

ИЗУЧЕНИЕ МЕТОДА КУЛЬТУРЫ *in vitro* КАК СПОСОБА ВЕГЕТАТИВНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ХВОЙНЫХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

В.В. Красноперова^{1,2}, аспирант, И.Л. Бухарина³, доктор биологических наук

¹Ижевская государственная сельскохозяйственная академия,
426069, Удмуртская Республика, Ижевск, ул. Студенческая, 11

²Удмуртский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
Удмуртского федерального исследовательского центра УрО РАН,
427007, Удмуртская Республика, Завьяловский район, с. Первомайский, ул. Ленина, 1
E-mail: vlada-vk@bk.ru

³Удмуртский государственный университет,
426034, Удмуртская Республика, Ижевск, ул. Университетская, 1
E-mail: buharin@udmlink.ru

Исследования направлены на совершенствование технологии вегетативного размножения хвойных древесных пород в условиях in vitro путем подбора оптимальных сред для стерилизации эксплантов вегетативных частей растений, использования регуляторов роста для получения каллуса и стимуляции корнеобразования пробирочных растений. В качестве объектов исследования были вегетативные части хвойных растений: почки и части годичных побегов. Растительные объекты простерилизованы и высажены на питательные среды различного состава согласно схеме опытов. Проведены лабораторные исследования, на основании которых отмечено успешное применение гипохлорита натрия по сравнению с другими реагентами при стерилизации эксплантов. По результатам опытов выявлена питательная среда Woody Plant Medium, способствующая наилучшей приживаемости эксплантов хвойных растений. Также определено влияние на приживаемость эксплантов и их жизнеспособность в культуре in vitro таких регуляторов роста, как 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота и 2,4-динитрофенол в составе питательных сред. Данная методика позволяет при дальнейшем культивировании и размножении хвойных растений получить посадочный материал, наиболее полно сохраняющий в потомстве хозяйственно ценные признаки и свойства материнского растения.

THE STUDY OF THE METHOD OF CULTURE *in vitro* AS A METHOD OF VEGETATIVE PROPAGATION OF CONIFEROUS TREES

Krasnoperova V.V.^{1,2}, Bucharina I.L.³

¹Izhevsk state agricultural Academy,
4260696, Udmurtskaya Respublika, Izhevsk, ul. Studencheskaya, 11

²Udmurt research Institute of agriculture of the 2Udmurt Federal research center of the Russian Academy of Science6,
42700, Udmurtskaya Respublika, Zavyalovskij rajon, s. Pervomajskij, ul. Lenina, 1
E-mail: vlada-vk@bk.ru

³Udmurt state University,
426034, Udmurtskaya Respublika, Izhevsk, ul. Universitetskaya, 1
E-mail: buharin@udmlink.ru

Research is aimed at improving the technology of vegetative propagation of coniferous trees in vitro by selecting optimal media for sterilizing the explants of vegetative parts of plants, and using growth regulators to obtain callus and stimulating the root formation of test-tube plants. The objects of study are the vegetative parts of conifers: the buds and parts of the annual shoots. Plant objects sterilized and planted on nutrient media of different composition according to the scheme of experiments. Laboratory studies were conducted, on the basis of which successful use of sodium hypochlorite was noted compared with other reagents for sterilization of explants. According to the results of the experiments, a Woody Plant Medium nutrient medium was identified which promotes the best survival of the explants of conifers. The effect on growth survival of explants and their viability in culture in vitro, growth regulators such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4-dinitrophenol in nutrient media was also determined. With the further cultivation and reproduction of coniferous plants, this technique allows to obtain planting material that most economically preserved in the offspring the economically valuable traits and properties of the parent plant.

Ключевые слова: вегетативное размножение, культура *in vitro*, хвойные растения, регуляторы роста

Key words: vegetative propagation, *in vitro* culture, coniferous plants, growth regulators

Одно из перспективных направлений развития науки XXI в. – микрклональное размножение растений. Основные его преимущества по сравнению с традиционным вегетативным способом: высокий коэффициент размножения, расширение сезонности выполняемых работ и выпуск растений к определенному сроку, а также возможность размножать и укоренять растения, которые не размножаются или затруднительно размножаются обычными способами [1].

Клеточные технологии, основанные на культивировании *in vitro* органов, тканей, клеток и изолированных протопластов высших растений, могут облегчить и ускорить традиционный процесс создания новых со-

ртов. Они предполагают принципиально новые пути, такие как соматическая изменчивость, мутагенез на клеточном уровне, клеточная селекция, соматическая гибридизация для создания генетического разнообразия и отбора форм с искомыми признаками. Кроме того, клеточные технологии эффективны в создании безвирусного материала вегетативно размножаемых растений [2].

Поскольку продукция лесной отрасли находит применение практически в каждой производственной сфере, лесной сектор очень привлекателен для внедрения биотехнологий [3, 4]. Сейчас достигнуты достаточно хорошие результаты по различным направлениям лес-

ной биотехнологии, но, несмотря на это, пока не наблюдается их широкое внедрение в лесохозяйственную практику [5]. В начальные этапы развития лесной биотехнологии методы культуры тканей *in vitro*, обеспечивающие быстрое размножение травянистых растений, были применены и на древесных породах. Изначально эти методы были малоэффективны, особенно при работе с взрослыми формами деревьев [6]. Однако разработке и совершенствованию технологии выращивания посадочного материала древесных культур улучшенного качества уделяют внимание зарубежные авторы [7-9].

В биотехнологии микрклонального размножения хвойных растений существует два направления – соматический и микроспоральный эмбриогенез. Большинство исследований, посвященных проблеме микрклонального размножения хвойных пород древесных растений *in vitro*, выполнено методом соматического эмбриогенеза. Использование в качестве эксплантов мегагаметофитов незрелых зиготических зародышей, семядолей, гипокотили, микроспороцитов, микроспор и пыльцы лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb), сосны сибирской (*Pinus sibirica* Rupr.), сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и кедрового стланика (*Pinus pumila* Regel.) позволило получить у этих видов растений соматические зародыши и зародышеподобные структуры [10 - 13, 14].

Недостатком данного метода служит наличие контролируемого опыления для получения чистых линий. Строго учитываются сроки взятия образцов: семена собирают в предсемядольной стадии развития зародыша. Данный способ требует специализированного оборудования для контроля над опылением и сбором семян. Исследования показали, что успешное формирование эмбрионально-сuspензорной массы зависит от срока сбора семян, стадии введения зародышей в культуру и растения-донора [15].

Экспланты из семян или проростков (ювенильный материал) обычно наиболее пригодны для культивирования *in vitro*. Однако посадочный материал, полученный таким способом, аналогичен посадочному материалу из семян, и уровень наследуемости ценных признаков будет всего 10-20% [16]. Использование семенного поколения не позволяет полностью воспроизвести генотип исходного растения. В зрелом растении генотип реализуется в фенотип, и отбором среди таких экземпляров можно выбрать плюсовые деревья для клонирования *in vitro*. Однако такой способ занимает довольно много времени на выращивание дерева, что не соответствует требованиям ускоренного размножения.

Методы вегетативного размножения растений *in vitro* включают в себя культуру побегов с размножением пазушных или придаточных побегов, а также каллусную культуру с регенерацией побегов или эмбрионидов [1]. Метод культуры побегов применяли для многих видов древесных растений, включая плодовые, лесные и декоративные. Каллусную культуру использовали реже, которая, однако, оказалась эффективной для таких важных древесных культур, как *Citrus* и гвинейская масличная пальма. До сих пор наиболее сложные варианты размножения *in vitro* с использованием клеточных суспензий, культивируемых пыльников и протопластов редко успешно завершаются при работе с деревьями [17].

В связи с этим задачей настоящей работы было выявить наиболее эффективный способ ускоренного размножения хвойных пород для нужд лесного и садово-паркового хозяйства с применением метода культуры *in vitro*.

Методика. Работы с культурой *in vitro* проводили в стерильных условиях меристемной лаборатории Удмуртского научно-исследовательского института сельского хозяйства. Сбор эксплантов с модельных особей древесных растений ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. и ели колючей *Picea pungens* Engelm., характеризующихся высокой функциональной активностью и хорошим жизненным состоянием, проводили на базе Удмуртского государственного университета [18]. В качестве посадочного материала в культуре *in vitro* использовали верхушечные почки и части молодых стеблей взрослых древесных растений. Кроме того, для обеспечения максимальной стабильности клонируемого материала, во избежание появления аномальных растений в качестве эксплантов использовали молодые слабо дифференцированные ткани: верхушечные почки растений, молодые побеги от 1 до 10 см длиной. Для сбора почек подходящее время – январь-апрель, когда почки уже набухают, но еще не раскрыты. В мае-июле проводили сбор молодых побегов, находящихся в состоянии интенсивного роста (выход из фазы покоя и переход к активному росту).

Стерилизацию растительного материала осуществляли путем погружения эксплантов в дезинфицирующий раствор (5%-ный раствор гипохлорита натрия, экспозиция – 30 мин; 5%-ный спиртовой раствор хлоргексидина, экспозиция – 10 мин; 6%-ный раствор хлорамина, экспозиция – 10 мин). После стерилизации растительные ткани промывали в 3-4 порциях стерильной дистиллированной воды.

Метод культуры *in vitro* проводили на различных средах: Мурасиге-Скуга, Woody Plant Medium (WPM), Андерсона с уровнем pH 5,6-5,8. К стандартному минеральному составу среды были добавлены витамины, антибиотики, регуляторы роста, антиоксиданты. Для адсорбции ингибиторов роста, выделяемых тканями растений, и ускорения роста побегов голосеменных добавляли активированный уголь в концентрации 2%. Добавление гормонов роста проводили по схеме в выделившуюся в предыдущем опыте питательную среду WPM: 1 – без гормонов (контроль); 2 – 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) – 2 мг/л; 3 – 2,4-динитрофенол – 0,092 мг/л; 4 – 2,4-Д + 6-БАП (6-бензиламинопуридин) – 2 мг/л + 2 мг/л; 5 – 2,4-динитрофенол + 6-БАП – 0,092 мг/л + 2 мг/л. Пробирки с эксплантами культивировали в комнате без доступа света при температуре 22-25 °С и влажности 70% в течение 2 нед. Дальнейшее культивирование проводили при 26 °С, световом периоде 16 ч и освещенности 4-5 тыс. люкс. Для поддержания пролиферирующих культур каждые 2-3 нед экспланты пересаживали на свежую питательную среду.

Результаты и обсуждение. В ходе исследований лучшим стерилизующим агентом оказался 5%-ный раствор гипохлорита натрия с 30- минутной экспозицией стеблей и 10- минутной – почек хвойных растений. При стерилизации гипохлоритом натрия приживаемость почек ели колючей составила в среднем 67%, ели европейской – 61%. Для стерилизации стеблевых черенков потребовалось увеличить концентрацию этого раствора до 7-10%, при этом приживаемость почек была на уровне 17-19%. Использование растворов хлоргексидина и хлорамина с экспозицией 10 мин не обеспечило асептики тканей стеблевых черенков растений. Экспланты очень быстро поражались патогенной микрофлорой и дальнейший их рост был невозможен.

Оптимальной питательной средой для посадки эксплантов определена среда WPM, на которой продолжили развитие 63% почечных эксплантов ели колючей

Табл. 1. Приживаемость (%) эксплантов на различных питательных средах

Эксплант (В)	Питательная среда (А)				Среднее В
	½ Мурасиге-Скуга	Мурасиге-Скуга	Андерсона	Woody Plant Medium	
Ель европейская					
Почки	50	38	43	73	51
Стебли	42	43	35	62	46
Среднее А	46	41	39	68	49
НСР ₀₅	главных эффектов		частных различий		
А	16		23		
В	16		32		
Ель колючая					
Почки	38	42	42	63	46
Стебли	35	27	26	44	33
Среднее А	37	34	34	54	40
НСР ₀₅	главных эффектов		частных различий		
А	20		29		
В	19		39		

Табл. 2. Приживаемость (%) эксплантов при использовании регуляторов роста

Эксплант (В)	Регуляторы роста (А)					Среднее В
	без гормонов	2,4-Д	ИД-82	2,4-Д+ БАП	ИД-82 +БАП	
Ель европейская						
Почки	39	25	41	43	59	41
Стебли	39	56	37	69	59	52
Среднее А	39	40	39	56	59	47
НСР ₀₅	главных эффектов		частных различий			
А	18		26			
В	11		30			
Ель колючая						
Почки	38	43	28	27	42	36
Стебли	39	26	41	41	43	38
Среднее А	37	35	34	34	42	36
НСР ₀₅	главных эффектов		частных различий			
А	13		19			
В	11		30			

и 73% – ели европейской (табл. 1). У ели европейской прижились 62% стеблевых черенков, у ели колючей – 44%. На средах Андерсона и Мурасиге-Скуга количество жизнеспособных почечных эксплантов двух видов ели достигало 38-50%, стеблевых черенков – 25-42%. В сравнении с другими средами экспланты на среде WPM имели ярко-зеленую окраску и свежий вид более длительное время, интенсивный верхушечный рост и рост каллуса продолжался в течение 6 мес.

Добавление гормонов роста в выделившуюся питательную среду также повлияло на рост эксплантов и образование каллуса (табл. 2). Лучший результат получен при совместном добавлении в среду WPM ауксина и цитокинина (ИД –82% +БАП – 59%), при этом к 3-й неделе культивирования был замечен верхушечный рост черенков, тогда как на среде без гормонов рост начинался на 2 нед позже. Сочетание гормонов в питательной среде ускорило каллусообразование, которое началось на 10-й день после посадки. При добавлении только ауксинов нарастание каллуса стало заметно лишь на 15-17-й день, а на безгормональной среде каллус образовался на 22-25-й день или вообще не формировался.

Результаты трехлетних исследований показали, что введение в культуру *in vitro* вегетативных частей растений хвойных пород – длительный и сложный процесс, требующий детального подхода к каждому этапу культивирования. Эффективная стерилизация растительного материала достигнута только при использовании 5%-ного раствора гипохлорита натрия (NaOCl). Наиболее оптимальной питательной средой для введения в культуру *in vitro* хвойных растений определена среда WPM с добавлением ауксинов и цитокининов. Сочетание гормонов способствовало более активному росту и развитию каллусных клеток, что позволяет длительное время культивировать экспланты перед высадкой в грунт.

Литература

1. Тимофеева О.А., Румянцева Н.И. *Культура клеток и тканей растений: учебное пособие.* – Казань: Казанский университет, 2012. – 91 с.
2. Широков А.И., Крюков Л.А. *Основы биотехнологии растений// Электронное учебно-методическое пособие.* – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 49 с.
3. Газизуллин А. Х. *Современное состояние лесной биотехнологии в мире и в России // Вестник Казанского ГАУ.* – 2012. – № 4 (26). – С. 94-98.
4. Красноперова В.В., Исламова Н. А., Бухарина И.Л. *К вопросу о современных технологиях размножения хвойных древесных пород // Международный научно-исследовательский журнал (ВАК).* – 2016. – № 5 (47) часть 6. – С. 36-38.
5. Жигунов А.В. *Применение биотехнологий в лесном хозяйстве России // Лесной журнал.* – 2013. – № 2. – С. 27–35.
6. Winton L.L., Thorpe ed. T. A. *Morphogenesis in clonal propagation of woody plants. In Frontiers of Plant Tissue Culture // Calgary: Calgary University.* – 1978. – P. 419 – 426.
7. Hasnain S., Cheliah W. *Tissue culture in forestry: economic and genetic potential // Forestry Chronicle.* – 1986. V. 62. – № 4. – P. 219-225.
8. Malabadi R. B., Nataraja K. *Genetic transformation of Conifers: Applications in and Impacts on commercial Forestry // Transgenic plant Journal.* – 2007. – T. 1(2). – P. 289–313.

9. Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self-and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* through somatic embryogenesis // *Plant Cell Tiss Organ Cult.* – 2008. – V.92. – P. 31-45.
10. Tang W. The effect of different plant growth regulation on adventitious shoot formation from *Pinus virginiana* zygotic embryo // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2004. – V.78. – P. 237-240.
11. Белоруссова А.С. Закономерности соматического эмбриогенеза и андроклинии у лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb): эмбриологические аспекты: автореф. дис. ... к-та биол. наук. – Красноярск. – 2007. – 21 с.
12. Третьякова И.Н., Ижболдина М.В. Особенности роста эмбрионного каллуса и получение соматических зародышей у кедра сибирского // *Хвойные бореальной зоны.* – 2008. – № 1- 2. – С. 71-77.
13. Третьякова А.В., Демина Е.А., Рекославская Н.И., Саляев Р.К. и др. Особенности получения каллусной культуры пихты сибирской *Abies sibirica* Ledeb // *Известия Иркутского государственного университета.* – 2014. – Т. 10. Серия «Биология. Экология». – С. 11–23.
14. Третьякова И.Н., Ворошилова Е.В., Иваницкая А.С. [и др.]. Эмбриогенные клеточные линии и соматический эмбриогенез *in vitro* у видов хвойных произрастающих в Сибири // *Биология клеток растений in vitro и биотехнология: сборник тезисов X Международной конференции, 14-18 Октября 2013 г.* – Казань, 2013. – С. 151-152.
15. Третьякова И.Н., Белоруссова А.С., Носкова Н.Е. Перспективы применения методов биотехнологии для размножения генетически ценных форм лесных древесных видов // *Хвойные бореальной зоны.* – 2007. – № 2-3. – С. 309-317.
16. Долголиков В.И., Попивший И.И. Положительные стороны и недостатки клоновой селекции ели // *Лесоведение.* – 1992. – № 2. – С. 11–18.
17. Биотехнология сельскохозяйственных растений // Пер. с англ. В.И. Негрука; предисл. Р.Г. Бутенко. – М.: Агропромиздат, 1987. – 301 с.
18. Ведерников К.Е., Бухарина И.Л., Журавлева А.Н., Загребин Е.А., Красноперова В.В. К вопросу изучения показателей качества семян хвойных растений, произрастающих в городских насаждениях (на примере г. Ижевска) // *Успехи современной науки и образования.* – 2016. – №10. – Т. 7. – С. 113-116.

Поступила в редакцию 20.03.19

После доработки 10.05.19

Принята к публикации 06.06.19