеранты с хорошей корневой системой (рис. 5г-е) высаживали в стаканчики со смесью почвы и вермикулита 50/50, и через 3-4 недели адаптированные проростки пересаживали в грунт и выращивали в условиях теплицы.

Таким образом, в результате проведенных исследований подобрана оптимальная питательная среда регенерации растений из апикальных меристем и пазушных почек хлопчатника сорта *Туркистан*.

## ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований разработана эффективная система стерилизации семян хлопчатника с применением стерилизующих агентов, таких как 70% этанол и 10% раствор гипохлорита натрия, которая позволила получить 100% стерильных асептических проростков для дальнейшей работы в культуре *in vitro*.

Изучены особенности каллусогенеза и морфогенеза казахстанского сорта хлопчатника *Туркистан* в культуре вегетативных органов. Установлено, что частота каллусообразования зависит от типа экспланта, концентрации и соотношения регуляторов роста в питательной среде. Максимальная частота каллусообразования была отмечена у эксплантов из семядолей (89,3%) и гипокотилей (100%) при культивировании на варианте среды МСДК, содержащей регуляторы роста в следующих концентрациях: 2,4-Д - 0,1 мг/л и кинетин - 0,5 мг/л.

Разработан эффективный способ регенерации побегов из стеблевых апикальных меристем и пазушных почек для проведения работ по генетической трансформации хлопчатника.

Работа выполнена в рамках Межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС МГ.0591 «Инновационные биотехнологии» на 2012-2014 годы.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Smith W.C. *Production Statistics // Cotton: Origin, History, Technology and Production*. Eds. Smith W.C., Cothren J.T. – New York: John Wiley and Sons, 1999. - P. 435-449.
2. Wendel J.F., Cronn R.C. *Polyploidy and the evolutionary history of cotton // Advances in Agronomy*. - 2003. - Vol. 78. - P. 139-186.
3. Zhang B.H., Feng R., Liu F., Wang Q. *High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration of an elite chinese cotton variety // Botanical Bulletin of Academia Sinica*. - 2001. - Vol. 42. – P. 9-16.
4. Kumria R., Sunnichan V.G., Das D.K., Gupta S.K., Reddy V.S., Bhatnagar R.K., Leelavathi S. *High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (Gossypium hirsutum) through metabolic stress // Plant Cell Reports*. - 2003. - Vol. 21. - P. 635-639.
5. Ikram U.H. *Callus proliferation and somatic embryogenesis in cotton (Gossypium hirsutum L.) // African Journal of Biotechnology*. - 2005. - Vol. 4. - P. 206-209.
6. Efe L. *Callus formation and plant regeneration from two cotton species (Gossypium hirsutum L., and G. barbadense L.) // Pakistan Journal of Botany*. - 2005. - Vol. 37. - P. 227-236.
7. Ganesan M., Jayabalan N. *Carbon source dependent somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton, Gossypium hirsutum L. cv. SVPR2 through suspension cultures // Indian Journal of Experimental Biology*. - 2005. - Vol. 43. - P. 921-925.
8. Rajasekaran K., Hudspeth R.L., Cary J.W., Anderson D.M., Cleveland T.E. *High frequency stable transformation of cotton (Gossypium hirsutum L.) by particle bombardment of embryogenic cell suspension cultures // Plant Cell Reports*. - 2000. - Vol. 19. – P. 539-545.
9. Trolinder N.L., Goodin J.R. *Somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton (Gossypium hirsutum L.) // Plant Cell Reports*. – 1987. - Vol. 6. – P. 231-234.
10. Ghaemi M., Majd A., Fallahian F., Bezdi K.G. *Comparison of callus induction and somatic embryogenesis of some Iranian cottons (Gossypium Spp.) with Coker 312 and histology of somatic embryogenesis // African Journal of Biotechnology*. - 2011. – Vol. 10. – P. 2915-2922.
11. Sultana R., Hossain N. *In vitro callus induction, shoot formation and their histological study in cotton (Gossypium sp.) // Bangladesh Research Publications Journal*. - 2011. - Vol. 5. - P. 306-313.
12. Ganesan M., Jayabalan N. *Influence of cytokinins, auxins and polyamines on in vitro mass multiplication of cotton (Gossypium hirsutum L. cv. SVPR2) // Indian Journal of Experimental Biology*. - 2006. - Vol. 44. – P. 506-513.
13. Murashige T., Skoog F. *A revised medium for rapid growth and biosynthesis with tobacco tissue culture // Plant Physiology*. – 1962. - Vol. 15. - P. 473-497.

14. Бутенко Р.Г. Биология культивируемых клеток и биотехнология на их основе. - М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
15. Головкин Б.Н., Руденская Р.Н., Трофимов И.А. Биологически активные соединения растительного происхождения: в 3 т. - М.: Наука, 2002. – Т. 3. – С. 105-223.
16. Sun Y., Zhang X., Huang C., Guo X., Nie Y. Somatic embryogenesis and plant regeneration from different wild diploid cotton (*Gossypium*) species // *Plant Cell Reports*. - 2006. - Vol. 25. - P. 289-296.
17. Wilkins T.A., Mishra R., Trolinder N.L. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of cotton // *Journal of Food, Agriculture and Environment*. - 2004. – Vol. 2. – P. 179-187.
18. Kumar M., Tuli R. Plant regeneration in cotton: A short-term inositol starvation promotes developmental synchrony in somatic embryogenesis // *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*. - 2004. – Vol. 40. - P. 294-298.
19. Zhang B.H., Feng R., LIU F., Wang Q. Direct somatic embryo genesis and plant regeneration from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) explants // *Israel Journal of Plant Sciences*. - 2001. - Vol. 49. - P. 193-196.
20. Быкова Е.В., Лев С.В. Генотипические особенности процесса каллусогенеза у хлопчатника // *Генетика*. - 1988. – №7. - С. 1317-1370.
21. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растений // 56-е Тимирязевское чтение. - М.: Наука, 1996. - 25 с.
22. Kouakou T.H., Waffo T.P., Kouadio Y.J., Valls J., Richard T., Decendit A., Mérillon J.M. Phenolic compounds and somatic embryogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. - 2007. - Vol. 90. – P. 25-29.

## ТҮЙІН

*In vitro* культурасында мақтаның морфогенезі мен регенерациясы үшін генотип маңызды фактор болып табылады. Сондықтан да морфогенді потенциал мен регенерация процесін оңтайландыру үшін нақты мақта сорттарын түбегейлі зерттеу қажет. Осыған байланысты мақтаның қазақстандық сорттары үшін *in vitro* культурасында тиімді өсу реттегіштерін таңдау қиын (еңбекті көп қажет ететін) және өзекті мәселе болып табылады. Мақтаның Түркістан сортында генетикалық трансформация бойынша жұмыстарды жүргізу мен қазақстандық элиталық мақта сорттарын пайдаланып өсімдіктерді регенерациялау үшін маңызды алғышарт болып табылатын сабақтың апикалды меристемалары мен қолтық бүршіктерінен каллусогенез, морфогенез процестері мен регенерация тәсілдерін зерттеу болып табылды.

70% этанол мен 10% натрий гипохлориті зарарсыздандыру агенттерін пайдалана отырып мақта дәндерін зарарсыздандырудың тиімді жүйесі жасалды. Бұл зарарсыздандыру жүйесі *in vitro* культурасында жұмыс істеу үшін 100% зарарсыз асептикалық өскіндерді алуға мүмкіндік береді.

Вегетативті мүшелер культурасында қазақстанның Түркістан мақта сортының каллусогенез бен морфогенез ерекшеліктері зерттелді. Нәтижесінде каллус түзу жиілігі қоректік ортадағы өсу реттегіштерінің қатынасы мен концентрациясына, эксплант типіне байланысты екені анықталды. Каллус түзілудің максималды жиілігі құрамында 0,1 мг/л 2,4-Д мен 0,5 мг/л кинетин бар MSDK қоректік орта нұсқасында өсіру кезінде тұқымбүршіктері (89,3%) мен гипокотилде (100%) байқалды.

Қолтық бүршіктері мен сабақтың апикалды меристемаларынан өскіндерді регенерациялаудың тиімді әдісі жасалды.

**Кілтті сөздер:** мақта (*Gossypium hirsutum* L.), өсу реттегіштері, каллусогенез, морфогенез.

## SUMMARY

Plant genotype is the major factor for morphogenesis and regeneration in tissue culture of cotton. Therefore the study of morphogenesis and optimization of regeneration in tissue culture for particular cotton varieties is necessary. In this regard selection of effective growth regulators in tissue culture for the Kazakhstan cotton varieties represents one of the most actual tasks and is labor-intensive process. The study of processes callus- and morphogenesis and ways of regeneration from shoot apical meristem and axillary buds will be the major precondition for plant regeneration from Kazakhstan elite cotton varieties, in particular from variety Turkestan for use in genetic transformation.

The effective cotton seed sterilization system with application of sterilizing agents, such as 70% ethanol and 10% sodium hypochlorite solution which allowed to receive 100% of sterile aseptic plantlets for further tissue culture work have been developed.

Features of and morphogenesis of Kazakhstan cotton variety Turkestan *in vitro* cultures of vegetative bodies are studied. It was established that the frequency of a callusogenesis depends on explant type, concentration and ratio of growth regulators of the cultivation medium.

The maximum frequency of a callusogenesis was noted from cotyledon (89,3%) and hypocotyl explants (100%) on the cultivation media MSDK containing growth regulators in the following concentration: 2,4-D - 0,1 mg/l and kinetin - 0,5 mg/l.

The effective way of regeneration from shoot apical meristems and axillary buds has been established.

**Keywords:** cotton (*Gossypium hirsutum* L.) growth regulators, callusogenesis, morphogenesis.

