

МОРФОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ АВОКАДО (*PERSEA AMERICANA* MILL.) ПРИ ВАРЬИРОВАНИИ КОНЦЕНТРАЦИИ ЭКЗОГЕННЫХ АУКСИНОВ

Е.В. Кукуть, А.О. Логвина

Белорусский государственный университет, Минск, lohvina@bsu.by

Ауксины — это растительные гормоны, которые играют центральную роль в контроле роста и развития растений в различных условиях окружающей среды. Даже в низких концентрациях ауксины могут регулировать экспрессию генов посредством специфических факторов транскрипции и белков, которые модулируются в сигнальном каскаде в зависимости от реакций окружающей среды. Хорошо известно, что ауксин может запускать очень быстрые нетранскрипционные реакции, такие как активация протонного насоса плазматической мембраны и ионных каналов, а также переориентация микротрубочек. С другой стороны, стало ясно, что многие реакции развития в ответ на ауксиновое влияние опосредованы изменениями в экспрессии тысяч генов. Эти нетранскрипционные и транскрипционные ответы могут быть взаимосвязаны. Ауксин ввиду его мощного влияния на деление, рост и дифференцировку клеток очень часто используется для искусственного контроля роста растений. Наиболее распространенное применение ауксина в нашей повседневной жизни – выращивание растений из черенков. Поскольку ауксин индуцирует деление клеток в физиологических концентрациях, его можно использовать в сбалансированном сочетании с другим регулятором роста, цитокинином, для стимулирования пролиферации клеток в клеточной культуре или размножения *in vitro* [1].

При использовании ауксинов при получении и поддержании клеточных культур необходимым этапом исследований является определение подходящего фитогормонального состава среды в целом, типа и концентрации ауксина в частности.

Целью данной работы было изучение сочетанного влияния ауксинов 2,4-дихлофеноксисукусной кислоты (2,4-Д) и индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) на показатели роста и цитоморфологические показатели каллусной культуры авокадо (*Persea americana* Mill.).

Наибольший интерес для введения в культуру *in vitro* представляют экономически важные растения, обладающие ценными лекарственными и питательными свойствами. Одним из подобных растений является авокадо или **персея американская** [2]. Помимо пищевой отрасли авокадо нашло применение и в медицине. Препараты на основе авокадо обладают тонизирующим, общеукрепляющим, гипогликемическим, противопаразитарным, противовоспалительным и антимикробным действием. Семена являются природным антибиотиком, способны бороться с патогенными бактериями и грибами. Холодным или горячим прессованием из плодов получают масло, которое обладает регенерирующими, иммуностимулирующими, противовоспалительными, антиоксидантными и противовирусными свойствами. Биологически активными веществами богаты и листья авокадо. Многие физиологические активности экстрактов листьев авокадо связывают с присутствием фенольных соединений [3].

Полученная ранее листовая каллусная культура рассматривается нами в первую очередь как основа для дальнейшей разработки техники микроклонального размножения. Ввиду этого определение ее физиологических и биохимических показателей и закономерной их регуляции представляется важной задачей [2].

В работе объектом была каллусная культура авокадо, инициированная нами в 2020 г. на листовых эксплантах асептически выращенного растения (рисунок 1).

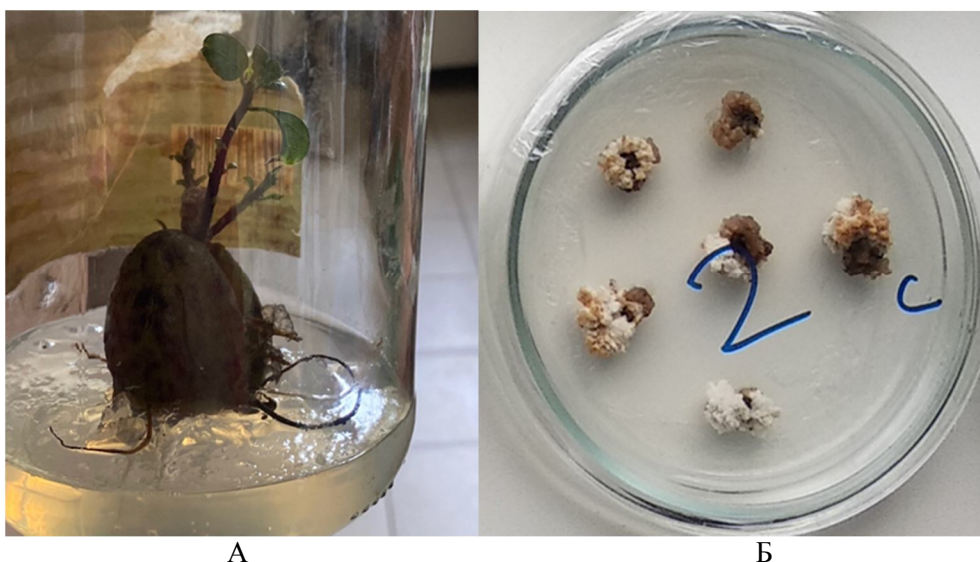


Рисунок 1. – Общий вид асептически выращенного растения авокадо (А); внешний вид листового каллуса авокадо (Б)

В работе была использована основная питательная среда Мурасиге и Скуга [1], дополненная 30 г/л сахарозы и фитогормонами – ауксинами 2,4-Д и ИУК, цитокинином 6-бензиламинопурином (6-БАП). Были протестированы 6 вариантов концентраций ИУК и 6 вариантов концентраций 2,4-Д. Контролем на всех этапах эксперимента служила питательная среда, содержащая 2,4-Д в концентрации 1 мг/л, 1 мг/л ИУК и 3 мг/л 6-БАП. Данный вариант питательной среды был отобран, как наиболее оптимальный, на первоначальных этапах изучения каллуса авокадо. Перечни используемых вариантов сред в данном исследовании представлены в таблицах 1 и 2. Уплотнителем служил агар-агар в концентрации 8 г/л. Каллусную ткань культивировали в условиях микробиологического термостата при температуре 24°C в темноте.

В ходе эксперимента оценивали влияние различных комбинаций фитогормонов на цитоморфологические характеристики каллуса и его ростовые параметры (индекс роста, время удвоения биомассы (сут.), удельная скорость роста (сут⁻¹)). Для проведения цитоморфологической оценки готовили давленные препараты, которые просматривали под микроскопом. Окрашивание клеток каллуса не осуществлялось.

Следует отметить, что ещё на этапе инициирования каллусные культуры обнаруживали необычные характеристики. Некоторые из них сохраняются уже на протяжении двух лет, некоторые стали менее ярко выраженными.

Постоянная особенность каллуса авокадо заключается в том, что он состоит из 2 морфологически разных частей (рисунок 1, Б). Верхняя часть светлая, практически белая, особенно в начале пассажа. К концу пассажа частично становится светло-кремовой. Нижняя часть ткани, контактирующая с питательной средой, коричневая. Что касается упомянутой утраченной характеристики каллуса – это отчетливо розовая окраска верхней части (рисунок 2).

Данное свойство каллусной ткани сохранялось на протяжении нескольких первых пассажей. Проведённый анализ клеток каллуса позволил выявить следующее. Многие клетки как светлой части, так и темной, содержали включения, окрашенные в пурпурные и розовые цвета (рисунок 3). Данная окраска включений, вероятно, обусловлена присутствием пока не идентифицированных окрашенных метаболитов.

Таблица 1. – Опытные варианты сред с варьированием концентрации ИУК

1 (контроль)	1 мг/л 2,4 Д; 1 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП
2	1 мг/л 2,4 Д; 1,5 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП
3	1 мг/л 2,4 Д; 2 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП
4	1 мг/л 2,4 Д; 2,5 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП
5	1 мг/л 2,4 Д; 3 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП
6	1 мг/л 2,4 Д; 3,5 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП

Таблица 2. – Опытные варианты сред с варьированием концентрации 2,4-Д

А (контроль)	1 мг/л 2,4 Д; 1 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП
Б	1,5 мг/л 2,4 Д; 1 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП
В	2 мг/л 2,4 Д; 1 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП
Г	2,5 мг/л 2,4 Д; 1 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП
Д	3 мг/л 2,4 Д; 1 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП
Е	3,5 мг/л 2,4 Д; 1 мг/л ИУК; 3 мг/л 6-БАП

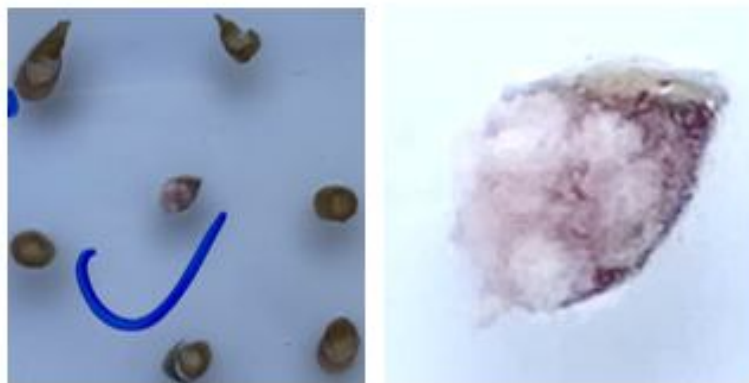


Рисунок 2. – Внешний вид эксплантов с формирующейся каллусной тканью розового цвета

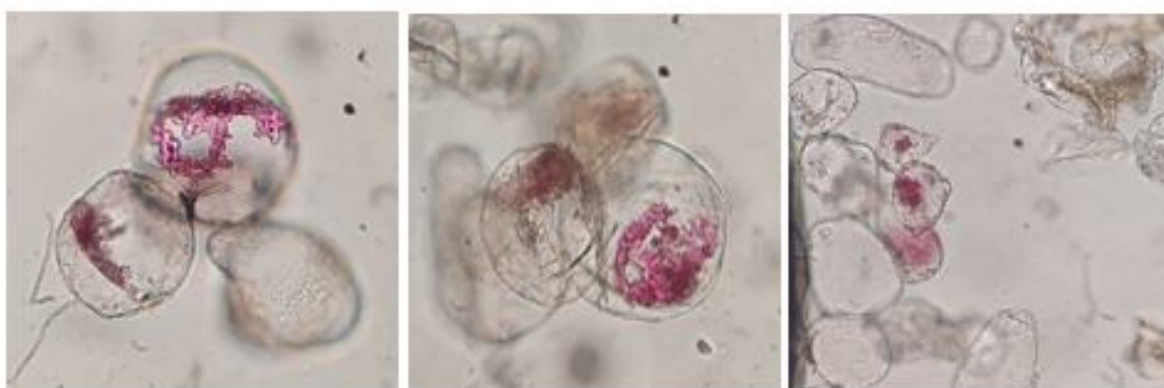


Рисунок 3. – Изображения клеток листового каллуса авокадо

Оценка морфологических особенностей ткани в условиях варьирования концентрации 2,4-Д в среде показала отсутствие различий структуры ткани в опытных вариантах и в контроле. Во всех случаях каллусная ткань была представлена двумя различающимися морфологически частями (светлая верхняя и тёмная нижняя части).

Изучение воздействия ауксинового состава среды показало, что при варьировании содержания ИУК в среде в диапазоне 1,5-3,5 мг/л показатели роста были ниже, чем в контрольном варианте, включающем 1,0 мг/л ИУК. Тогда как при варьировании содержания другого присутствующего в среде ауксина – 2,4-Д, было установлено, что наблюдалось снижение ростовой активности культуры в 2 раза для экспериментальных вариантов среды, содержащих 2,4-Д в концентрации 1,5, 2,0, 3,0 и 3,5 мг/л по сравнению с контролем (1,0 мг/л 2,4-Д). На среде, дополненной 2,5 мг/л 2,4-Д прирост биомассы каллуса практически соответствовал контрольному варианту.

Таким образом, показано, что при варьировании содержанием ауксинов в среде в приведенных выше концентрациях цитоморфологические параметры каллуса (морфология каллуса и типы клеток) не претерпевали видимых изменений и соответствовали контрольному варианту. Для поддержания роста каллуса авокадо целесообразно использовать варианты сред, дополненные ауксинами в следующих концентрациях: 1 мг/л ИУК, 1 мг/л или 2,5 мг/л 2,4-Д.

Список использованных источников

1. Gomes, G. L. B. Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms / G. L. B. Gomes, K. C. Scortecci // Plant Biol (Stuttg). – 2021. – Vol. 23, iss. 6. – P. 894-904. Doi: 10.1111/plb.13303.

2. Логвина, А.О. Введение авокадо (*Persea americana*) в культуру *in vitro* / А.О. Логвина, А.Е. Савич // Разработка и перспективы применения инновационных технологий в контексте мирового и регионального развития. – Санкт-Петербург: ЕНМЦ «Мультидисциплинарные исследования», 2020. – С. 20–26.

3. Логвина, А.О. Содержание фенольных соединений, антирадикальная и общая антиоксидантная активности экстрактов нативных растений и каллусных культур авокадо / А.О. Логвина, А.Е. Савич // MODERN SCIENCE AND TECHNOLOGY. – Петрозаводск: Международный центр научного партнерства «Новая Наука», 2021. – Т. IV. – С. 73–80.