

Н. М. Пивень, Г. Г. Мельничук, А. С. Фелалнев

**ИНДУЦИРОВАННЫЙ МОРФОГЕНЕЗ
ОРЕХА ГРЕЦКОГО IN VITRO**

Исследовали способность к морфогенезу *in vitro* апикальных и латеральных почек из деревьев 15—30- и 1—3-летнего возраста ореха грецкого. Формирование адвентивных побегов индуцировали на среде МС с ИМК (0,01 мг/л) и 6-БАП (1 мг/л) спустя 12 недель культивирования, включая два субкультивирования через 2 и 6 недель. Побеги, полученные в культуре *in vitro*, выдерживали в жидкой среде МС с ИМК (1; 5; 10 мг/л) и сахарозой (60 г/л) в течение 6 сут в темноте. Укореняли побеги ореха грецкого на безгормональной среде, макроэлементы которой разбавляли в 4 раза, с агаром.

Введение. Исследование проведено на ценной сельскохозяйственной орехоплодной культуре — орехе грецком (*Juglans regia* L.) и посвящено физиологическим аспектам морфогенеза *in vitro*. Следует отметить, что для ореха грецкого, как и других гетерозиготных растений, единственным способом поддержания сортовых особенностей пока остается вегетативное размножение. Несмотря на то, что подобные способы описаны ранее [1] и в дальнейшем предпринимались попытки их совершенствования [2, 3], проблема эффективности вегетативного размножения остается пока нерешенной из-за низкого выхода привитых саженцев. Для целого ряда древесных культур, которые, как и орех грецкий, относятся к трудноразмножаемым видам, применение методов микроклонирования *in vitro* может привести к хорошим результатам [4, 5]. Такие исследования были начаты и по отношению к орехоплодным культурам [6—8], в том числе и ореху грецкому [9—11]. В частности, показано, что из незрелых зародышей или их частей можно индуцировать развитие эмбрионов *in vitro* [10, 12]. Известны отдельные работы и по использованию меристемных тканей ореха грецкого для микроклонирования *in vitro* [9], однако практически значимых данных получено не было. Поэтому в настоящей работе предпринят широкий экспериментальный поиск по изучению факторов, влияющих на индуцированный морфогенез ореха грецкого *in vitro*, с целью отработки отдельных стадий микроклонального размножения.

Материалы и методы. В качестве эксплантатов использовали верхушечные (5—7 мм) и боковые (2—3 мм) почки ореха грецкого (*Juglans regia* L.) с деревьев 15—30-летнего возраста интродуцированных сортов и форм из коллекционного сада Ие-та ботаники им. Н. Г. Холодного АН УССР, а также 1—3-летних сеянцев и саженцев. Почки стерилизовали 10 с (в случае травянистых) и 60 с (в случае деревянистых) побегов в 70 %-ном растворе этанола и 6—7 мин — в диациде. Эксплантаты культивировали на питательной среде, содержащей макро- и микроэлементы по Вуду [8] или Мурасиге — Скуга (МС) [13]. Макроэлементы последней разбавляли в 4 раза в первую и в 2 раза — во вторую неделю выращивания. В дальнейшем минеральные компоненты среды МС использовали без изменений. Начиная со второй недели культивирования в питательную среду добавляли фитогормоны: 3-индолилмасляную кислоту (ИМК, 0,01—0,02 мг/л) и 6-бензиламинопурин (БАП, 1 мг/л). Добавочные побеги получали на аналогичной по составу среде. На протяжении первой недели эксплантаты выдерживали в темноте при температуре 26 ± 3 °С. После перенесения на свежую среду (вторая неделя культивирования) их оставляли при освещении 150—200 лк и 16-ч фотопериоде. В дальнейшем освещение увеличивали до 500 лк. Укореняли побеги длиной 2—3 см, которые культивировали в темноте при температуре 26 ± 3 °С на жидкой среде МС с разбавлением в 4 раза макроэлементов и добавлением ИМК (1,0; 5,0; 10 мг/л) и 60 г/л сахарозы. Через неделю побеги переносили на аналогичную по составу среду без ИМК, уменьшали количество сахарозы до 30 г/л,

© Н. М. Пивень, Г. Г. Мельничук, А. С. Фелалнев, 1991.

добавляли агар (7 г/л) и переносили в условия освещения с 16-ч фото-периодом. В качестве контроля использовали побеги, выращиваемые на среде с полным составом макросолей.

Результаты и обсуждение. При культивировании эксплантатов ореха грецкого наблюдали потемнение ткани и питательной среды, что чаще всего происходило в первые три недели выращивания и прежде всего у травянистых побегов в летний период. Потемнение эксплантатов ореха грецкого *in vitro* является одним из препятствий при разработке методики микроразмножения этой ценной породы древесных растений [9]. Наличие этого феномена у ореха связывают с присутствием фенольных соединений в тканях, которое специфично для различных фаз развития растения и, как было показано, может служить биохимическим маркером его физиологического состояния [14].

Содержание фенольных соединений в тканях ореха грецкого деревьев 15—30-летнего возраста в течение года несколько выше, чем в 1—3-летних сеянцах и саженцах [15]. Причем нами были отмечены различия при культивировании эксплантатов ореха грецкого в зависимости от генотипа формы, возраста деревьев и сезона года (табл. 1). Так, к концу первой недели культивирования все эксплантаты формы Киевская XIV-II увеличивались в размере, тогда как у сорта Владимирский скороплодный развитие наблюдали у 22,5 % эксплантируемых почек, у остальных форм — еще меньше. Различия в развитии эксплантатов в зависимости от генотипа формы сохранялись и в дальнейшем (см. табл. 1). В течение 11 недель культивирования почки распускались, но интенсивного роста побегов не наблюдали. Впоследствии эти эксплантаты темнели и погибали. Однако делать вывод о полной непригодности эксплантатов из 15—30-летних деревьев ореха грецкого, по-видимому, преждевременно.

Таблица 1

Развитие эксплантатов из деревьев ореха грецкого *in vitro* в зависимости от генотипа, возраста и сезона года

Сорт, форма	Возраст, годы	Дата	Развившиеся эксплантаты, %	
			1 неделя	2 недели
Форма Киевская XIV-II	15	26.11.86	—	100
»	»	01.12.86	100,0	—
Владимирский скороплодный	»	11.12.86	22,5	39,9
Владимирский красавец	»	23.12.86	7,7	83,3
»	»	28.01.87	0	77,7
Д-17 а	»	23.12.86	8,8	83,3
Форма Киевская З.1.4	30	24.11.86	—	100,0
»	»	12.05.87	0	100,0
»	»	24.02.88	0	28,6

Как известно, при микроразмножении орехоплодных культур обычно используют в качестве эксплантатов ювенильные ткани [6, 7]. Нами также получены положительные результаты при введении в культуру *in vitro* эксплантатов из 1—3-летних сеянцев и саженцев как из травянистых (летний период), так и деревянистых побегов (зимний период). В табл. 2 приведена последовательность стадий микроклонального размножения ореха грецкого, которой придерживались в ходе эксперимента.

Как видно из рис. 1, где приведены данные по морфогенезу почек ореха грецкого *in vitro* (а, б — развитие почек через 2 недели культивирования; в — образование побега через 4 недели культивирования; г — формирование адвентивных побегов через 12 недель культивирования), апикальные почки 1—3-летних сеянцев и саженцев увеличивались в размерах, через две недели культивирования появились первые листья.

К концу четвертой недели побеги достигали высоты 1—1,5 см, к концу пятой — 2—3 см, к концу десятой — 6—7 см. Развитие латеральных почек происходило медленнее, чем апикальных. Появление побегов как из апикальных, так и из латеральных почек наблюдали только через четыре недели культивирования (см. рис. 1, в). Продуцирование добавочных побегов на основании эксплантата происходило на питательной среде МС спустя 12 недель культивирования (см. рис. 1, г). Обычно

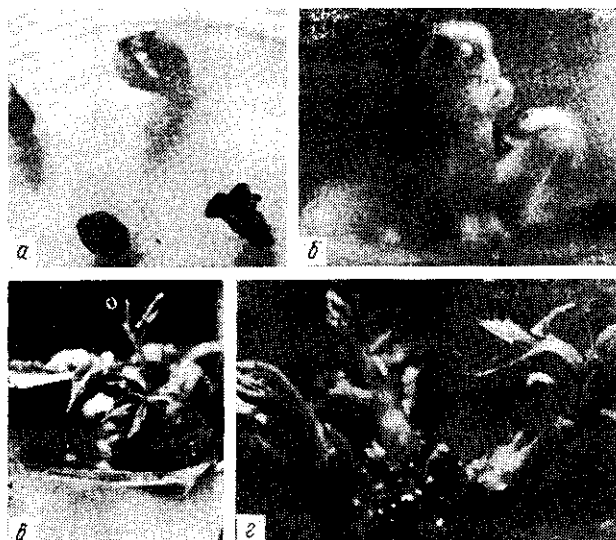


Рис. 1

получали 2—3 побега на эксплантат. Наряду с этими побегами развивался главный стебель, у которого закладывались латеральные почки. При черенковании главного стебля способность к органогенезу прогрессивно уменьшалась у микрочеренков, изолированных по направлению от верхушки к основанию стебля.

Выращивание эксплантатов из 1—3-летних семян и саженцев в летний период также сопровождалось потемнением тканей. Как известно, Лио и Ган [9] для предотвращения потемнения тканей ореха грецкого при введении в культуру *in vitro* предварительно обрабатывали эксплантаты антиоксидантами или вводили их в питательную среду. Мы также обрабатывали эксплантаты антиоксидантами (лимонной и аскорбиновой кислотами) и добавляли в среду активированный уголь, поливинилпирролидон и поликапролактан, при этом потем-

Таблица 2

Микроклональное размножение почек ореха грецкого *in vitro*

Стадия	Среда, ростовые регуляторы	Длительность
Развитие почки <i>in vitro</i> после инокуляции	ИМК (0,01 мг/л), БАП (1 мг/л)	4 недели
Формирование добавочных побегов на основании эксплантата и первая генерация побегов	То же	8 недель
Индукция адвентивных почек и побегов на побегах второй генерации	»	6 недель с промежуточной пересадкой через 3 недели
Предобработка побегов для индукции корнеобразования	ИМК (10 мг/л)	5—7 сут
Укоренение	Безгормональная среда	1—8 недель

нение существенно не уменьшалось. Оказалось, что потемнение и некроз тканей уменьшаются при использовании в качестве эксплантатов почек из этиолированных побегов, содержащих в четыре раза меньше фенолов по сравнению с зелеными. При этиолировании 3-летних саженцев удалось повысить выход жизнеспособных эксплантатов до 20 % (табл. 3). Выход развившихся побегов при этом через 12 недель культивирования увеличивался в 3—4 раза.

Следующей проблемой, характерной для большинства трудноразмножаемых видов древесных растений, в том числе и ореха грецкого, является укоренение побегов. Однако сведения об индукции корнеоб-



Рис. 2

разования в литературе приведены только относительно двух гибридов ореха грецкого с дикими формами: китайским [6] и черным [7]. Применяли двухэтапное укоренение, при котором побеги ореха в течение 5—7 сут выдерживали первоначально в темноте на среде МС с разбавлением в 4 раза макросолей и 10 мг/л ИМК, а затем переносили на безгормональную среду и выращивали на свету (рис. 2: регенерация корней у побегов ореха грецкого, полученных *in vitro*, после недели (а) и 4 недель (б) культивирования на безгормональной среде). Через неделю культивирования на безгормональной среде у 10 % побегов формировались корни. Через 8 недель корни появились у 60—70 % побегов. В контрольном варианте образования корней не наблюдали.

Таким образом, показана способность эксплантатов из травянистых и древесных побегов 1—3-летних сеянцев и саженцев ореха грецкого к морфогенезу *in vitro* на среде МС. Обнаружено благоприятное воздействие этиоляции на растения, что способствовало увеличению в 3—4 раза по сравнению с контролем выхода побегов из исходных эксплантатов. Для укоренения побегов, полученных *in vitro*, подобраны специфические условия, которые заключаются в предварительном вы-

Таблица 3
Развитие почек *in vitro* из этиолированных и зеленых побегов

Срок культивирования, недели	Развитие эксплантатов из побегов, %		Срок культивирования, недели	Развитие эксплантатов из побегов, %	
	Этиолированных	Зеленых		Этиолированных	Зеленых
1	100,0	99,8	4	90,8	88,0
2	99,4	98,0	12	20,0	5,8
3	99,0	90,0			

держивании побегов на среде с ауксинами и последующем культивировании их на безгормональной среде.

Отработаны приемы получения развивающихся эксплантатов, индукции адвентивного побегообразования и укоренения побегов, которые могут быть в дальнейшем использованы для создания технологий микрореклонального размножения и экспериментов по клеточной и генетической инженерии ореха.

Резюме

Досліджували здатність до морфогенезу *in vitro* апікальних і латеральних бруньок із дерев 15—30- та 1—3-літнього віку горіха волоського. Формування адвентивних пагонів індукували на середовищі МС з ІМК (0,01 мг/л) та 6-БАП (1 мг/л) через 12 тижнів культивування, включаючи два субкультивування через 2 і 6 тижнів. Пагони, отримані в культурі *in vitro*, видержували в рідкому середовищі МС з ІМК (1; 5; 10 мг/л) та сахарозою (60 г/л) на протязі 6 діб в темряві. Вкорінляли пагони горіха волоського на безгормональному середовищі, макроелементи якого розбавляли в 4 рази, з агаром.

Summary

The ability of apical axillary buds of 15—30 and 1—3 years old walnut trees to morphogenesis *in vitro* was studied. Adventitious shoot formation was induced on MS-media containing IBA (0,01 mg/l) and 6-BAP (1 mg/l) after 12 weeks of cultivation (including two subcultivations after 2 and 6 weeks). Propagated shoots were pretreated in liquid MS-medium with IBA (1; 5; 10 mg/l) and sucrose (60 g/l) during 6 days in dark. Rooting of the walnut shoots was achieved on hormone free MS-medium (macro-salts were dissolved 1/4) with agar.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рыбин В. А. Способы вегетативного размножения грецкого ореха.— Кишинев: Штиинца, 1961.— 29 с.
2. Дуркан И. П. Выращивание привитого посадочного материала грецкого ореха в Молдавии // Достижения в плодовом питомниководстве НРБ и МССР.— Кишинев: Картя Молдовеняске,— 1978.— С. 208—213.
3. Стрела Т. Е. Новая биотехнология прививки ореха грецкого.— Киев: Наук. думка, 1987.— 59 с.
4. Chalupa V. Vegetativni mnozeni brizy (*Betula pendula* Roth.), dubu (*Quercus robur* L.) a jasanu (*Fraxinus excelsior* L.) *in vitro* // Pr. vulhm.— 1983.— N 62.— P. 179—194.
5. Pua Eng-Chong, Chong Calvin. Regulation of *in vitro* shoot and root regeneration in Macspur apple by sorbitol (D-glucitol) and related carbon sources // J. Amer. Soc. Hort. Sci.— 1985.— 110, N 5.— P. 705—709.
6. Driver J. A., Kuniyuki A. H. *In vitro* propagation of Paradox wal nut rootstock // Hort. Sci.— 1984.— 19, N 4.— P. 507—509.
7. Meynier V. Mise en culture *in vitro* de meristeme de *Noyers* hybrides // C. r. Acad. Sci. C.— 1985.— 301, N 5.— P. 261—264.
8. Wood B. W. *In vitro* proliferation of pecan // Hort. Sci.— 1982.— 17, N 6.— P. 890—891.
9. Liu S., Han B. *In vitro* propagation of walnut (*Juglans regia* L.) // Acta Agr. Univ. Pekinesis.— 1986.— 12, N 2.— P. 143—148.
10. Tulecke W., McGranahan G. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cotyledons of walnut, *Juglans regia* L. // Plant Sci.— 1985.— 40, N 1.— P. 57—63.
11. Фелалиев А. С. Морфогенез *Juglans regia in vitro* // Укр. бот. журн.— 1990.— 47, № 3.— С. 85—87.
12. Болтвицев В. С., Пивень Н. М. Индуцированный эмбриогенез в культуре ткани ореха грецкого // Физиология и биохимия культ. растений.— 1990.— 22, № 4.— С. 409—413.
13. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Physiol. Plant.— 1962.— 15, N 2/3.— P. 473—497.
14. Jay-Allemand C., Cornu D., Macheix J. J. Caracterisation du rajeunissement du *Noyer* (*Juglans sp.*) par une etude spectrophotometrique globale du contenu polypeptidique // Ann. Sci. For.— 1987.— 44, N 3.— P. 303—314.
15. Фелалиев А. С. Физиологические основы микрореклонального размножения ореха грецкого *in vitro*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Душанбе, 1990.— 20 с.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,
Киев

Получено 14.01.91