

УДК 581.1

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ МЕТОДАМИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

С.Н. Тимофеева

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

Проблема размножения древесных видов растений традиционными методами существует достаточно давно. Значительно расширяет возможности вегетативного размножения применение современных биотехнологических методов микрклонального размножения (МкР), позволяя в гораздо более короткие сроки получить необходимое количество растений - регенерантов, генетически идентичных донорскому экземпляру (1,3,4). Исследования по МкР древесных показали, что существуют виды, достаточно «легко» размножаемые биотехнологическими методами (сем. *Rosaceae*), так и виды, МкР которых весьма проблематично (сем. *Pinaceae*) (1,2,4). Несмотря на обилие экспериментальных работ, посвященных МкР, до сих пор в каждом конкретном случае для создания эффективной методики требуется изучить морфогенетический потенциал различных типов эксплантов, выбрать наиболее продуктивный метод культивирования, оптимизировать состав питательной среды, изучить влияние фитогормонов на рост и развитие клеточных культур.

Целью данной работы было выяснение возможности введения в культуру *in vitro* определенных видов древесных, выявление видов, обладающих определенным морфогенетическим потенциалом для размножения методами клеточных культур, изучение факторов, определяющих рост и развитие культур *in vitro*.

Материалы и методы

Все объекты исследования, являясь перспективными для разведения, характеризуются низкой эффективностью вегетативного и семенного размножения. Все, кроме спиреи японской, находятся в генеративной фазе развития. В таблице 1 представлена биологическая характеристика растений.

В качестве первичных эксплантов использовали вегетативные почки побегов, верхушки вегетирующих побегов текущего года длиной 1,5-2 см, листовые сегменты размером 1x1 см.

Поверхностную стерилизацию растительного материала проводили по стандартной методике: 30 сек - в 70° спирте, затем 10 – 15 мин в диациде, после чего промывали 3-мя порциями стерильной воды.

Питательная среда для инициации клеточных культур включала макро- и микросоли по Мурасиге-Скугу, тиамин, пиридоксин и никотиновую кислоту - по 0,5 мг/л, аскорбиновую кислоту - 1 мг/л, мезоинозит - 100 мг/л, сахарозу - 20г/л, агар - 7 г/л. В вариантах опыта использовали цитокинины (6-БАП, кинетин) и ауксин (НУК) в разных концентрациях и сочетаниях.

Таблица 1. Характеристика объектов исследования

Объект	Фено- но тип	Воз- раст, лет	Биологическая характеристика
1	2	3	4
сем. <i>Anacardiaceae</i> Скумпия дубильная – <i>Cotinus coggygia</i> <i>Scop.</i>	к	10	Высокодекоративна на протяжении всей вегетации. Устойчива к городским условиям. Морозостойка. Нетребовательна к почвам. Не повреждается вредителями. Используется в хозяйственных и медицинских целях.
сем. <i>Berberidaceae</i> Барбарис обыкновенный <i>Berberis vulgaris L.</i>	к	15	Весьма декоративен. Морозо- и засухоустойчив. Неприхотлив к условиям выращивания.
сем. <i>Fagaceae</i> Дуб черешчатый, колоновидный - <i>Quercus robur L.</i>	д	50	Ценнейшая древесная порода, как для озеленения, так и для использования в хозяйственных целях. Выносит морозы до –40°С. Высокая степень засухо- и жароустойчивости. В первые годы жизни характеризуется медленным ежегодным приростом (до 20 см).
1	2	3	4
сем. <i>Leguminosae</i> Церцис канадский- <i>Cercis canadensis L.</i>	к	20	Раннее, обильное цветение. Засухоустойчив. Темно-зеленая листва сохраняет свежий вид даже в самые сухие месяцы. К почве нетребователен. Морозостоек. Растет очень медленно. Медонос.
сем. <i>Leguminosae</i> Бобовник анагир- овидный, золотой дождь - <i>Laburnum anagiroides</i> <i>Medic.</i>	к	10	Очень декоративен во время цветения. Растет быстро, рано вступает в пору плодоношения (с 3-х лет). Требователен к плодородию и влажности почвы. Довольно морозостоек, но при –25°С подмерзает. Дымо- и пылеустойчив. Все части растения ядовиты, используются в медицине.
сем. <i>Vitaceae</i> Гортензия метельчатая - <i>Hydrangea paniculata</i> <i>Sieb.</i>	к	5	Быстро растет. Морозостойка. Устойчива к городским условиям. Ценится за высокую декоративность во время цветения, а также за поздние сроки цветения (август – сентябрь).
сем. <i>Rosaceae</i> Слива Писсарди- <i>Prunus Pissardii Carr.</i>	д	10	Прекрасный материал для озеленения. Отличается темно-пурпурными листьями на протяжении всей вегетации. Очень декоративна во время цветения.
сем. <i>Rosaceae</i> Спирея японская <i>Spiraea japonica</i> <i>Schmidt.</i>	к	5	Ценное декоративное растение. Неприхотлива к почве, рано вступает в цветение и плодоношение. Хорошо переносит городские условия. Светолюбива. Морозоустойчива.

Примечание. Д – дерево, к- кустарник

Клеточные культуры выращивали при $t -22-24^{\circ}\text{C}$ и 14-час фотопериоде; освещенность составляла 1000 лк.

Результаты и обсуждение

Изученные объекты характеризовались разной степенью внешней и внутренней загрязненности. Самыми «чистыми» оказались слива, спирея и бобовник – для них применение стандартной методики было достаточно эффективным. Высокой степенью загрязненности характеризовались барбарис и гортензия, поэтому стерилизация эксплантов от этих объектов потребовала дополнительной обработки растительного материала 0,5 % раствором фундазола в течение 10 мин.

На этапе инициации клеточных культур морфогенетический потенциал изучаемых объектов определяли как способность эксплантов к росту и развитию в условиях *in vitro*, оценивали по альтернативному признаку «да – нет» (табл. 2). При культивировании почек или верхушек побегов положительными считали те варианты, когда развивался один или несколько побегов, разворачивались листочки; при культивировании листовых дисков – если в тканях экспланта образовывались адвентивные почки или эмбриониды.

Таблица 2. Морфогенетический потенциал различных типов эксплантов

Объект \ Эксплант	Почки	Листовые сегменты	Верхушки побегов
Скумпия дубильная	+	+	+
Барбарис обыкновенный	-	-	+
Дуб колоновидный	-	-	*
Церцис канадский	-	-	-
Бобовник анагировидный	+	+	-
Гортензия метельчатая	+	-	-
Слива Писсарди	+	-	+
Спирея японская	+	-	-

Примечание. * - единственный случай в выборке

Согласно полученным данным, все изученные объекты можно условно разделить на 3 группы:

- 1) « полностью неспособные » к МкР в данных экспериментальных условиях – церцис (отрицательный результат во всех вариантах), и, по-видимому, дуб (инициация клеточных культур у которого наблюдалась в единственном случае)
- 2) « способные » к МкР – слива, спирея, бобовник, гортензия

3) « максимально способные » к МкР объекты - инициация клеточных культур наблюдалась во всех изученных вариантах – скумпия.

Как видно из таблицы 2, культура *листовых дисков* оказалась продуктивной только для скумпии и бобовника. В первые же дни культивирования по кромке листового диска скумпии формировался раневый каллус в виде темной гофрированной полоски. Через 3 - 4 недели в массе раневого каллуса были отчетливо заметны мелкие (1 – 2 мм) округлые структуры светло-зеленого цвета, по-видимому, адвентивные почки. У бобовника формирования раневого каллуса не происходило, а структуры - крупные (3 – 4 мм), овальные образования светло-желтого цвета, предположительно эмбриониды, - развивались непосредственно на тканях экспланта.

Листовые экспланты барбариса, дуба, церциса, гортензии и спиреи быстро теряли зеленую окраску, бурели и некротизировали.

Инициацию клеточных культур от *почек* наблюдали у скумпии, бобовника, гортензии, сливы и спиреи с различной частотой, в зависимости от гормонов, присутствующих в питательной среде. Почки увеличивались в размерах и зеленели. Через 3 – 5 недель у скумпии, бобовника, сливы и спиреи в отдельных вариантах разворачивались листочки и развивался одиночный побег. В ряде случаев одновременно дополнительно формировались 2-3 небольших пазушных побега.

При культивировании *верхушек побегов* рост побегов (в основном первичных) наблюдали у сливы и скумпии, в единичных случаях – у дуба, спиреи и барбариса. Развитие почек было аналогично происходящему в естественных условиях. Длина микропобегов в некоторых вариантах достигала 1,5 – 2 см.

Роль фитогормонов в инициации, росте и развитии клеточных культур общеизвестной, во многом является определяющей. В таблице 3 представлены полученные нами данные по изучению фитогормонов, как индукторов морфо- и органогенеза.

При сравнительном изучении цитокининов было выявлено определенное преимущество БАП перед кинетином. Темпы роста на средах с кинетином почти во всех случаях были очень низкими, развитие зачастую останавливалось на фазе «зеленого конуса». На средах с БАП ростовые процессы шли более активно, развивался как основной побег, так и пазушные.

Инициация культур *листовых дисков* была наиболее продуктивной на среде, содержащей 1,0 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК.

В культуре *верхушек побегов* инициация развития побегов наблюдалась как на средах с БАП, так и на средах с кинетином, при этом наиболее удачные клеточные культуры были получены на безгормональной среде.

Проведенные исследования позволяют предположить, что большинство изученных объектов потенциально способны к микроклональному размножению в условиях *in vitro*. Были изучены основные факторы, влияющие на инициацию клеточных культур: тип экспланта, методы культивирования, фитогормоны – индукторы морфогенеза. Выявлены определенные закономерности для каждого объекта. Получены клеточные культуры для дальнейших исследований.

Таблица 3. Влияние фитогормонов на инициацию клеточных культур

Объект	Эксплант	Фитогормоны, мг/л								
		Без гормонов	БАП - 0,5	БАП-1,0 НУК-0,5	БАП -1,0 НУК -0,1	БАП - 2,5	БАП - 5,0	БАП 0,5 Кинетин - 0,5	Кинетин - 0,5	Кинетин - 1,0
Скумпия субильная	П	-	+	+	+	+	+	+		+
	В	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	Л	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Барбарис обыкновенный	В	+	+	-	+	-	-	+	-	-
	Л	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Дуб колоновидный	П	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	В	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	Л	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Церцис канадский	П	-	-			-		-		-
	В	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Л	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Бобовник анагировидный	П		+			+		+		+
	В	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Л	-	-	-	+	-		-		-
Гортензия метельчатая	П		+			+				-
	В	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Л	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Слива Писсарди	П		+	+	-	+	+	+	-	-
	В	+	-	-	-	+	+	+	+	+
	Л	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Спирея японская	П					-		+		+
	В	-	-	-	-	+	+	+	-	-
	Л	-	-	-	-	-	-	-	-	

Примечание. П – вегетативные почки, в – верхушки вегетативных побегов, л – листовые сегменты

Литература

Джонс П. Размножение деревьев *in vitro* с помощью культуры побегов// Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.,1987. С.135- 152.

Тиссера Б. Эмбриогенез, органогенез и регенерация растений//Биотехнология растений: культура клеток. М., 1989. С.97- 127.

Хасси Г. Размножение сельскохозяйственных культур *in vitro*//Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.,1987. С.105 – 131

Слюсаренко А.Г. Проблемы масс - клонального размножения растений //Бюллетень ГБС. Выпуск 153. С.57- 61.

УДК 581.48

КУЛЬТУРА *IN VITRO* НЕКОТОРЫХ РАННЕСПЕЛЫХ ФОРМ КУКУРУЗЫ

Т.А. Алаторцева, С.С. Наумова

Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского
410012 г. Саратов, Астраханская, 83, biofac@sgu.ru

Метод *in vitro* позволяет решать широкий спектр задач, касающихся сохранения и воспроизводства ценных генотипов. При этом успех работы во многом зависит от правильности выбора экспланта. Наиболее распространенными объектами для злаков являются молодые незрелые зародыши как наиболее отзывчивые на условия культивирования. Однако одним из преимуществ культивирования зародышей из зрелых зерновок заключается в том, что работы с ними можно проводить практически круглогодично. Определенный опыт в культивировании зародышей кукурузы уже освещен в литературе (Hisajima, 1994; Муссияка, 1997).

Большое значение имеет разработка методов культивирования скороспелых форм, так как скороспелость является одним из важнейших селекционных признаков, при чем, согласно литературным данным, длительность вегетационного периода является существенным фактором, определяющим морфогенетический потенциал зародышей кукурузы *in vitro* (Пиралов, 1997).

Цель настоящей работы заключалась в исследовании путей получения регенерантов в культуре зрелых зародышей некоторых скороспелых линий кукурузы.

В задачи работы входило:

а) изучить морфогенетические тенденции зародышей при разных концентрациях 2,4-Д в среде;

в) выявить для каждой из линий наиболее оптимальные концентрации ауксина 2,4-Д для индукции каллусогенеза и прорастания зародышей.

Были исследованы 5 линий кукурузы (4 из них новосибирской селекции – Н5, Н9, Н12, Н14 и 1 линия получена в лаборатории генетики Саратовского госуниверситета – С59).

Для выделения зрелых зародышей отбирали сухие зерновки среднего размера. В качестве стерилизующих растворов использовали 75% этанол, раствор гипохлорита натрия (1,3-1,5% активного хлора). Культивирование проводили при естественном освещении на питательной среде, содержащей минеральные соли МС, витамины, сахарозу (2%) и 2,4-Д (2,0 и 4,0 мг/л); рН до автоклавирования составлял 5,8-6,1.

Наблюдение за эксплантами показало, что активность зародышей *in vitro* достаточно сильно зависит от времени года. Так с начала весны до середины лета они прорастают в течение одной недели, а зимой около двух месяцев. От-