

Д. В. Кулагин, мл. науч. сотрудник; Н. В. Шахлан, техник I кат.;  
Е. Н. Химченко, техник I кат. (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»)

### ПОДБОР УСЛОВИЙ ИНИЦИАЦИИ *QUERCUS ROBUR L.* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Oaks are ecologically and economically very important species in Belarus. Therefore the forestry requires the qualitative planting stock having known genetic potential. Such planting stock could be obtained with help of vegetative reproduction, but such approach for oak reproduction is labour-consuming enough. Also the problem decision can become micropropagation. Studying of common oak tissue culture initiation was a research objective. In our experiments various parts of adult trees, such as leaves, buds and stems, served as explants. Cultivation medium was modified WPM and GD with addition of BA (0,4–0,8 mg/l) and IBA (0,1–0,2 mg/l). The best results was obtained in experiment with spring buds as explant, cultivated on GD in the presence of BA (0,4 and 0,8 mg/l), IAA (0,15 mg/l) and activated charcoal (3 g/l). As a result of tissue culture induction has been received callus.

**Введение.** Целью воспроизводства лесов является рациональное использование лесных земель, оптимизация формационной и возрастной структуры лесов, повышение их продуктивности. Согласно программе развития лесного хозяйства, к 2011 г. планируется удельный вес лесных культур, создаваемых с использованием селекционного посадочного материала, до уровня не менее 20% от общей площади всех создаваемых лесных культур.

Одной из хозяйственно ценных пород является дуб черешчатый. Эта порода – одна из главных лесобразующих пород Беларуси, которая формирует насаждения площадью 244 тыс. га. Дубравы характеризуются высокой продуктивностью и долговечностью, кроме того, они обладают водоохранными, почвозащитными и газорегулирующими свойствами [1].

В настоящее время существует необходимость не только создания лесосеменных плантаций из материала, который обладает известным генетическим потенциалом, но и производства семенного материала для выращивания высококачественных и устойчивых насаждений дуба черешчатого. Одним из подходов для решения вышеописанных задач служит такой подход, как вегетативное размножение, однако для дуба черешчатого оно является чрезвычайно трудоемким [2]. Заменой вегетативного размножения выступает такой метод, как микроклональное размножение. Преимущества микроклонального размножения заключаются в том, что оно позволяет за короткий срок получать большое количество генетически однородного посадочного материала (до  $10^5$ – $10^7$  растений в год) [3]. При этом отсутствует зависимость от периодичности семенных лет, качества семян, факторов окружающей среды.

Работы, связанные с культурой тканей и микроклональным размножением дуба черешчатого, проводились в различных исследовательских учреждениях по всему миру. Однако для каждого конкретного экотипа необходима проработка условий инициации и поддержания

культуры, адаптации растений к условиям *ex vitro* [4–10].

Успех в получении асептической культуры тканей того или иного вида растений во многом определяется качественным составом и количественным соотношением компонентов среды культивирования. В качестве базовых смесей минеральных солей питательных сред для инициации и поддержания культур тканей растений рода *Quercus* различные авторы предлагают 4 основных состава: среда Мурасиге-Скуга (MS), среда для древесных растений (WPM), среда Gresshoff и Doy (GD) и среда для широколиственных древесных пород (BTM) [11]. Основными регуляторами роста, используемыми при работе с культурами тканей дуба, являются индолилмасляная кислота (ИМК) и 6-бензиламинопурин (БАП) [4–10].

В случае, если компоненты питательных сред подобраны в необходимом отношении, клетки эксплантов начинают пролиферировать, что в конечном счете приводит к формированию каллуса – неструктурированной клеточной массы или началу морфогенеза – процессу образования упорядоченных по гистологическому строению структур.

Таким образом, целью данной работы был подбор условий введения различных генотипов дуба черешчатого в культуру.

**Материалы и методы.** Материал был собран на территории Брестской области в октябре 2008 г., а также в Гомельском районе в феврале 2009 г.

Собранные однолетние побеги были оставлены при комнатной температуре в условиях досветки для индукции распускания почек.

В качестве эксплантов использовались эмбриональные побеги, выделенные из осенних и весенних почек, листья и фрагменты стеблей, полученные из распутившихся почек.

Почки отделялись от побегов, после чего подвергались стерилизации.

Листья и фрагменты стебля получались из распутившихся почек. При этом фрагменты

стебля разделялись на части, содержащие хотя бы 1 междоузлие.

Стерилизация эксплантов включала 2 этапа: предстерилизацию и непосредственно стерилизацию. Первый этап заключался в обработке листьев поверхностно-активными веществами с последующим их промыванием в проточной водопроводной воде в течение 2,5 ч. После предстерилизации часть почек подвергалась удалению кроющих чешуй, другая часть в неизменном виде проходила основной этап стерилизации. Непосредственно стерилизация состояла в обработке эксплантов сначала 70% раствором этилового спирта или раствором антисептика «септоцид» в течение 3–5 мин, а затем 0,01%-ным раствором диацида, также в течение 3–5 мин. Другим вариантом стерилизации было использование вместо диацида раствора моющего средства «Доместос», разведенного в соотношении 1:5 по объему дистиллированной водой. Кроме того, в некоторых случаях в качестве вспомогательного стерилизующего раствора использовался пероксид водорода в концентрации 5–10%. После стерилизации осуществлялось 3-кратное отмывание эксплантов стерильной дистиллированной водой.

Из почек, простерилизованных без удаления кроющих чешуй, в стерильных условиях выделялись эмбриональные побеги и также переносились на среду культивирования.

Основу питательных среды составляли смеси неорганических веществ WPM и GD. Витамины и микроэлементы добавляли во все варианты сред по прописи Мурасиге и Скуга. В качестве регуляторов роста испытывались БАП и ИМК. Помимо регуляторов роста, в среды для снижения содержания окисленных веществ полифенольной природы вводились активированный уголь и поливинилпирролидон в концентрациях 3 г/л и 60 мг/л соответственно. Среда для культивирования на основе WPM включала 20 г/л сахарозы, рН составлял 5,6–5,9. В качестве уплотнителя использовался пищевой агар в концентрации 7 г/л. Среда для культивирования на основе GD включала 30 г/л сахарозы, рН до автоклавирования составлял 5,2–5,3. В качестве уплотнителя использовался пищевой агар в концентрации 6 г/л. Автоклавирование сред осуществлялось при 121°C в течение 30 мин.

Материал культивировался при температуре (25±1)°C, при постоянном освещении интенсивностью 2000–3000 лк или в темноте.

Наблюдения за состоянием и ростом культур осуществлялся ежедневно. Учет результатов осуществлялся через каждые 15 дней. Оценивались такие показатели, как наличие контаминации, цвет экспланта, его жизнеспособность, протекание каллусообразования.

**Результаты и обсуждение.** Немалая доля эксплантов после стерилизации сохраняет на своей поверхности или во внутренних тканях жизнеспособные микробные клетки, что приводит в конечном счете к контаминации. В наших опытах было показано, что различные по происхождению экспланты по-разному отвечают на стерилизацию. Наихудший результат был получен при стерилизации с использованием в качестве эксплантов осенних почек и диацида как основного стерилизующего агента. Кроющие чешуи при этом снимались после стерилизации в асептических условиях. Свободными от контаминации оказались только 7 из 36 эксплантов (около 20%). В то же время относительно эффективной оказалась стерилизация весенних почек с помощью раствора моющего средства «Доместос», при этом снятие кроющих чешуй проводилось в нестерильных условиях. Свободными от контаминации в последнем случае оказались 12 эксплантов из 16 (75%). Наилучший ответ на стерилизацию дали листья, полученные из распустившихся почек. При этом только 2 экспланта из 30 стали источником контаминации получаемых культур.

Как было сказано выше, в качестве эксплантов для получения асептических культур использовались осенние и весенние почки, листья и фрагменты стеблей. Каждый из этих эксплантов характеризуется своим потенциалом при инициации культуры в определенных условиях. Так, все осенние почки, свободные от контаминации, при культивировании на среде WPM с добавлением БАП в концентрации 0,5–1,0 мг/л и ИМК в концентрации 0,1–0,5 мг/л через 20 дней некротировали.

Другим вариантом эксплантов были листья. Источником листьев было 2 растения дуба. Одно из них получило маркировку 1, второе – 7(2). Листовые экспланты обоих генотипов культивировались на одинаковых средах (модифицированная WPM с добавлением регуляторов роста и антиоксидантов). При этом листья генотипа 1 вне зависимости от условий культивирования отмирали уже на четвертые сутки. В то время как экспланты, полученные от генотипа 7(2), оставались зелеными по истечении 25 дней после посадки. Разница в реакции листовых эксплантов на перенос в условия *in vitro*, возможно, характеризует способность конкретного генотипа к инициации культуры тканей.

Состояние листовых эксплантов генотипа 7(2) в зависимости от концентрации регуляторов роста цитокининового ряда также отличалось. Размеры областей некроза на листовой пластинке и скорость их увеличения зависели от концентрации БАП. Нами было использовано 3 концентрации этого стимулятора роста: 0,4, 0,8 и 1,2 мг/л. Листовые экспланты, куль-

тивировавшиеся на среде, содержащей 0,4 мг/л, отмирали уже через 14 дней, в то время как при содержании БАП 1,2 мг/л некоторые экспланты оставались живыми в течение 25 дней.

Все листовые пластинки эксплантов в ходе культивирования сильно деформировались, что, возможно, является признаком клеточной пролиферации. К сожалению, на листовых эксплантах не наблюдалось формирование каллуса или морфогенеза. Однако, учитывая имеющиеся в литературе данные, этот вид экспланта может быть весьма перспективным источником культуры тканей.

В качестве экспланта нами были использованы и фрагменты стебля, содержащие хотя бы 1 междоузлие. Культивирование их осуществлялось на тех же средах, что и культивирование почек. Ввиду небольшого количества материала зависимостей между реакцией данного типа эксплантов и условиями культивирования установлено не было. Однако именно фрагменты стебля дали начало каллусной культуре. Формирование рыхлого каллуса наблюдалось на месте среза на 2 эксплантах генотипа 7(2), культивировавшихся на модифицированной WPM с добавлением 0,4 г/л БАП и активированного угля. Плотный каллус был получен на месте среза на одном экспланте генотипа 1, культивировавшегося на модифицированной WPM с добавлением 0,8 г/л БАП и активированного угля.

Наилучшие результаты при введении в культуру дало использование в качестве эксплантов весенних почек, культивирование которых проводилось на среде GD с добавлением БАП (0,4 и 0,8 мг/л), ИМК (0,15 мг/л) и активированного угля (3 г/л). В данном случае каллусообразование наблюдается во всех вариантах опыта.

Таким образом, для определения оптимальных параметров инициации культуры тканей дуба черешчатого необходимо учитывать ряд факторов: источник эксплантов, время его сбора, генотип родительского растения, среды для культивирования, оптимальное соотношение регуляторов роста растений.

Во всех вариантах опытов нами было получено только каллусообразование. Однако несомненный интерес представляет подбор условий, при которых на эксплантах или в полученной каллусной ткани начнутся процессы органогенеза, т. к. именно органогенез является предшественником формирования полноценных растений-регенерантов.

**Заключение.** В проведенных нами опытах наилучшим образом на стерилизацию влияют экспланты листового происхождения при использовании диацета в качестве основного стерилизующего агента (до 80% всех эксплантов не проявляют признаков контаминации).

Показана зависимость жизнеспособности листовых эксплантов от присутствия в среде БАП и генотипа растения. При увеличении его концентрации до 1,2 мг/л заметно замедляется отмирание эксплантов.

Каллусообразование наблюдалось на эксплантах стеблевого происхождения и эксплантах, полученных из весенних почек. Последний вариант источника экспланта показал наилучшие результаты.

## Литература

1. Кожевников, А. М. Дубравы Беларуси: состояние, проблемы и пути улучшения ведения хозяйства в них / А. М. Кожевников // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 1998. – Вып. 48: Дуб – порода третьего тысячелетия. – С. 40–49.
2. 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.
3. Перспективы использования биотехнологии в лесном хозяйстве / И. И. Концевая [и др.] // Лесн. и охотн. хоз-во. – 2007. – № 1. – С. 26–28.
4. Junker, 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.
5. Vengadesan, G. Somatic embryogenesis and plant regeneration of northern red oak (*Quercus rubra* L.) / G. Vengadesan, P. M. Pijut // Plant cell, tissue, and organ culture. – 2009. – Vol. 39. – P. 121–127.
6. Micropropagation and restricted-growth storage of adult oak genotypes / K. Gebhardt [et al.] // Ann. sci. for. – 1993. – Vol. 50. – Suppl 1. – P. 323–329.
7. Somatic embryogenesis in mature *Quercus robur* trees / M. Toribio [et al.] // Plant cell, tissue, and organ culture. – 2004. – Vol. 76. – P. 283–287.
8. Бутова, Г. П. Морфогенез и регенерация растений дуба черешчатого в культуре *in vitro* / Г. Бутова, Л. Скрובה // Физ. растений. – 1988. – Т. 35; № 5. – С. 1023–1030.
9. Favre, J. M. In vitro growth of buds taken from seedlings and adult plant material in *Quercus robur* L. / J. Favre, B. Juncker // Plant cell, tissue, and organ culture. – 1987. – Vol. 8. – P. 49–60.
10. Influence of explant source, plant growth regulators and culture environment on culture initiation and establishment of *Quercus robur* L. *in vitro* / I. Puddephat [et al.] // J. of experimental botany. – 1997. – Vol. 48. – № 309. – P. 951–962.
11. 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.