

Людмила АЛЕКСЕЕНКО

КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЕ В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ IN VITRO У *SOLANUM LACINIATUM* AIT.

Паслен дольчатый (*S. laciniatum*) — единственная промышленная культура в СССР, гликоалкалоиды которой являются сырьем для синтеза важнейших лекарственных стероидных препаратов.

Трудность скрещивания паслена дольчатого ($2n=92$) с пасленом птичьим (*S. aviculare*; $2n=46$), листья которого отличаются высоким содержанием гликоалкалоидов, обусловленная разными уровнями пloidности, вызвала необходимость постановки исследований в направлении уравнивания соматического набора хромосом обоих компонентов скрещивания. С этой целью успешно применен метод колхицинирования паслена птичьего, и полученные тетраплоидные растения использованы при гибридизации с пасленом дольчатым (Резникова и др., 1965). Замена в скрещиваниях естественной тетраплоидной формы паслена дольчатого ($2n=92$) его гаплоидной формой ($2n=46$) позволила бы решить ряд проблем как относительно преодоления несовместимости *S. laciniatum* с видами паслена более низкой пloidности, обладающими некоторыми более ценными хозяйственными качествами, так и относительно селекции паслена на диплоидном уровне.

Одной из возможностей получения гаплоидов является метод культуры изолированных тканей и клеток с последующей регенерацией из гаплоидных тканей растений. Методом культуры пыльцы *in vitro* получены гаплоидные растения перца (Campos, Morgan, 1958), дурмана (Guha, Maheshwari, 1964, 1966, 1967), табака (Nitsch и др., 1969; Sunderland, Wicks, 1969) и т. д. Имеются сообщения о культивировании на искусственной питательной среде неоплодотворенных яйцеклеток и семяпочек (Uchimiya и др., 1971). При культивировании *in vitro* неоплодотворенной яйцеклетки баклажана наблюдалось ее деление; в культуре семяпочки кукурузы из каллуса дифференцировались адвентивные корешки.

В настоящей статье представлены результаты по исследованию возможностей получения андроклиных гаплоидов паслена дольчатого методом культуры пыльников и пыльцевых зерен.

Материал и методика

В качестве доноров пыльников и пыльцевых зерен были использованы растения паслена дольчатого (*S. laciniatum*) интродукции Всесоюзного научно-исследовательского института лекарственных растений (Московская область), коллекционный номер 3061.

На агаризованных питательных средах инкубировали пыльники с полностью созревшей пылью и с пылью в стадии тетрад и одноядерной пыльцы. Зрелые пыльники собирали с однодневных цветков, незрелые заготавливали вместе с бутонем непосредственно перед посевом. Прделана предварительная работа по фиксации размеров

бутонов у различных растений и их побегов с тем, чтобы определить степень зрелости пыльцы по величине бутона.

Питательные среды для культуры пыльников составляли по Нич (Nitsch, Nitsch, 1957), Мурашиге и Скуг (Murashige, Scoog, 1962). К основным питательным смесям добавляли витамины по Стаба (Staba, 1962), а также биологически активные вещества, сахарозу или глюкозу (табл. 1).

Таблица 1

Добавки к основной среде Мурашиге и Скуг

Номер среды	2,4-Д	Кинетин	ИУК	АНУ	Агар	Сахароза	Глюкоза
	мг/л				%		
1-а	1,0	0,5	0,5	—	1,0	—	—
1-б	1,0	0,5	0,5	—	1,0	3,0	—
1-в*	1,0	0,5	0,5	—	1,0	—	3,0
1-г*	1,0	0,5	0,5	—	0,8	—	3,0
2-а	2,0	1,0	1,0	—	1,0	—	—
2-б	2,0	1,0	1,0	—	1,0	3,0	—
2-в	2,0	1,0	1,0	—	1,0	—	3,0
3-а	—	1,0	1,0	0,25	1,0	—	—
3-б	—	1,0	1,0	0,25	1,0	3,0	—
3-в	—	1,0	1,0	0,25	1,0	—	3,0
4-а	—	2,0	2,0	—	1,0	—	—
4-б	—	2,0	2,0	—	1,0	3,0	—
4-в*	—	2,0	2,0	—	1,0	—	3,0
4-г*	—	2,0	2,0	—	0,8	—	3,0
5	1,0	0,5	0,5	0,25	1,0	—	3,0
6	—	2,0	2,0	0,25	1,0	—	3,0

* Среды, на которых отмечено образование каллусной ткани.

Для очистки от примесей агар-агар перед употреблением в течение 3—4 ч замачивали в 1,0%-ном растворе соляной кислоты, затем промывали в течение суток в холодной проточной воде и просушивали.

В качестве стерилизаторов применяли 8—20%-ные растворы перекиси водорода, 1,0%-ный раствор диоксида и 0,1%-ный раствор сулемы. На 20 мл среды помещали 10 пыльников (повторность — 15—20-кратная). Незрелые пыльники стерилизовали в бутонах, после стерилизации их извлекали с помощью скальпеля и перед посадкой на питательные среды слегка надсекали.

Посуду с культурой пыльников помещали в термостат с температурой воздуха $25 \pm 1^\circ \text{C}$ и оставляли на свету.

Результаты опытов

Из испытанных нами стерилизующих агентов наиболее удобным в работе и мягким оказался 10%-ный раствор перекиси водорода. Стерилизация бутонов 10%-ным раствором перекиси водорода в течение 10 мин без последующей промывки их в дистиллированной воде обеспечивала абсолютную стерильность всего посадочного материала с сохранением 100%-ной жизнеспособности пыльников. При стерилизации бутонов с последующей промывкой иногда имело место инфицирование пыльников. Другие режимы стерилизации вызывали полную

или частичную гибель пыльников в результате инфицирования материала или потери жизнеспособности.

Для 0,1%-ного раствора сулемы и 1,0%-ного раствора диацита нам не удалось подобрать такой режим стерилизации, при котором сохранившие жизнеспособность пыльники были бы стерильными. При непродолжительной экспозиции стерилизации (3 мин) в 0,1%-ном растворе сулемы мы наблюдали высокую инфицированность материала (88,0%), при стерилизации в течение 5 и 7 мин процент гибели пыльников достигал соответственно 15 и 30. После стерилизации 1,0%-ным раствором диацита в течение 5 мин 73,3% пыльников оставались инфицированными. При стерилизации в течение 10 мин резко увеличивалось количество погибших пыльников (40,0%).

Зрелые пыльники на всех испытанных средах не давали новообразований ни в виде каллуса, ни в виде дифференцированной ткани, т. е. биологически оставались инертными и через 3—4 суток погибали. Каллус образовывали только пыльники, содержавшие пыльцу в стадии тетрад и одноядерную пыльцу. В двух случаях из таких пыльников развились небольшие лепестки бледно-лилового цвета. Каллус и лепестки получены на средах Мурашиге и Скуг 1-в, 1-г и 4-в, 4-г. Процент пыльников, развивших каллусную ткань, от общего числа культивируемых пыльников на всех средах был различным (табл. 2).

Каллус быстрее появлялся и лучше развивался на среде 4-в. Если на среде 1-в каллус появлялся через 30—40 дней, то на среде 4-в начало образования каллуса отмечено через 4—5 дней после посадки пыльников. Следует отметить, что каллусообразование происходило только на средах, содержащих глюкозу. По-видимому, изолированные ткани паслена дольчатого не способны гидролизовать сахарозу до моносахаридов.

Таблица 2

Влияние состава питательных сред на образование каллусной ткани из пыльников паслена дольчатого

Номер среды	Кол-во инкубированных пыльников	Кол-во пыльников, образовавших каллусы	Каллусообразование, %
1-в	350	4	1,14
1-г	200	2	1,00
4-в	280	4	1,42
4 г	150	2	1,33

Более низкий процент каллусообразования на средах, содержащих 0,8% агар-агара, возможно, объясняется тем, что эти среды довольно быстро высыхали и частые пассажи ткани на свежие среды отрицательно действовали на их развитие.

Несмотря на то, что удалось получить только каллусную ткань, метод культуры пыльников паслена дольчатого представляется нам перспективным и требует дальнейшей разработки.

ЛИТЕРАТУРА

- Резникова С. А., Корнева Е. И., Кондратенко П. Т., 1965. Преодоление нескрещиваемости при отдаленной гибридизации у паслена. Генетика 5 : 142—145.
- Сампос, F. F., Morgan, D. T., 1958. Haploid Pepper from a sperm. Heredity 49 (4) : 135—137.
- Guha, S., Maheshwari, S. C., 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature (204) : 497.
- Guha, S., Maheshwari, S. C., 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature (212): 97—98.
- Guha, S., Maheshwari, S. C., 1967. Development of embryos from pollen grains of *Datura in vitro*. Phytomorphol. 17 (1—4) : 454—461.

- Murashige, T., Scoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* **15** (3) : 473—493.
- Nitsch, J.-P., Nitsch, C., 1957. Auxin dependent growth of excised compounds. *Amer. J. Bot.* **44** (6) : 555—564.
- Nitsch, J.-P., Nitsch, C., Hamon, S., 1969. Production de *Nicotiana* diploïdes à partis de cals haploïdes cultivés *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.* **269** (14) : 1275—1278.
- Staba, E. J., 1962. Production of cardiac glycoïdes by plant tissue cultures. I. Nutritional requirements in tissue cultures of *Digitalis lanata* and *Digitalis purpurea*. *J. Pharm.* **51** (3) : 249—254.
- Sunderland, N., Wick, F. M., 1969. Cultivation of haploid plant from tobacco pollen. *Nature* **224** (5225) : 1227—1229.
- Uchimiya, H., Kameya, T., Takahashi, N., 1971. *In vitro* culture of unfertilized ovules in *Solanum melongena* and in *Zea mays*. *Jap. J. Breed.* **21** (5) : 247—250.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
10/XII 1976

Ljudmila ALEKSEJENKO

KALLUSE MOODUSTUMINE MAAVITSA *SOLANUM LACINIATUM* AIT. KOEKULTUURIS *IN VITRO*

Resümee

Maavitsa *S. laciniatum* Ait. kasutatakse toorainena steroidsete ravimpreparaatide valmistamiseks.

S. laciniatum'i ($2n=92$) ristamist rohkem glükoalkaloide sisaldava *S. aviculare*'ga ($2n=46$) raskendab nende erinev ploidsustase. Ristamine on hõlpsam, kui kasutada isoleeritud kasvatatud kudesid ja rakke. Selleks külvati *S. laciniatum*'i täielikult valminud, tetraadi- ja ühetuumastaadiumis tolmuteradega tolmutoid Nitschi, Murashige ja Scoogi meetodil ning Staba järgi vitaminiseeritud, lisanditega agarsöötmetele. Kalluse moodustasid ainult tetraadi- ja ühetuumastaadiumis olevad tolmutoidid Murashige ja Scoogi glükoossöötmele, millele oli lisatud kinetiini vastavalt 0,5 ja 2,0 mg/l, heteroauksiini 0,5 ja 2,0 mg/l ning 2,4-D-d 1,0 mg/l. Kalluse moodustumise protsent kultiveeritud tolmutoidide üldhulgast ja kasvuintensivsuse olid erinevad; nad sõltusid lisandite hulgast ja kvaliteedist ning agar-agi sisaldusest söötmes.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Toimetusse saabunud
10. XII 1976

Ludmila ALEKSEYENKO

THE FORMATION OF CALLUS IN *SOLANUM LACINIATUM* AIT. CELL CULTURES *IN VITRO*

Summary

S. laciniatum is a raw material for the production of steroid medicines.

The hybridization of *S. laciniatum* ($2n=92$) with *S. aviculare* ($2n=46$) is very difficult because of differences in the ploidy level. As a method to overcome the incompatibility of species, the culture method of isolated tissues and cell is useful. For this purpose fully ripened, in the tetrad and one nucleous stage anthers of *S. laciniatum* were sown on the solid mediums of Nitsch, Murashige and Scoog with vitamins by Staba and other additions. Callus was formed only by the anthers in the tetrad and nucleous stage, and developed on the glucose medium of Murashige and Scoog with additions (kinetin — 0.5 and 2.0 mg/l, heteroauxin — 0.5 and 2.0 mg/l, 2,4-D — 1.0 mg/l). The percentage of callus formation in the total number of cultivated anthers and the intensity of callus development were different and depended on the quantitative and qualitative composition of additions as well as on the percentage of agar content in the nutrient medium.

Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology

Received
Dec. 10, 1976