

Торутанов Павел Сергеевич

лаборант-исследователь

Научно-исследовательский центр фундаментальных
и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный
педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

DOI 10.31483/r-112052

**ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ЛИМОНА СОРТА ПАНДЕРОЗА
(CITRUS LIMON PONDEROSA) ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ
НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ С РАЗЛИЧНОЙ
КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ФИТОГОРМОНОВ**

Аннотация: в статье рассмотрено применение метода микроклонального размножения растений в целях ускоренного размножения лимона сорта Пандероза (*Citrus Limon Ponderosa*) в лабораторных условиях.

Ключевые слова: лимон Пандероза, микроклонирование, *in vitro*, фитогормоны, биотехнологические методы, каллус, среда Мурасиге-Скуга.

Цитрусовые – группа широко распространенных плодовых культур вечнозеленых деревьев, характеризующаяся высокой сельскохозяйственной, экономической и медицинской значимостью, также используются в декоративных целях, т.к. при благоприятных условиях многие представители способны цвести круглый год. Представители цитрусовых содержат большое количество эфирных масел, витаминов (А, В, С, Р) и органических кислот (лимонная, яблочная, щавелевая и т. д.), в плодах также содержатся флавоноиды (гесперидин, цитрин, кверцетин, рутин и т. д.), дубильные вещества, сахара (фруктоза, глюкоза, сахароза) [6], которые используют в различных отраслях промышленности. Центром происхождения цитрусовых считается Восточная и Юго-Восточная Азия.

Более ста различных сортов цитрусовых возделывают в 70 странах мира (США, Мексика, Куба, Италия, Испания, Греция, Португалия, Индия, Турция,

Китай, Египет и др.). В нашей стране лимонводство не развито. Размножение в открытом грунте возможно лишь в субтропиках Краснодарского края, несмотря на то что данная территория носится к зоне рискованного цитрусоводства из-за периодически холодных зим [4; 5]. В России для обеспечения продовольственной и медицинской отраслей достаточным количеством растительного сырья цитрусовых используется метод микроклонального размножения, через каллусную культуру [7; 8]. Микроклональное размножение хороший мало затратный метод для создания и поддержания резервной коллекции каллусов на малых площадях для дальнейшего использования в селекционных и практических целях [3], весь цикл работ возможно проводить в течение всего года [1; 13].

Citrus Limon Ponderosa – гибридный сорт лимона естественного происхождения, был получен в результате скрещивания лимона, цитрона и грейпфрута. Позднее этот сорт стал родоначальником новых сортов: Скерневицкий, Юбилейный. Представляет собой листопадное деревце 1–1,5 м с раскидистой кроной, с колючками на стволе. Плод может достигать крупных размеров, весом до 2 кг. Плодоношение и цветение происходит в течении всего года. Плоды *Citrus Limon Ponderosa* содержат большое количество клетчатки, антиоксидантов, кальция, железа и витаминов. Многие из витаминов обладают противовоспалительными свойствами и используются при болезни Крона, диабете и сердечных заболеваниях [6]. Разведение *Citrus Limon Ponderosa* сопряжено с рисками, поскольку растение очень уязвимо к вредителям (тля, клещи, белокрылки, щитовки и мучнистые червецы и др.).

Целью исследования является разработка и оптимизация протокола микроклонального размножения *Citrus Limon Ponderosa*.

Материалы и методы. Процесс микроклонального размножения проводился в 4 этапа:

- 1) выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры.
- 2) собственно размножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов.

3) укоренение полученных побегов.

В качестве растительного экспланта были использовали стеблевые сегменты длиной 1–2 см, содержащие по крайней мере один узел из этих частей побега, а также листовые экспланты размером 1,5x1,5 см. В работе использовалась универсальная питательная среда Мурасиге-Скуга («Биолот», Россия), содержащая большее количество неорганического азота (важнейшего питательного элемента для растений) что увеличивает коэффициент размножения на 30% [14; 15].

Базовая среда культивирования содержала 20% сахарозы, 7% агара, фитогормоны: 6-БАП, ИУК и раствор витаминов («Биолот», Россия). Также моделировали три вида среды культивирования с разной концентрацией гормонов: в первой среде – 0 мг/л (безгормональная), во второй – 1 мг/л, в третьей – 2 мг/л, в четвертой – 3 мг/л [11].

Для проведения стерилизации экспланты обрабатывали в течение нескольких минут сначала мыльным раствором, далее 70% этиловым спиртом, затем гипохлоридом натрия. Подготовленные экспланты высаживали на твердую агаризованную среду Мурасиге-Скуга в стерильных условиях ламинар-бокса («Esco», Сингапур). Культивирование проводили в условиях климатической камере при температуре +25°C, фотопериод – 16 часов света + 8 часов темноты. Культивирование продолжалось 6 недель (42 дня) [12; 16].

Приготовление и окраску гистологических препаратов проводили по стандартной методике [9].

Результаты исследования и их обсуждение. Стеблевые экспланты *Citrus Limon Ponderosa* на всех питательных средах на 6-е сутки культивирования дали проростки зачаточных листьев в узловых сегментах стеблей (рис. 1А). Первые очаги каллусообразования отмечены на третьей неделе культивирования на питательных средах, содержащих фитогормоны, но количество очагов отличалось в зависимости от среды культивирования. Так в среде с концентрацией 1 мг/л и 3 мг/л образовалось по одному очагу каллусообразования, в среде с концентрацией гормонов 2 мг/л – три очага каллусообразования. На безгормональной среде образование каллуса не наблюдалось. Формирование каллусной ткани на листовых

эксплантах не обнаружено ни в условиях культивирования в присутствии гормонов, ни на безгормональной среде. Таким образом, концентрация 6-БАП и ИУК 2 мг/л является оптимальной для культивирования *Citrus Limon Ponderosa*.



Рис. 1. *Citrus Limon Ponderosa*. А – первые проростки листьев на узловых сегментах (6-е сутки культивирования); Б – первые крупные листья на пересаженных участках стебля; В – формирование каллуса на узловых сегментах стеблей (4-я неделя культивирования)

Каллус *Citrus Limon Ponderosa* желтоватого цвета, плотной структуры, без признаков морфогенеза (рис. 2А).

В результате проведенного морфологического анализа (рис. 3) в составе клеточной популяции каллуса было выделено несколько разновидностей форм клеток: округлые (рис. 2 А, В), вытянутые или червеобразные (рис.2 Б), гигантские или неправильной формы (рис. 2 В) клетки.

По истечении 28 суток культивирования каллус отделяли от материнского растения и пассировали (пересаживают) на новую питательную среду, предварительно разделив на несколько фрагментов (рис. 4). Первые признаки морфогенеза появлялись на 5-й неделе культивирования.

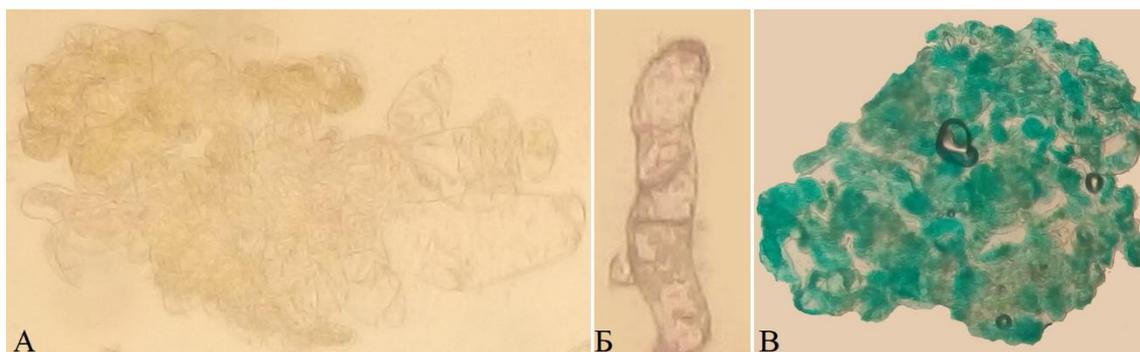


Рис. 2. Клетки каллуса *Citrus Limon Ponderosa*. А – без окраски, Б – окрашивание гематоксилином, В – окрашивание бриллиантовым зеленым



Рис. 3. *Citrus Limon Ponderosa* соотношение клеток разных форм каллуса на 4ю неделю культивирования

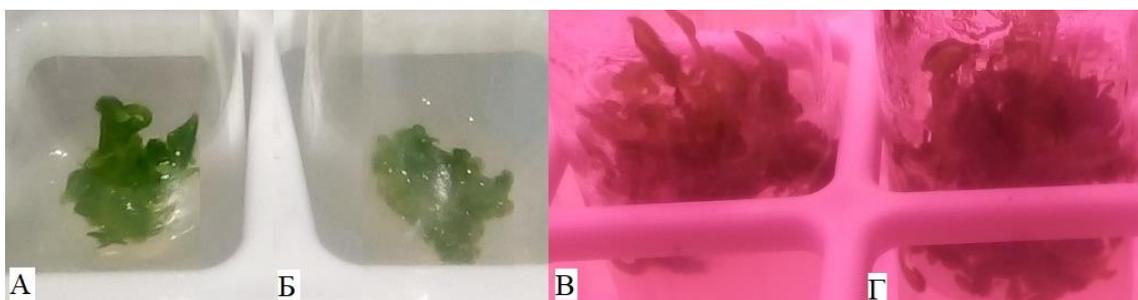


Рис. 4. А, Б – На каллусе *Citrus Limon Ponderosa* центры меристематической активности с зачатками органов. В, Г – первые признаки морфогенеза на 5-й неделе культивирования

Таким образом, проведенное исследование демонстрирует возможность эффективно выращивать и размножать *Citrus Limon Ponderosa* методом микроклонального размножения. Разработка и оптимизация протокола микроклонального размножения *in vitro* лимона сорта Пандероза *Citrus Limon Ponderosa* показали, что дедифференцировка тканей и каллусообразование более эффективно проходит при добавлении в питательную среду культивирования концентрации фитогормонов ауксинов и цитокининов – в 2 мг/л 6-БАП, ИУК.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-Пресс, 1999. – 160 с.

2. Васильченко Е.Н. Технология создания реституционных линий сахарной свёклы / Е.Н. Васильченко // Вестник ВГАУ. – 2018. – Вып. 1 (56). – С. 42–51.

3. Перес Т.О. Эффективный протокол микроразмножения лимона (*Citrus limon*) из зрелых узловых сегментов, Tiss растительных клеток / Т.О. Перес, С.И. Таллон, И.И. Поррас // Культура растительных клеток, тканей и органов. – 2010. – Т. 100. – С 271.

4. Самарина Л.С. Биотехнология цитрусовых культур: достижения и перспективы (обзор) / Л.С. Самарина, Т.М. Коломиец, В.М. Горшков // Садоводство и виноградарство. – 2011. – №6. – С. 27–30. EDN OKFSOX

5. Самарина Л.С. Разработка приемов культивирования цитрусовых *in vitro* / Л.С. Самарина, Т.М. Коломиец, Н.С. Налбантова // Сб. труд ГНУ ВНИИЦиСК Россельхозакадемии. – 2012. – Вып. 46. – С. 175–179.

6. Самарина Л.С. Оптимизация приемов микроразмножения и сохранения лимона *in vitro*: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Л.С. Самарина. – М., 2013. – 23 с. – EDN ZOVAJF

7. Самарина Л.С. Оценка регенерационной способности эксплантов цитрусовых *in vitro* / Л.С. Самарина, Т.М. Коломиец, В.М. Горшков // Садоводство и виноградарство. – 2016. – №6. – С. 27–30.

8. Тимофеева О.А. Клональное микроразмножение растений / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.

9. Торутанов П.С. Оптимизация протокола изготовления, постоянных гистологических препаратов растений в качестве демонстрационного материала для образовательных учреждений / П.С. Торутанов, Е.И. Антонова. – Ульяновск, 2023. – С. 145–161. – EDN WINLJI

10. Питомник павловских лимонов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://pavvolimon.ru> (дата обращения: 27.05.2024).

11. Ali S., Bushra M. Micropropagation of rough lemon jambhiri Lush: influence of explant type and hormone concentration // Acta Bot Croat. 2006. 65(2): 137–146.

12. Benabdesselam F.M., Hettal B., Beju F. Micro-propagation of young rootstocks of citrus species of Algeria // Science of Life. 2018. 18. Pp. 707–717.

13. Goswami K., Sharma R., Singh P., Singh G. Micro-propagation of pitted lemon (*Citrus limon* L. cv. Kaghzi Kalan) and assessment of the genetic fidelity of micro-propagating plants using RAPD markers. *Physiol. Mole. Biol. Plants* 19. 2013. P. 137–145.
14. Lloyd G., McCown B. Commercially – feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // *Comb Proc Intl Plant Prop Soc.* 1980. Vol. 30. P. 421–427.
15. Perez-Tornero O., Tallon K.I., Porrás I. An effective protocol for the micro-propagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments // *Culture of plant cells, tissues and organs.* 2009. P. 263–271.
16. Soveta Vijay, Virk G.S., Nagpal A. Influence of explant types and plant growth regulators on callus formation and regeneration of seedlings in citrus fruits jambhiri Lush // *Environment and Us-International Scientific and Technical Journal.* 2010. P. 97–106.