

УДК 581.17:633.81

**ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА  
В КУЛЬТУРЕ ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ АНИСА  
(*PIMPINELLA ANISUM L.*)**

© 2009 г. Н. А. Егорова, И. В. Ставцева

*Институт эфиромасличных и лекарственных растений*

*Украинской академии аграрных наук*

*(Симферополь, Украина)*

Изучено влияние состава питательной среды, типа экспланта и пассажа на индукцию морфогенеза в культуре изолированных тканей и органов аниса (*Pimpinella anisum L.*). Показана возможность индукции прямого морфогенеза непосредственно из тканей экспланта, а также непрямого морфогенеза в каллусной культуре. Подобраны гормональные составы питательных сред, обеспечивающие индукцию побегов из стеблевых сегментов и каллуса, культивируемого в течение 4-х пассажей. Установлена вариабельность растений аниса в пределах сорта по частоте морфогенеза в каллусной культуре.

**Ключевые слова:** *Pimpinella anisum L.*, каллус, морфогенез, растения-регенеранты

В селекционных программах многих сельскохозяйственных культур в последние годы активно используются биотехнологические методы, которые позволяют значительно повысить эффективность селекционного процесса и создавать новые генотипы на основе клеточной инженерии (Бутенко, 1999; Мельничук та ін., 2003). Одним из относительно простых и доступных методов является создание новых генотипов на основе соматической вариабельности клеток каллусных тканей.

Получение новых форм растений в культуре тканей предполагает подбор и оптимизацию условий для индукции каллусо- и морфогенеза, получения растений-регенерантов и их адаптацию *in vivo* (Бутенко, 1999). Эти условия обычно строго индивидуальны и в значительной степени лимитируются генотипом. Особую сложность, как правило, представляет регенерация растений из изолированных соматических клеток, причем особенности морфогенетических реакций определяют возможности использования изолированных культур в различных клеточных технологиях. Поэтому изу-

чение процессов индукции морфогенеза является наиболее важным этапом многих биотехнологических исследований.

Анис (*Pimpinella anisum L.*) – однолетнее травянистое растение семейства сельдерейных (*Apiaceae*). Плоды аниса, обладающие пряным запахом и сладковатым вкусом, применяются в пищевой промышленности (Николаев и др., 1998). Кроме того, анис является хорошим медоносом. В плодах этого пряноароматического растения содержится до 5 % эфирного масла, которое используется в составе медицинских препаратов при бронхитах, трахеитах как противокашлевое и бактерицидное средство. Основным компонентом эфирного масла является анетол (80-90%), являющийся сырьем для синтеза анисового альдегида обенина, используемого в парфюмерии.

В литературе имеются весьма немногочисленные данные, касающиеся изучения аниса в изолированной культуре *in vitro* (Бугара, 1991; Ernst, 1989; Theimer et al., 1986). В частности, при исследовании суспензионной культуры аниса были проанализированы методические подходы, способствующие повышению содержания компонентов эфирного масла, а также продемонстрирована возможность индукции соматического эмбриогенеза и регенерации растений (Ernst, 1989). В то же время в иссле-

---

*Адрес для корреспонденции:* Егорова Наталья Алексеевна, Институт эфиромасличных и лекарственных растений УААН, ул. Киевская, 150, Симферополь, 95493, Автономная республика Крым, Украина;  
e-mail: yegorova.na@mail.ru

## ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА

дованиях, посвященных анализу морфологических особенностей каллусных культур, показано, что в культуре каллусных тканей аниса реализация морфогенного потенциала происходила через органогенез (Бугара, 1991).

В задачи наших исследований входило изучение влияния гормонального состава питательной среды, длительности пассирования каллуса, генотипа донорного растения на индукцию морфогенеза и образование растений-регенерантов в культуре изолированных органов и каллусных тканей у аниса.

### МЕТОДИКА

Материалом для исследований служил основной возделываемый в Украине сорт аниса (*Pimpinella anisum* L.) Парус. В качестве эксплантов использовали сегменты стеблей и черешков листьев растений, выращенных в условиях закрытого грунта и семядоли 5-7-дневных проростков. При введении в культуру, приготовлении питательных сред, пассировании применяли традиционные для работ по культуре тканей методики (Калинин и др., 1980). Экспланты стерилизовали в течение 20 мин в 0,1% растворе диацида с последующей трехкратной промывкой в стерильной дистиллированной воде. Пассирование каллусных тканей проводили каждые 40-45 сут. Масса трансплантов составляла 60-70 мг. Изолированные органы и каллусные ткани культивировали на различных модификациях питательной среды Мурасиге и Скуга (МС), дополненной фитогормонами (2,4-Д, НУК, ИУК, ИМК, кинетин, БАП). Культивирование каллусных тканей осуществляли при 26°C, 70 % влажности и 16-часовом фотопериоде с ос-

вещенностью 2-3 тыс. люкс в культуральной комнате. Частоту морфогенеза оценивали в процентах по отношению количества эксплантов или трансплантов с морфогенными структурами к общему числу анализируемых. Полученные в культуре тканей проростки переносили на среды для укоренения, затем растения-регенеранты пересаживали в торфо-перлитную смесь и проводили их адаптацию в условиях *in vivo* при повышенной влажности.

Опыты проведены в трехкратной повторности; полученные данные обработаны статистически с использованием компьютерной программы Microsoft Excel 2003. На рисунках представлены средние арифметические и доверительные интервалы при уровне значимости 0,05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были определены условия для индукции и длительного пассирования каллусных тканей аниса и дана их цитофизиологическая характеристика. Подобрана питательная среда, содержащая в качестве гормональных добавок 2,4-Д и БАП, которая обеспечивала интенсивный прирост каллуса при его длительном субкультивировании (Егорова, Ставцева, 2008). Особый интерес при разработке клеточных технологий представляет изучение морфогенетических потенциалов изолированных тканей и оптимизация условий получения растений-регенерантов. В ходе экспериментальных исследований установлено, что у аниса при создании определенных условий можно индуцировать морфогенез в культуре пассируемых каллусных тканей, а также непосредственно из тканей экспланта. На рис. 1 продемонстрирова-

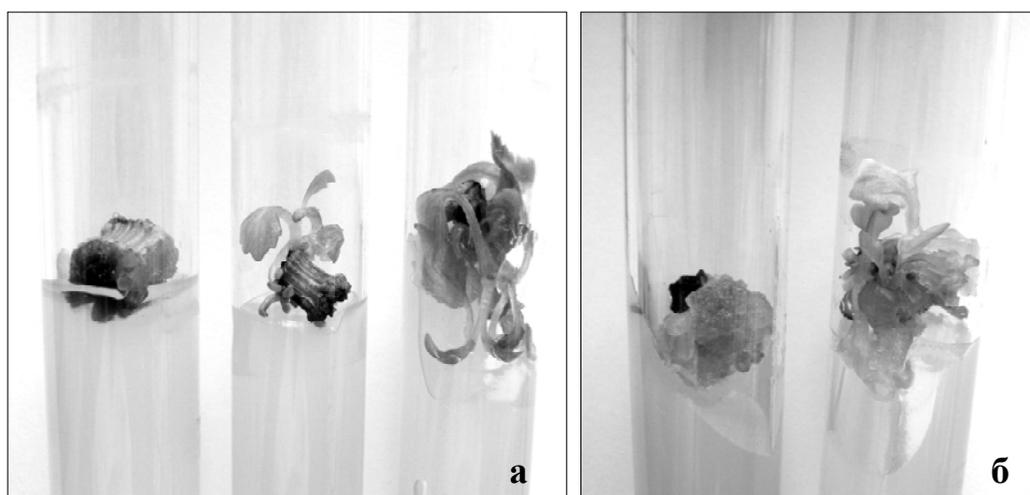
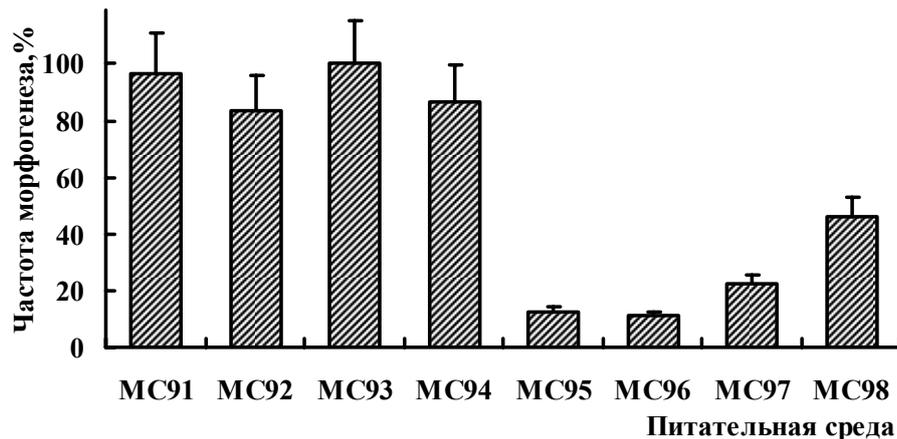


Рис. 1. Индукция прямого морфогенеза из тканей экспланта стебля (а) и морфогенеза из каллусной ткани стеблевого происхождения у аниса сорта Парус (б).



**Рис. 2.** Влияние состава питательной среды на частоту индукции прямого морфогенеза из стеблевых эксплантов у аниса сорта Парус. Гормональные добавки (мг/л) в питательной среде: MC91 – без гормонов; MC92 – БАП (0,1); MC93 – БАП (0,5); MC94 – БАП (1,0); MC95 – 2,4-Д (0,5); MC96 – БАП (0,1)+2,4-Д (0,5); MC97 – БАП (0,5)+2,4-Д (0,5); MC98 – БАП (1,0)+2,4-Д (0,5).

на индукция прямого и непрямого морфогенеза в культуре изолированных тканей аниса.

При введении в культуру сегментов стеблей, черешков листьев и семядолей у аниса сорта Парус на многих средах начиналось формирование каллусной ткани. Однако в ряде случаев, наряду с началом каллусогенеза, непосредственно на поверхности эксплантов происходило заложение почек и развитие побегов. Чаще всего адвентивное побегообразование отмечалось при использовании стеблевых фрагментов, у которых наблюдалось формирование до 10-15 почек и побегов на один эксплант (рис. 1а). Индукция прямого органогенеза в значительной степени зависела от состава питательной среды. На рис. 2 представлены данные о влиянии гормонального состава среды МС на частоту индукции морфогенеза. Как видно из полученных данных, на средах, содержащих только 2,4-Д или ауксин в сочетании с БАП, частота регенерации была невысокой 11,1 – 22,2% (среды МС 95 - МС 97). При увеличении концентрации цитокинина (среда МС 98) частота морфогенеза повысилась до 45,8%. На этих средах отмечалось также интенсивное развитие каллусной ткани с частотой до 90 – 100%. На безгормональной среде (МС91) или средах с одним цитокинином БАП (МС 92-МС 94) происходила активная индукция прямого морфогенеза с частотой 83-100%. Достоверных различий по частоте адвентивного побегообразования на этих средах не было отмечено. Каллусная ткань на безгормональной среде или при введении БАП практически не формировалась. Следовательно, у аниса индукция прямого морфогенеза из стеблевых эксплантов может

происходить без введения в среду гормонов, что может быть обусловлено достаточным уровнем эндогенных гормонов в тканях самого растения.

Проведенные исследования показали, что у разных типов эксплантов имелись свои особенности индукции прямого морфогенеза. Так, при культивировании стеблевых сегментов, как уже указывалось, наблюдалось побегообразование по всей поверхности экспланта. При использовании в качестве эксплантов семядолей, помимо формирования адвентивных побегов, иногда происходило образование корней непосредственно из экспланта. Культивирование сегментов черешков листа чаще всего приводило к образованию витрифицированных тератологических листьев.

При культивировании каллусных тканей аниса на среде для каллусогенеза с 2,4-Д и БАП в течение нескольких пассажей не было отмечено признаков морфогенеза. Из сегментов стебля обычно развивался обильный плотный каллус бежевого и зеленого цвета с ростовым индексом до 40-43. При переносе такого каллуса на среды разного гормонального состава на некоторых из них происходила индукция морфогенеза, в каллусной ткани появлялись почки, из которых развивались побеги (рис. 1б). Непрямой морфогенез в значительной степени зависел от состава среды и длительности культивирования каллуса (рис. 3). Как видно из представленных данных, на безгормональной среде и среде с одним цитокинином БАП в первом пассаже индукция органогенеза происходила с небольшой частотой 17,4 – 25,9%. Наибольшей

### ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА

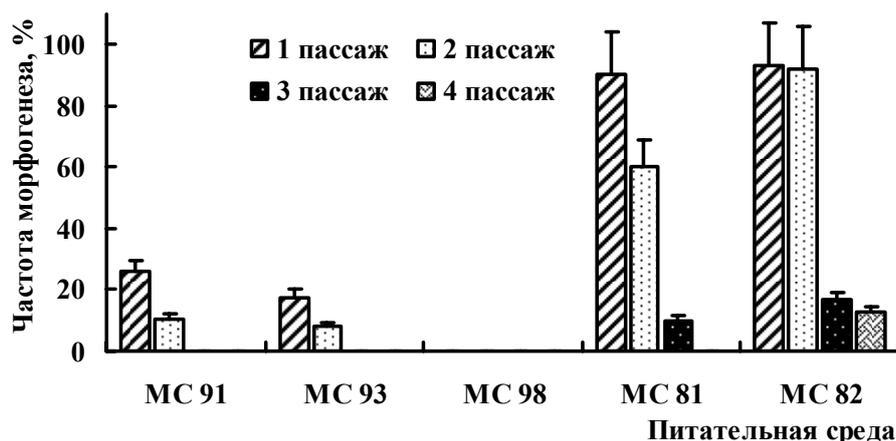


Рис. 3. Влияние состава питательной среды и пассажа на частоту индукции морфогенеза в культуре каллусной ткани у аниса сорта Парус. Гормональные добавки (мг/л) в питательной среде: MC81– БАП (0,5)+НУК (0,5); MC82– БАП (0,5)+НУК (1,0); остальные среды – см. рис. 2.

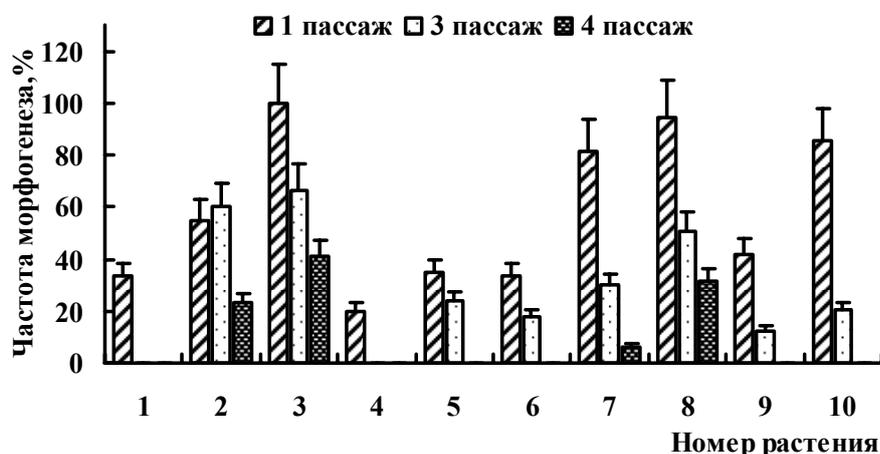
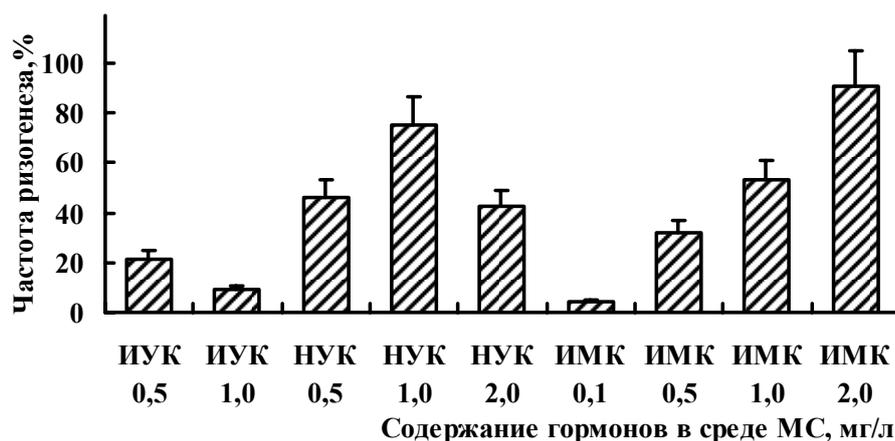


Рис. 4. Влияние генотипа донорного растения аниса сорта Парус на частоту морфогенеза при длительном пассировании каллусной ткани.

эффективностью отличались среды с введением БАП и НУК (MC81, MC82). На средах с добавлением 0,5 – 1,0 мг/л этих фитогормонов частота морфогенеза достигала 90,4 -93,3%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что способность к морфогенезу в каллусной культуре аниса снижалась по мере увеличения длительности субкультивирования. Во втором пассаже частота появления трансплантов с морфогенезом только на питательной среде MC82 достоверно не отличалась от первого пассажа, а на остальных средах резко уменьшалась (рис. 3). В четвертом пассаже морфогенез с небольшой частотой (12,8%) наблюдался только на оптимальной среде MC82. При последующем субкультивировании ни на одной питательной среде не наблюдалось образования почек.

Проведено изучение влияния генотипических особенностей донорного растения на способность к морфогенезу в каллусной культуре. Для этого получали каллусные ткани из стеблевых эксплантов разных исходных растений аниса в пределах одного сорта Парус, а затем эти ткани переносили на среду для морфогенеза MC82. Установлено, что способность к непрямому морфогенезу и длительность сохранения морфогенетических потенций в значительной степени зависели от индивидуального растения (рис. 4). Для растений №№ 2, 3, 7, 8 была характерна максимальная частота побегообразования в каллусных тканях (до 94-100%), при этом морфогенез наблюдался вплоть до 4-го пассажа. Каллусные культуры, полученные из других растений, отличались более низкой регенерационной способностью, которая терялась после третьего пассажа. Следует отметить,



**Рис. 5.** Влияние гормонального состава питательной среды на частоту ризогенеза *in vitro* у растений-регенерантов аниса сорта Парус.

что подобная генетическая гетерогенность была ранее отмечена в наших исследованиях у другого перекрестноопыляемого эфиромасличного растения фенхеля, у которого растения в пределах сорта значительно различались по способности к каллусогенезу и морфогенезу (Ставцева, Егоровна, 2005). Значительная внутрисортная изменчивость каллусных тканей по способности к индукции морфогенеза также отмечалась у клевера (Bhojwani et al., 1984). Такая внутрисортная изменчивость регенерационной способности по-видимому обусловлена генетической детерминированностью процессов морфогенеза и ее можно использовать для отбора генотипов аниса с высокими морфогенетическими потенциями.

При формировании побегов и затем растений аниса из каллусных тканей, также как и при прямом морфогенезе, не было отмечено образования корней. Поэтому для получения полноценных растений-регенерантов, пригодных для перевода в почвенную смесь, их необходимо было переносить на среды для ризогенеза. Для стимуляции корнеобразования в питательную среду МС вводили различные ауксины (ИУК, НУК, ИМК). На рис. 5 представлены данные о влиянии различных концентраций фитогормонов на укоренение побегов аниса сорта Парус, полученных из стеблевых эксплантов. При добавлении в питательную среду 0,5-1,0 мг/л ИУК частота ризогенеза была минимальной (9,3-21,4%). Большую эффективность проявили ауксины НУК и ИМК. Однако при введении в питательную среду НУК частота корнеобразования была ниже по сравнению с ИМК, кроме того, у основания побегов иногда начиналось образование небольшого плотного каллуса. Увеличение содержания ИМК с 0,1 до

2,0 мг/л способствовало резкому повышению частоты ризогенеза (рис. 5). На оптимальной питательной среде с введением 2,0 мг/л ИМК частота укоренения составила 96,9%, при этом формировалось 3-4 небольших корня. Укорененные растения переносили в смесь торфа и перлита (1:1) для дальнейшей адаптации в условиях *in vivo*.

Таким образом, в результате проведенных исследований были определены условия для индукции морфогенеза из тканей и органов аниса. Показана возможность адвентивного побегообразования непосредственно из эксплантов стебля, семядолей и листа, а также из пасируемой каллусной ткани. Максимальная частота индукции прямого морфогенеза была достигнута на безгормональной питательной среде. Для стимуляции непрямого морфогенеза в каллусных культурах необходима среда с добавлением БАП и НУК, хотя на безгормональной среде также была возможна индукция побегов с низкой частотой. В работе Эрнста отмечалось, что развитие соматических эмбриоидов в суспензионной культуре аниса происходило в отсутствие экзогенных растительных гормонов (Ernst, 1989). Известно, что условия для стимуляции прямого и непрямого морфогенеза в значительной степени зависят от видовых особенностей. Например, у клематиса (Митрофанова, 2007) и мягкой пшеницы (Бавол и др., 2008) питательные среды для разных типов морфогенеза были различны, тогда как у каладиума не прямой соматический эмбриогенез и прямая регенерация побегов проходили на одной питательной среде (Митрофанова, 2007).

Выявленное разнообразие морфогенетических процессов в культуре изолированных

## ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА

тканей и органов аниса позволяет использовать их в разных клеточных технологиях и для различных целей. Индукция прямого морфогенеза из тканей экспланта ныне выявлена у многих видов растений, в частности, у цветочно-декоративных, субтропических плодовых культур, злаков (Бавол и др., 2008; Мельничук та ін., 2003; Митрофанова, 2007; Струнин и др., 2008). В ряде случаев наряду с прямым органо-генезом или соматическим эмбриогенезом может наблюдаться и формирование неморфогенного или морфогенного каллуса (Митрофанова, 2007; Струнин и др., 2008). Чаще всего прямая регенерация адвентивных побегов и растений применяется для ускоренного размножения ценных генотипов. Непрямой морфогенез из каллусных культур, благодаря явлению соматоклональной изменчивости, может быть использован для получения новых генетически разнообразных форм в селекции (Бутенко, 1999). В этой связи очень важно подобрать условия для длительной регенерации растений, поскольку известно, что по мере культивирования каллусных тканей возрастает их генетическая гетерогенность (Мельничук та ін., 2003). В более раннем исследовании отмечалось, что для каллусных культур аниса характерна быстрая потеря морфогенных потенций уже во втором пассаже (Бугара, 1991). В наших исследованиях были подобраны условия, способствующие достаточно длительному сохранению способности к индукции непрямого морфогенеза в каллусных культурах в течении 4-х пассажей. Такая длительная регенерация в каллусных тканях может позволить получать соматоклональные варианты. Однако для определения возможностей использования изолированных культур аниса необходимо дальнейшее проведение анализа полученных растений-регенерантов с целью выявления их генетической гетерогенности.

## ЛИТЕРАТУРА

- Бавол А.В., Дубровна О.В., Лялько І.І. Регенерация растений из разных типов эксплантатов мягкой пшеницы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т. 40, № 2. – С.150-156.
- Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- Бугара А.М. Клеточная дифференциация и экспериментальный морфогенез у эфиромасличных растений: Автореф. дис... докт. биол. наук. – Кишинев, 1991. – 43 с.
- Егорова Н.А., Ставцева И.В. Получение и цитофизиологическая характеристика каллусной культуры аниса // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2008. – Вип. 1 (13). – С. 65-70.
- Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наук. думка. 1980. – 488 с.
- Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин. – К.: Поліграф Консалтинг, 2003. – 520 с.
- Митрофанова И.В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Ялта, 2007. – 40 с.
- Николаев Е.В., Назаренко Л.Г., Мельничков М.М. Крымское полеводство: Справочное пособие. – Симферополь: Таврида, 1998. – 384 с.
- Ставцева И.В., Егорова Н.А. Влияние генотипических особенностей на процессы каллусогенеза и регенерацию растений in vitro у фенхеля // Эко-системы Крыма, их оптимизация и охрана. Тематич. сб. науч. тр. – Симферополь: Таврия, 2005. – Вып. 15. – С. 50-56.
- Струнин Д.Е., Сергеева Л.Е., Тищенко Е.Н. Регенерация растений путем прямого органо-генеза из сегментов проростков элитных инбредных линий кукурузы // Физиология и биохимия культ. растений. – 2008. – Т. 40, № 2. – С. 164-170.
- Bhojwani S., Mullins K., Cohen D. Intra- varietal variation for in vitro plant regeneration in the genus Trifolium // Euphytica. – 1984. – V. 33, № 3. – P. 915-921.
- Ernst D. Pimpinella anisum L. (Anise): cell culture, somatic embryogenesis and production of anise oil // Med. and Aromat. Plants. 2. – Berlin, 1989. – P. 381-397.
- Theimer R.R., Kudielka R.A., Rosch I. Induction of somatic embryogenesis in anise in microgravity // Naturwissenschaften. – 1986. – V. 73, № 7. – P. 442-443.

Поступила в редакцию  
05.02.2009 г.

**ЕГОРОВА, СТАВЦЕВА**

**THE MORPHOGENESIS PECULIARITIES  
IN TISSUE AND ORGAN CULTURE OF ANISE  
(*PIMPINELLA ANISUM* L.)**

N. A. Egorova, I. V. Stavtzeva

*Institute of Essential Oil and Medicinal Plants  
Ukrainian Academy of Agrarian Sciences  
(Simferopol, Ukraine)*

The influence of nutrient media composition, explant type and passage on morphogenesis induction in isolated tissue and organ culture of anise (*Pimpinella anisum* L.) were investigated. The possibility of direct morphogenesis induction from explant and also indirect morphogenesis in callus tissue have been shown. The hormonal compositions of nutrient media for shoot induction from stem segments and from callus tissue cultured during 4 passages have been established. The variability of anise plants within the variety by morphogenesis frequency in callus culture was determined.

**Key words:** *Pimpinella anisum* L., callus, morphogenesis, plant-regenerants

**ОСОБЛИВОСТІ МОРФОГЕНЕЗУ  
В КУЛЬТУРІ ТКАНИН І ОРГАНІВ АНІСУ  
(*PIMPINELLA ANISUM* L.)**

Н. О. Єгорова, І. В. Ставцева

*Інститут ефіроолійних та лікарських рослин  
Української академії аграрних наук  
(Сімферополь, Україна)*

Вивчено вплив складу живильного середовища, типу експланта і пасажу на індукцію морфогенезу в культурі ізольованих тканин і органів анісу (*Pimpinella anisum* L.). Показана можливість індукції прямого морфогенезу безпосередньо з тканин експланта, а також непрямого морфогенезу в калусній культурі. Підібрані гормональні склади живильних середовищ, що забезпечують індукцію пагонів із стеблових сегментів і калуса, культивованого протягом 4-х пасажів. Встановлена варіабельність рослин анісу в межах сорту за частотою морфогенезу в калусній культурі.

**Ключові слова:** *Pimpinella anisum* L., калус, морфогенез, рослини-регенеранти