

УДК: 581.412:633.877

Р.М. Турпанова, Д.Я. Исхакова*, Ж.М. Джармуханов, А.М. Гаджимурадова
Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева МОН РК, г. Астана, Казахстан,
*e-mail: dina.iskhakova@mail.ru

Использование тканей и органов взрослых растений хвойных пород для размножения in vitro

В нашей работе были сделаны попытки изучить способность к размножению тканей взрослых растений сосны обыкновенной и ели обыкновенной in vitro в зависимости от возраста первичного экспланта и условий его культивирования.

Ключевые слова: микроклональное размножение, морфогенез, хвойные растения, сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), ель обыкновенная (*Picea abies* L.).

Р.М. Турпанова, Д.Я. Исхакова, Ж.М. Джармуханов, А.М. Гаджимурадова

Қылқан ағаштың in vitro өрбітуіне қолдануға арналған ұлпалары мен тұқымдары

Біздің жұмысымызда бастапқы экспланттың жасы мен өсіру жағдайына байланысты, кәдімгі қарағай мен шырша ұлпаларының in vitro өрбітуі қабілеттілігін байқадық.

Түйін сөздер: микроклоналдық өрбіту, морфогенез, қылқан өсімдіктер, кәдімгі қарағай, кәдімгі шырша.

R.M. Turpanova, D. Iskhakova, Zh. Djarmuhanov, A.M. Gadjimuradova

Use of fabrics and bodies of adult plants of coniferous breeds for in vitro manifolding

In our work attempts to study ability to manifolding of fabrics of adult plants of a pine ordinary were made and ate with ordinary in vitro depending on age of primary eksplant and conditions of his cultivation.

Keywords: microclonal manifolding, morphogenesis, coniferous plants, pine ordinary (*Pinus sylvestris* L.), fir-tree ordinary (*Picea abies* L.).

Методы культуры тканей растений in vitro находят все большее применение в фундаментальных и прикладных исследованиях в области физиологии, генетики, эмбриологии и целом в биологии развития растений.

Культура тканей хвойных растений in vitro может играть важную роль в генетико-селекционных программах лесовосстановления древесных видов, так как репродуктивный потенциал этих видов снижается [1].

Однако, в исследованиях, которые проводятся с культурами органов, тканей и клеток растений in vitro одной из наиболее актуальных проблем является индукция морфогенеза. Особенно остро эта проблема стоит у хвойных растений, поскольку известно, что морфогенетические процессы в условиях in vitro индуцируются у них с большим трудом, характеризуются нестабильностью и трудной воспроизводимостью [2].

В Республике Казахстан работы по клональному микроразмножению посадочного материала хвойных культур малочисленны.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись представители семейства Pinaceae: сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) и ель обыкновенная (*Picea abies* L.), произрастающие в естественных древостоях и в искусственных насаждениях.

В качестве эксплантов, для введения в культуру in vitro были использованы верхушечные и боковые почки, изолированные в период покоя с 2-, 5- и 10-летних растений (январь-апрель), и молодые побеги в период вегетации (май-конец июня), а также сегменты стеблей с хвоей и без нее, срезанных с ветвей в средней части ствола.

В основе исследования была использована методика для размножения древесных и кустарниковых пород в условиях in vitro, разработанная Калашниковой Е.А. [3].

Результаты и их обсуждения

В нашей работе были сделаны попытки изучить способность к размножению тканей взрослых растений сосны обыкновенной и ели

обыкновенной *in vitro* в зависимости от возраста первичного экспланта и условий его культивирования.

Почки взрослых деревьев имели слабый морфогенный потенциал. Максимальное количество образовавшихся адвентивных почек зарегистрировано для почек, взятых с деревьев сосны, и составило в среднем (10%, 2,5% соответственно).

Наибольшее число почек *de novo* образовалось на зрелых зародышах сосны после индукции на среде с 6-БАП в течение четырех недель. При концентрации БАП 13,33 мкМ в 18% случаев происходило формирование 6-7 нормальных по морфологии адвентивных почек на один зародыш.

Таблица 1 - Влияние возраста первичного экспланта на морфогенетический потенциал сосны обыкновенной *in vitro* на среде ГД (наблюдение через 3 месяца после посадки)

Эксплант	Число эксплантов, %		Среднее количество почек на 1 эксплант, шт
	живых	образующих адвентивные почки	
Почки, изолированные с 2-летних семян	50,0 ± 2,8	10,0 ± 0,6	2,5 ± 0,5
Почки, изолированные с 5-летних саженцев	20,0 ± 1,0	2,5 ± 0,1	1,5 ± 0,5
Почки, изолированные с 10-летних деревьев	0	0	0

Таблица 2 - Влияние концентраций БАП на образование адвентивных почек при культивировании зародышей сосны обыкновенной в условиях *in vitro*

Концентрация, мкМ (мг/л)	Число зародышей, %		Среднее число почек на 1 зародыш, шт
	Имеющие зеленые семядоли	Образующих адвентивные почки	
0,44 (0,1)	98,0 ± 8,33	3,4 ± 0,24	1,2 ± 0,07
4,44 (1,0)	100	12,0 ± 0,88	5,0 ± 0,24
13,33 (3,0)	97,2 ± 4,76	18,0 ± 1,30	6,7 ± 0,41
22,20 (5,0)	65,8 ± 6,52	15,4 ± 1,38	7,5 ± 0,15
44,44 (10,0)	51,4 ± 3,08	8,8 ± 0,44	8,0 ± 0,36
88,88 (20,0)	17,5 ± 1,55	7,5 ± 0,36	8,0 ± 0,24

Увеличение концентрации БАП от 22,22 до 88,88 мкМ приводило к снижению жизнеспособности зародышей с одновременным уменьшением процента зародышей, способных образовывать адвентивные почки. Хотя в этих вариантах среднее число почек на один эксплант достигало самого высокого показателя (7,5-8,0 шт.). У ели на зрелых зародышах адвентивные почки индуцировали на среде с зеатином в концентрации 9,10 мкМ (2 мг/л), однако количество образовавшихся адвентивных почек было невысоким и составляло всего 10%. Увеличение концентрации зеатина до 22,75 мкМ (5 мг/л) приводило к увеличению среднего числа почек, образовавшихся на одном

зародыше (8-9 шт.). При культивировании на той же самой среде в течение последующих 2 недель эти почки либо постепенно обрастали каллусом, либо наблюдалось образование некротических участков. Повышение концентрации ИУК в среде до 5,7 мкМ (1 мг/л) было не эффективно в увеличении числа зародышей, способных к прямой регенерации адвентивных почек.

Образование адвентивных почек на изолированной одиночной хвое проростков сосны было отмечено при культивировании их на модифицированной питательной среде ГД, содержащей БАП в концентрации 13,33 мкМ в сочетании с ИУК 2,85 мкМ. При этом в 42% случаев наблюдалась дифференциация

адвентивных почек непосредственно в тканях экспланта. Однако рост, сформировавшихся почек, был замедлен, и нам не удалось получить из них хорошо растущие побеги, способных к укоренению. В ходе изучения способности каллусных тканей ели к

регенерации на протяжении ряда субкультивирований на средах с сахарозой в низкой концентрации (0,5-1%) в 63,0 % случаев происходило образование адвентивных почек и дальнейшее их развитие в побеги.

Таблица 3 – Влияние концентраций сахарозы на жизнеспособность каллусной ткани и образование адвентивных почек

N пассажа	Концентрация сахарозы, %			Жизнеспособность трансплантов, %			Образование адвентивных почек, %		
	1*	2*	3*	1	2	3	1	2	3
0	0,5	3	0,5	85,0	57,5	85,0	50,0	19,5	50,0
1	1	2	2	83,3	50,0	60,0	70,0	10,5	60,0
2	1	2	0,5	82,0	40,0	58,7	68,0	8,7	52,2
3	1	2	2	80,0	18,0	46,7	67,7	0	48,3
4	1	2	0,5	80,0	0	45,1	63,0	0	33,4

Примечание: *1, 2, 3 – номера вариантов (по концентрации сахарозы)

Чередование низкой (0,5%) и высокой (2%) концентраций сахарозы позволило получить в 33,4% случаев образование адвентивных почек, которые развивались в побеги, способные к укоренению [4]. С повышением концентрации

сахарозы до (2-3%) образование адвентивных почек практически не происходило, и к четвертому пассажиру наблюдалась гибель всех эксплантов.

Литература

- 1 Третьякова, И.Н. Семенная продуктивность макростробилов и качество семян у пихты сибирской в нарушенных лесных экосистемах гор Южной Сибири / И.Н. Третьякова, Е.В. Бажина // Экология. - 1996. - № 6. - С. 430-436.
- 2 Третьякова, И.Н. Сохранение генофондов хвойных видов Сибири при помощи соматического эмбриогенеза in vitro – современного метода биотехнологии / И.Н. Третьякова, И.Н. Барсукова // Хвойные бореальной зоны. - 2010. - XXVII. - № 1-2. – С. 203-205.
- 3 Калашникова Е.А., Родин А.Р. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов клеточной и геномной инженерии: учеб. пособие. Изд. 2, испр. и доп. М.: МГУЛ, 2001. 73 с.
- 4 Родина Е.А. Экспериментальный морфогенез в культуре тканей хвойных пород (*Pinus sylvestris* и *Picea abies*): автореф. дис. канд. биол. наук. М., 1989. 22 с.