

УДК 630*232.414.4

Д. В. Кулагин, мл. науч. сотрудник
(ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»)

ПОЛУЧЕНИЕ КУЛЬТУРЫ *IN VITRO* ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗАРОДЫШЕВЫХ ОСЕЙ В КАЧЕСТВЕ ЭКСПЛАНТОВ

Целью данного исследования было получение асептической культуры дуба черешчатого с использованием ювенильного материала зародышевых осей. В ходе работы было показано, что при использовании в качестве стерилизующего агента раствора гипохлорита натрия доля незараженных эксплантов составила 30–60%. Для нормального развития зародышевых побегов необходимо присутствие в среде стимуляторов роста. На среде № 3 был получен рост как побегов, так и корней. Все среды, проверявшиеся в эксперименте (MS и № 3) и содержащие стимуляторы роста, показали свою пригодность для индукции побегообразования на эксплантах. Наибольшей скоростью роста характеризуются побеги, полученные на среде № 3. Результаты этих исследований, будут использованы для разработки технологии микроклонального размножения дуба черешчатого.

The aim of our investigation was to establish aseptic cultures of common oak. We use juvenile material of embryo axes as explants. During our work it has been shown that percentage of contamination was 30–60% if use sodium hypochlorite as a sterilizing agent. Presence of plant growth regulators is essential for normal development of shoots on embryonic axes. On the medium № 3 shoot and root growth has been received. It has been shown, that mediums (MS and № 3) with addition of plant growth regulators are suitable for an induction of shoot development. The highest growth rate was obtained on medium № 3. The results received in our research will be used for creation of technology of common oak micropropagation.

Введение. В настоящее время в лесном хозяйстве все шире используются методы биотехнологии растений, в первую очередь – микроклонального размножения. Преимущество микроклонального размножения заключается в том, что оно позволяет за короткий срок получать большое количество генетически однородного посадочного материала [1]. Этот метод делает возможной реализацию максимума генетического эффекта, получаемого в селекционных программах, и сокращение времени получения улучшенного посадочного материала в 2–3 раза. При этом отсутствует зависимость от периодичности семенных лет, качества семян, факторов окружающей среды. Микроклональное размножение может быть использовано для получения посадочного материала различных древесных видов, в том числе такой ценной породы для Беларуси, как дуб черешчатый [2]. Актуальность проблемы разработки технологии микроклонального размножения данного вида связана с тем, что традиционные способы размножения дуба имеют определенные недостатки: поскольку плодоношение у растений сильно варьирует по годам, хранить желуди длительное время невозможно, прививки приживаются плохо, укоренение черенков сопряжено с определенными трудностями [3–4]. Клональное микроразмножение – один из путей сохранения и размножения ценных селективных форм этого вида [5].

Работы, связанные с культурами тканей дуба черешчатого, проводились в различных исследовательских учреждениях по всему миру. Однако для каждого конкретного экотипа необходимо определение условий инициации культуры тканей, ее подержания, а также адаптации растений-регенерантов к условиям *ex vitro* (т. е. к произрастанию в почве) [6–8].

Культивирование материала, полученного от взрослых деревьев, представляет пока большие трудности, связанные с утратой ими морфогенных потенций в культуре тканей [2]. Наилучшие результаты при получении пересаживаемых культур дуба черешчатого получены при использовании ювенильного материала (зрелые и незрелые зиготические зародыши, сеянцы от 1 месяца до года). Размножение дуба *in vitro* с использованием ювенильного материала позволяет получать для нужд лесовосстановления большое количество растений различных генотипов, что в свою очередь способствует сохранению биоразнообразия в лесных экосистемах. Выделять и культивировать зародыши можно на различных стадиях их созревания, что позволяет получать растения из незрелых семян. Таким образом, существует возможность сохранить ту часть урожая желудей, которая потеряна по тем или иным причинам в ходе процесса созревания семян [9].

Целью данной работы было получение асептической культуры дуба черешчатого из зародышевых осей.

Основная часть. Исходным материалом служили зрелые желуди, собранные в ноябре в суходольной дубраве. До эксплантации они сохранялись при +4°C. Непосредственно перед выделением эксплантов желуди промылись в растворе моющего средства «Domestos» (ООО «Юнилевер Русь», Россия) и просушивались. Эксплантами, выделенными из желудей, были оси зародышей (зародыши, лишённые семядолей).

Для поверхностной стерилизации зародышевых осей применялась выдержка в 70%-ном растворе спирта в течение 1 минуты с последующей обработкой раствором 1 : 5 моющего средства «Domestos» в течение 3 минут. После этого осуществлялось трехкратное отмывание эксплантов в дистиллированной воде и подсушивание с использованием фильтровальной бумаги, после чего производилась высадка зародышевых осей на среды культивирования. Для культивирования данного типа эксплантов применялись смеси макросолей согласно средам MS [10] и № 3 [11]. Витамины и микроэлементы добавляли во все варианты сред по прописи Мурасиге и Скуга. В качестве источника углерода использовалась сахароза в концентрации 30 г/л. рН получаемого раствора компонентов сред доводился до значений 5,7–5,8. Для уплотнения использовался пищевой агар в концентрации 7 г/л. В качестве регулятора роста класса цитокининов испытывался 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 1 мг/л, ауксинов – нафтилуксусная кислота (НУК) в концентрации 0,2 мг/л. В среды для культивирования в целях снижения содержания окисленных веществ полифенольной природы вводилась аскорбиновая кислота в концентрации 1 мг/л соответственно. Автоклавирование сред осуществлялось при 121°C в течение 30–50 минут. Первоначально высадка эксплантов осуществлялась в чашки Петри по 10–12 на чашку. После 24 часов зародышевые оси переносились в отдельные культуральные сосуды объемом 10 мл, содержащие 3–5 мл питательной среды того же состава, что и в чашках Петри. Субкультивирование производилось 1 раз в 15–20 дней. Культивирование проводилось при температуре 25 ± 2°C при постоянном освещении интенсивностью 2000–3000 лк. При фиксации результатов оценивались такие показатели, как наличие заражения, цвет экспланта, присутствие экссудатов полифенольной природы и протекание процессов корне-, побего- и каллусообразования.

Одним из первых этапов в ходе инициации асептической культуры является стерилизация. От успешности данной операции зависит доля эксплантов, которые в последующем дадут на-

чало асептической культуре. Ниже, в табл. 1, приведены данные, характеризующие выбранный способ стерилизации.

Таблица 1
Эффективность стерилизации эксплантов

Повторность	Общее количество эксплантов	Количество эксплантов, не проявляющих признаков микробного загрязнения
1	30	18 (60%)
2	34	14 (41%)
3	29	9 (31%)

Как следует из данных таблицы, количество незараженных эксплантов заметно варьирует от повторности к повторности, однако в каждом случае чистыми остаются около трети и более зародышевых осей. Невысокие показатели, полученные на этапе стерилизации, вероятно, связаны с тем, что выделение зародышевых осей в части случаев проводилось из желудей, которые начали прорастать и соответственно имели повреждения покровов, а также с тем, что выбранный способ стерилизации относится к относительно мягким (использование стерилизующего агента, содержащего гипохлорид натрия, непродолжительное время стерилизации). В то же время следует отметить, что использовавшийся способ стерилизации не приводит к некрозу эксплантов и избыточному выделению ими экссудатов полифенольной природы.

Микробное заражение эксплантов, связанное с недостатками процедуры стерилизации, проявляется в большинстве случаев в течение 7–10 суток. По истечении этого периода количество контаминированных эксплантов снижается и их появление в большей степени говорит о внутренней инфекции или погрешностях при работе в асептических условиях. Доля названных эксплантов была незначительна, не более 7% от их общего количества.

Культивирование эксплантов проводилось на различных комбинациях сред и стимуляторов роста. Результаты, полученные нами в ходе культивирования, приведены в табл. 2. Как следует из данных таблицы, побегообразования не было только в случае использования сред культивирования без регуляторов роста. При этом наблюдалось аномальное изменение морфологии эксплантов, изгибание зародышевых осей. По истечении месяца культивирования на среде без регуляторов роста экспланты некротизировали. Вероятно, это можно объяснить недостаточностью или несбалансированностью эндогенных регуляторов роста в зародышевых осях, что приводит к их аномальному развитию и некрозу.

Таблица 2

Особенности роста эксплантов в культуре *in vitro*

Среда культивирования	Общее количество незараженных эксплантов	Количество эксплантов, на которых началось развитие побегов	Количество эксплантов, на которых началось развитие корней
Среда № 3, безгормональная	4	0	0
Среда № 3, 1 мг/л 6-БАП	5	5	4
Среда № 3, 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л НУК	7	6	1
MS, безгормональная	7	0	0
MS, 1 мг/л 6-БАП	4	4	0
MS, 1 мг/л 6-БАП, 0,1 мг/л НУК	6	3	0

Первые визуально определяемые признаки развития и роста побегов из зародышевых почек были заметны уже на четвертые сутки культивирования, однако скорость роста была неодинаковой у различных эксплантов. Согласно данным табл. 2, на части жизнеспособных эксплантов наблюдалось также развитие зародышевого корешка. При этом скорость его роста заметно превышала скорость роста побегов. Сравнение влияния минерального состава сред культивирования показало, что развитие зародышевых корней происходило только на среде № 3. На среде MS рост побегов шел медленнее, чем на среде № 3. В ходе роста побегов появление первых дефинитивных листьев на побегах на среде № 3 наблюдался уже через 30 суток культивирования, в то время как на среде MS только через 40.

Присутствие НУК в среде культивирования не давало каких-либо значимых отличий в росте и развитии побегов.

После 30 суток культивирования на среде № 3 формировались одиночные полноценные побеги длиной 1–1,5 см или несколько небольших (до 0,5 см) побегов на одном экспланте.

После 2,5 месяцев культивирования все жизнеспособные побеги были отделены от эксплантов и перенесены в среду для побегообразования.

Заключение. При инициации асептической культуры доля эксплантов, не проявляющих признаков микробного заражения, составила 30–60%, что является сравнительно высоким показателем при использовании в качестве стерилизующих агентов гипохлорита натрия.

При культивировании эксплантов была показана необходимость присутствия в среде стимуляторов роста: на средах без фитогормонов нормальное развитие побегов останавливается, экспланты характеризуются аномальным ростом.

На среде № 3 был получен рост как побегов, так и корней. Экспланты, происходящие из зародышевых осей, при культивировании в условиях *in vitro* способны давать начало как побегам, так и корням.

Все среды, проверявшиеся в эксперименте и содержащие стимуляторы роста, показали свою пригодность для индукции побегообразования на эксплантах, полученных из эмбриональных

осей, однако наибольшей скоростью роста характеризуются побеги, полученные на среде № 3.

Литература

1. Царев, А. П. Селекция и репродукция лесных древесных пород / А. П. Царев, С. П. Погиба, В. В. Тренин. – М.: Логос, 2003. – 520 с.
2. Алексеева, Л. Л. Роль генотипа при размножении дуба черешчатого и сосны обыкновенной методом культуры тканей / Л. Л. Алексеева, М. Ю. Нечаева, Г. П. Бутова // Генетические и экологические основы повышения продуктивности лесов: сб. науч. ст. – Воронеж, 1993 – С. 65–73.
3. Каган, Д. И. Современное состояние дубрав: лесоводческие и генетические аспекты / Д. И. Каган // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2007. – Вып. 67: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 51–62.
4. Chalupa, V. Vegetative propagation of oak (*Quercus robur* and *Q. petraea*) by cutting and tissue culture / V. Chalupa // Ann. sci. for. – 1993. – Vol. 50. – Suppl 1. – P. 295–307.
5. Бутова, Г. П. Морфогенез и регенерация дуба черешчатого в культуре *in vitro* / Г. П. Бутова, Л. Л. Скрובהва. – Физиология растений. – 1988. – Т. 35, вып. 5. – С. 1023–1029.
6. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees / M. Toribio [et al.] // Plant cell, tissue, and organ culture. – 2004. – Vol. 76. – P. 283–287.
7. Juncker, B. Clonal effects in propagation oak trees via *in vitro* culture / B. Juncker, J. Favre // Plant cell, tissue, and organ culture. – 1989. – Vol. 19. – P. 267–276.
8. Micropropagation and restricted-growth storage of adult oak genotypes / K. Gebhardt [et al.] // Ann. sci. for. – 1993. – Vol. 50. – Suppl. 1. – P. 323–329.
9. Ostrolucka, M. G. Utilization of meristem cultures in propagation of oak (*Quercus sp.*) / M. G. Ostrolucka, M. Bezo // Genet. Pol. – 1994. – Vol. 35 (3). – P. 161–169.
10. Murashige, T. A. Revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. A. Scoog // Physiol. plant. – 1962. – Vol. 15. – Vol. 13. – P. 473–497.
11. Chmielarz, P. Zachowanie różnorodności genetycznej dębu szypułkowego / P. Chmielarz // Sylwan. – 1994. – № 3. – S. 30–33.

Поступила 14.04.2010