

УДК 630*232.414.4

Д. В. Кулагин, мл. науч. сотрудник (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»);
Е. Н. Химченко, техник 1-й категории (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»)

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ИНДУКЦИЮ КАЛЛУСООБРАЗОВАНИЯ НА ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТАХ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО

Целью данного исследования было определение основных факторов, влияющих на каллусообразование на листовых эксплантах дуба черешчатого. Источником эксплантов были старовозрастные деревья. В ходе определения оптимальной питательной среды каллусообразование было получено на средах MS и GD в присутствии цитокинина 6-БАП в концентрации 1 мг/л. Установлено, что в отсутствии освещения жизнеспособность листовых эксплантов при культивировании на среде MS сохраняется в течение длительного (до 2 месяцев) времени. Культивирование листовых пластинок на среде MS с добавлением 6-БАП в концентрации 2–3 мг/л в комбинации с ауксинами 2,4-Д, НУК и ИМК в концентрации 2–3 мг/л активует процесс каллусообразования. Наиболее интенсивный рост каллуса наблюдался на средах, содержащих ауксин НУК. Данные, полученные в исследовании, будут использоваться при подборе оптимальных условий инициации эмбриогенных культур дуба черешчатого.

The aim of this research was to define the major factors influencing on callus formation on leaf explants of a common oak. A source of explants was mature trees. During definition of an optimum nutrition medium callus formation has been received on MS and GD mediums at presence of cytokinin 6-BAP in concentration of 1 mg/l. In absence of illumination viability of leaf explants on MS medium remains during long (till 2 months) time. Cultivation of lamina on MS medium in addition of 6-BAP in concentration of 2–3 mg/l in a combination with auxins 2,4-D, NAA and IBA in concentration of 2–3 mg/l activate process callus formation. The most intensive growth of callus was observed on the medium containing auxin NAA. The data received in research, will be used at selection of optimum conditions for establishing of embryogenic cultures of a common oak.

Введение. В настоящее время в лесном хозяйстве все шире применяются методы биотехнологии растений, в первую очередь – различные методики размножения *in vitro* [1]. Они могут быть использованы для получения посадочного материала разнообразных древесных видов, в том числе такой ценной породы для Беларуси, как дуб черешчатый [2]. Одним из возможных способов размножения дуба является соматический эмбриогенез [3]. В ходе размножения названным способом на особой, эмбриогенной культуре происходит развитие биполярных структур, сходных по морфологии и физиологии с зиготическими зародышами. Получаемые в ходе соматического эмбриогенеза биполярные структуры способны давать начало полноценным растениям. Источником эмбриогенной культуры могут быть как различные части растения (распускающиеся листья, растущие сегменты побегов), так и зиготические зародыши на различных стадиях развития [4]. Соматический эмбриогенез у дуба черешчатого был получен на всех названных типах эксплантов, однако удобнее использовать зиготические зародыши [3]. Наиболее подходящим для целей селекции является инициация эмбриогенной культуры из вегетативных частей старовозрастных деревьев, так как в данном случае возможно оценить их генетический потенциал. При ис-

пользовании в качестве эксплантов вегетативных частей растений инициация эмбриогенной культуры в большинстве случаев начинается с формирования каллусной ткани на их поверхности [5]. По этой причине определение условий инициации каллусообразования на листовых эксплантах дуба черешчатого является актуальной проблемой в ходе отработки технологии соматического эмбриогенеза.

Основная часть. Исходным материалом дуба черешчатого были терминальные ветви, собранные с деревьев дуба черешчатого на территории Гомельского ГПЛХО в 2009 г. Собранные однолетние побеги сохранялись при комнатной температуре в условиях искусственного освещения для индукции распускания почек. В качестве эксплантов использовались листья размером 1–3 см, полученные из распустившихся почек.

Стерилизация эксплантов включала два этапа: предстерилизацию и непосредственно стерилизацию. Первый этап заключался в обработке листьев поверхностно-активными веществами с последующим их промыванием в проточной водопроводной воде в течение 1–1,5 часов. После этого все манипуляции производились в условиях ламинар-бокса. Непосредственно стерилизация состояла в обработке эксплантов сначала 70%-ным раствором этилового спирта в течение 3 минут, а затем 0,1%-ным раствором диоксида в течение

ние 3 минут. После стерилизации осуществлялось трехкратное отмывание эксплантов стерильной дистиллированной водой. Для предупреждения выделения большого количества окисленных веществ полифенольной природы после отмывания экспланты помещали в раствор аскорбиновой кислоты в концентрации 100 мг/мл и выдерживали в течение 30 минут. После стерилизации с листьев при помощи стерильной фильтровальной бумаги удалялись остатки раствора аскорбиновой кислоты. На каждом экспланте с помощью скальпеля делали несколько насечек на листовых пластинках. Затем экспланты помещали на среду культивирования.

Основу питательных сред составляли смеси неорганических веществ WPM [6], GD [7], MS [8] и BTM [9]. Витамины и микроэлементы добавляли во все варианты сред по прописи Мурасиге и Скуга. В качестве регуляторов роста испытывались БАП, ИМК, НУК. Помимо регуляторов роста в среды для снижения содержания окисленных веществ полифенольной природы вводилась аскорбиновая кислота в концентрации 1 мг/л. Среды для культивирования включали 30 г/л сахарозы, рН до автоклавирования составлял 5,6–5,9 (WPM, MS, BTM) или 5,2–5,3 (GD). В качестве уплотнителя использовался пищевой агар в концентрации 7 г/л. Автоклавирование сред осуществлялось при 121°C в течение 20–40 минут.

Материал культивировался при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$, при постоянном освещении интенсивностью 2000–3000 лк или в темноте.

Наблюдения за состоянием и ростом культур осуществлялось ежедневно. Учет результатов проводился через каждые 7 дней.

Условия культивирования имеют определяющее значение для поддержания жизнедеятельности и роста эксплантов. Немаловажным фактором является минеральный состав сред для культивирования. Существует большое количество стандартных сред, используемых для асептических культур древесных растений. Чаще всего для различных эксплантов дуба применяются составы макроэлементов MS,

WPM, GD, BTM. Нами было изучена реакция эксплантов и их жизнеспособность при их культивировании на названных средах. Данные приведены в табл. 1.

На среде WPM большинство эксплантов сохраняли зеленую окраску в течение двух месяцев. После 8 суток культивирования листовые пластинки стали утолщаться и деформироваться, что свидетельствует об интенсификации процессов роста в паренхиме листьев.

При использовании среды MS и BTM наблюдалось быстрое развитие некроза на листовых пластинках и уже после 15–20 суток культивирования происходило отмирание эксплантов. Однако на среде MS на одном из эксплантов сформировался небольшой рыхлый каллус, локализованный на поверхности листовых пластинки.

На среде культивирования GD большинство эксплантов сохраняли свою жизнеспособность в течение 30–40 суток. На черешке одного из эксплантов сформировался плотный активно пролиферирующий каллус, который субкультивировался в течение 3 месяцев.

Таким образом, жизнеспособность эксплантов во многом зависит от минерального состава сред культивирования. При данных условиях культивирования каллусная ткань была получена только на двух вариантах сред, при этом рыхлый каллус, который является наиболее предпочтительным, сформировался на среде MS. Поэтому данная среда была использована нами в дальнейшем. Длительное сохранение жизнеспособности листовыми эксплантами на средах WPM и GD, по всей видимости, связано с близостью их состава к естественному снабжению листьев элементами питания в целом растении. В большинстве случаев названные среды используются для поддержания нормального роста побегов различных древесных растений, в том числе дуба черешчатого [10]. Физиологические процессы, происходящие в культуре побегов, во многом близки к тем, которые протекают в растении в естественных условиях.

Таблица 1

Определение влияния среды культивирования на листовые экспланты

Питательная среда (культивирование на свету, все среды содержат 1,2 мг/л цитокинина 6-БАП)	Общее количество эксплантов	Количество жизнеспособных эксплантов после 20 сут культивирования	Каллусообразование на эксплантах
MS	20	0	Рыхлый каллус на одном экспланте
BTM	7	0	Не отмечалось
WPM	28	22	Не отмечалось
GD	8	7	Плотный каллус на одном экспланте

Среда MS является достаточно универсальной и по литературным данным часто используется для получения каллусной ткани на различных эксплантах дуба черешчатого. Поэтому мы предположили, что быстрое отмирание листовых пластинок при культивировании на среде MS может быть связано с условиями культивирования, прежде всего с присутствием освещения. Результаты анализа влияния освещения на жизнеспособность листовых эксплантов представлены в табл. 2.

Как следует из данных таблицы, такой фактор, как свет, имеет определяющее значение на сохранение жизнеспособности листовых эксплантов. Полученные результаты можно объяснить тем, что свет регулирует многие процессы жизнедеятельности в организме растения как с помощью специальных рецепторных систем, так и опосредованно через фотосинтетический аппарат. В условиях культивирования при освещении листовые пластинки в большей степени сохраняют свою первоначальную организацию и для поддержания жизнедеятельности требуют относительно бедных сред (WPM, GD). Культивирование в темноте меняет ход нормальных процессов жизнедеятельности эксплантов, и они адаптируются к более богатой по содержанию макроэлементов среде MS. Кроме того, при добавлении в среду культиви-

рования стимуляторов роста цитокининовой (6-БАП) и ауксиновой (ИМК) природы на эксплантах наблюдается интенсивное развитие каллусной ткани.

Наличие аналогов фитогормонов в среде культивирования стимулирует каллусообразование. Однако различные фитогормоны и их сочетания способны оказывать разное действие на экспланты. Результаты определения влияния стимуляторов роста на процесс каллусообразования приведены в табл. 3.

Как следует из данных табл. 3, для появления и роста каллусной ткани необходимо присутствие в среде культивирования регуляторов роста. Наиболее интенсивно процессы каллусообразования протекают в присутствии в среде ауксинов НУК и ИМК, причем каллус располагается вблизи от жилок на поверхности листовой пластинки и на черешке. Ауксин 2,4-Д вызывает главным образом формирование каллуса непосредственно на поверхности жилок листа и черешка. Скорости роста также различные. Наибольшей скоростью роста отличался каллус, полученный на среде, содержащей ауксин НУК. После 50 суток культивирования отдельные агрегаты каллусной ткани достигали размера 1,5 см. После разделения агрегатов каллусной ткани и их субкультивирования рост ткани продолжился.

Таблица 2

Определение влияния освещения на листовые экспланты

Условия культивирования эксплантов	Общее количество эксплантов	Количество жизнеспособных эксплантов через 20 сут культивирования	Каллусообразование на эксплантах
Среда культивирования MS без добавления регуляторов роста, на свету	15	0	Не отмечено
Среда культивирования MS без добавления регуляторов роста, в темноте	29	26	Не отмечено
Среда культивирования MS, содержащая 2 мг/л 6-БАП и 3 мг/л ИМК, в темноте	28	22	Рыхлый каллус на 5 эксплантах

Таблица 3

Определение влияния различных стимуляторов роста на каллусообразование на листовых эксплантах при культивировании в темноте

Условия культивирования эксплантов	Общее количество эксплантов	Каллусообразование на эксплантах	Локализация каллуса
Среда культивирования MS, содержащая 3 мг/л 6-БАП и 3 мг/л ИМК	22	Интенсивный процесс каллусообразования на 12 эксплантах	На поверхности листовой пластинки у основания листа, на черешке
Среда культивирования MS, содержащая 3 мг/л 6-БАП и 2 мг/л НУК	27	Интенсивный процесс каллусообразования на 11 эксплантах	На поверхности листовой пластинки у основания листа, на черешке
Среда культивирования MS, содержащая 3 мг/л 6-БАП и 2 мг/л 2,4-Д	17	Процесс каллусообразования на 3 эксплантах	На поверхности крупных жилок, на черешке
Среда культивирования MS безгормональная	26	Не отмечено	—

Заключение. При культивировании в условиях освещения плотная длительно культивируемая (в течение 4 месяцев) каллусная ткань была получена на среде GD в присутствии 1,2 мг/л 6-БАП, рыхлый каллус был получен на среде MS при той же концентрации фитогормона.

При культивировании эксплантов большое значение имеет фактор наличия освещения. Культивирование эксплантов в темноте значительно (в 4–5 раз) увеличивает время сохранения листовыми пластинками своей жизнеспособности в случае культивирования на среде без регуляторов роста.

Наиболее активный процесс каллусообразования был получен при культивировании эксплантов в темноте, при наличии в среде 3 мг/л 6-БАП и 3 мг/л ИМК, а также 3 мг/л 6-БАП и 2 мг/л НУК.

Литература

1. Jain, S. M. Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits / S. M. Jain, H. Häggman. – Dordrecht: Springer, 2007. – 478 p.
2. Катаева, Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. – Москва: Наука, 1983. – 96 с.
3. Wilhelm, E. Somatic Embryogenesis in oak (*Quercus* spp) / E. Wilhelm // In vitro cellular and developmental biology. Plant. – 2000. – № 5. – Vol. 36. – P. 349–357.
4. Somatic Embryogenesis in Woody Plants / ed. by S. Mohan Jain, Pramod K. Gupta, R. J. Newton. – Dordrecht: Springer, 1999. – P. 551.
5. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. / B. Cuenca [et al.] // Plant cell reports. – 1999. – Vol. 18. – P. 538–543.
6. Smith, M. A. A comparison of source tissue for protoplast isolation from three woody plant species / M. A. Smith, B. H. McCown // Plant sci. lett. – 1983. – Vol. 28. – P. 149–156.
7. Gresshof, P. M. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato) / P. M. Gresshoff, C. H. Doy // Planta. – 1972. – Vol. 107. – P. 161–170.
8. Murashige, T. A Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. A. Scoog // Physiol. plant. – 1962. – Vol. 15. – № 13. – P. 473–497.
9. Chalupa, V. In vitro propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* MILL.) / V. Chalupa // Biol. plant. (Praha). – 1984. – Vol. 26. – № 5. – P. 374–377.
10. Chalupa, V. Vegetativní rozmnožování dubu (*Quercus robur* L.) buku (*Fagus sylvatica* L.) a lipy (*Tilia cordata* Mill.) řízků a explantátovými kulturami / V. Chalupa // Lesnictva. – 1990. – Vol. 36. – P. 589–597.

Поступила 14.04.2010