

11. Білінська О.В. Підвищення ефективності експериментального андрогенезу *in vitro* у ячменю шляхом оптимізації попередньої обробки колосся в умовах низької позитивної температури // Фактори експериментальної еволюції організмів. – т. 3. – К.: Логос, 2006. – С. 437 – 441.

Белинская Е.В., Дульнев П.Г. Модифицированный крахмал как компонент питательной среды для получения гаплоидов ячменя в культуре пыльников *in vitro* // Физиология и биохимия культурных растений. – 2007.– т. 39, № 2. – С. 136–143.

Резюме

Проведено оцінку мінливості показників гаплопродукції в залежності від умов вирощування рослин-донорів пиляків, режиму і способу попередньої обробки колосся та складу штучного живильного середовища. Збереження рангів залучених до експерименту генотипів за здатністю до андрогенезу *in vitro* свідчить про суттєвість генетичної складової у загальній мінливості і актуальність поглибленого вивчення механізму генетичного контролю ознак культурабельності.

Проведена оценка изменчивости показателей гаплопродукции в зависимости от условий выращивания растений-доноров пыльников, режима и способа предобработки колосьев и состава искусственной питательной среды. Сохранение рангов включенных в эксперимент генотипов по способности к андрогенезу *in vitro* свидетельствует о существенности генетической составляющей в общей изменчивости и актуальности изучения механизма генетического контроля культурабельности.

Evaluation of haploid production indicator variability caused by donor plant growth conditions, the regime and the mode of spike pretreatment and the nutrient medium composition has been carried out. Maintained ranks of genotypes including into the experiment show the importance of the genetic component in the whole variability and actuality of a profound investigation on the mechanism of a culturability genetic control

БЛАГОДАРОВА Т.А.¹, СИВОЛАПОВ А.И.², СИВОЛАПОВ В. А.²

¹ФГУП НИИ лесной генетики и селекции, Воронеж, Россия,
Россия, 394087, Воронеж, ул. Ломоносова, 105, e-mail: mail@lesgen.vrn.ru

²Воронежская государственная лесотехническая академия,
Россия, 394613, Воронеж, ул. Тимирязева, 8, e-mail: leskul@vglta.vrn.ru

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ *IN VITRO* В ЛЕСОКУЛЬТУРНОЙ ПРАКТИКЕ БЫСТРОРАСТУЩИХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД

В настоящее время наряду с традиционными приемами для воспроизводства ценных форм и сортов лесных древесных растений используют метод культуры изолированных органов и тканей (клональное микроразмножение растений). К преимуществам этого метода относятся: быстрота, исключение вирусных заболеваний, потребность в малом количестве инициальных эксплантов и ограниченных площадях, возможность круглогодичного продуцирования посадочного материала, продолжительная его сохранность при минимальных объемах холодильных камер, продуцирование многих тысяч посадочного материала в год [1].

Массовое воспроизводство генетически улучшенных форм древесных растений с помощью культуры тканей способствует повышению качественного состава лесонасаждений за счет получения клоновых растений, устойчивых к болезням и вредителям, стрессовым и техногенным факторам [2], ускоряет воспроизводство лесных ресурсов (позволяет получать генетически улучшенный материал на 10 – 16 лет раньше, чем при обычных условиях) [3].

Положительные результаты по клональному микроразмножению взрослых деревьев получены для некоторых видов тополя, осины, березы, вяза, туи, эвкалипта, ивы и др. пород, у которых хорошо выражена регенерационная способность. У этих пород в культуре *in vitro* удалось увеличить коэффициент микроразмножения до 10^5 – 10^7 растений в год, что в несколько тысяч раз больше, чем при использовании традиционных методов вегетативного размножения. Использование метода культуры тканей позволяет с достаточной эффективностью проводить микроклональное размножение березы, ольхи и тополя [4 - 13].

В последние годы особую значимость приобретают плантационные культуры березы, ольхи и тополя с коротким периодом ротации на получение мелкотоварной древесины для целей прессования и получения целлюлозы, в связи с высокой эффективностью ее использования.

В лаборатории генетики НИИЛГиС впервые в Центрально-Черноземном районе начаты исследования по микроклональному размножению ольхи черной и серой, тополя сереющего и березы.

Материалы и методы

Материалы исследований – быстрорастущие древесные породы средней полосы России: ольха черная (*Alnus glutinosa* (L.) gaertn.), ольха серая (*Alnus incana* (L.) moench), *Betula verrucosa* (Ehrh.) and *Betula verrucosa* f. *carelica* hort., *Populus canescens* (Sm.).

Методика исследований. Наряду с прямой регенерацией побега из почки, опробировали способ получения регенерантов из каллусных культур.

В первом случае экспериментами явились сегменты с одной почкой на стадии зеленого конуса.

Для каллусных культур ольхи и березы эксплантами служили стеблевые сегменты без почек, листья, листовые черешки.

В качестве базовых сред использовали MS и WPM [4] и их модификации с различным содержанием и соотношением регуляторов роста (6-БАП, ИУК, НУК, ИМК). При прямой регенерации использовали 6-БАП (0,2-1,5 мг/л), индукции множества почек и побегов – 6-БАП в сочетании с НУК (0,2-0,5 мг/л).

Для микроклонального размножения березы использованы: мелкоромбовидно-трещиноватая форма березы повислой воронежского происхождения, продольно-трещиноватая форма березы повислой киевского происхождения и высокоствольная форма березы карельской.

Проведено также микроклональное размножение трудноукореняемых новых сортов тополя сереющего: Хоперский 1 и Приярский 1. Эти тополя характеризуются выраженным гетерозисом по продуктивности и качеству древесины.

Специальные эксперименты проделаны со всем регенерированным материалом ольхи и березы с целью усиления эффекта укоренения. Они предусматривали предобработку раствором ИМК (0,2-0,5 мг/л) в течение 5 минут базального (бокового) конца побега или апикального (АК). Контрольными были побеги без предобработки, питательные среды в этом случае использовали без добавления ИМК. (Исследования показали, что ИМК в среде, увеличивала количество укорененных побегов, резко снижала качество укоренения).

Адаптация регенерантов проводилась в микротеплицах и открытом грунте. технологии микроклонального размножения изучаемых древесных пород (ольхи, березы и тополя) отличаются.

Результаты и обсуждение

Успешное развитие регенерантов ольхи говорит о возможности массового получения посадочного материала.

Исследования проведены в 2-х направлениях – оптимизация условий микроклонального размножения ольхи *in vitro* и определение подходов к созданию системы

методов регенерации ольхи на основе культуры *in vitro* различных эксплантов (помимо почек, стеблевых сегментов, листьев, черенков).

Процессы регенерации в сравнительном плане у эксплантов разных органов ольхи на данный момент мало изучены. Нами исследовано проявление способности каллусогенеза сегментов стеблей, черешков листьев, листьев.

Способность к регенерации каллуса наиболее выражена у стеблевых сегментов, наименее (вплоть до полного отсутствия ткани) у листьев. Из ряда испытанных регуляторов роста, традиционно используемых для индукции каллуса [4] (2,4Д, НУК, ИУК, МК) на темп и интенсивность этого процесса у ольхи заметно влияет ИМК (2 мг/л). Концентрация определена экспериментальным путем: для черешков она явилась стимулирующей, тогда как стеблевые сегменты образуют каллус и при более низком содержании ИМК (0,5 мг/л) в среде. Листья во всех вариантах имели низкие показатели каллусообразования.

Морфогенные культуры получены с помощью аналогичных сред, дополненных 6-БАП. Уменьшением содержания 6-БАП до 0,6 мг/л добивались индукции побегов у ольхи черной, почек и корней – у ольхи серой. Следует отметить, что регенеранты получены в культурах стеблевого происхождения. В случае черешков и листьев отмечены начальные этапы морфогенеза (зеленые меристематические очаги, корни, единичные почки). Эти данные позволили провести сравнительный анализ эффективности морфогенеза у культур различного происхождения: а – каллусных, б – вегетативных почек в зависимости от содержания БАП в среде WPM.

При общей тенденции к небольшим концентрациям 6-БАП (opt_{im}=0,6 мг/л) отмечены более низкие морфогенетические возможности каллусных культур (40% по сравнению с 70% у черной ольхи и 8,3% по сравнению с 41% - у серой). Однако по морфологическим показателям регенерируемые побеги не отличались друг от друга у обеих форм ольхи. Продолжительность жизни морфогенных культур ольхи по сравнению с другими листовыми (тополь, береза) значительно ниже и ограничена 2-3 неделями.

Для их сохранения необходимо повторное рекультивирование. В противном случае независимо от происхождения, в культурах отмечен интенсивный рост каллусной ткани, как правило, подавляющий развитие побега.

Хороший рост, приживаемость, а также сохранность к концу вегетационного периода регенерантов различного происхождения (каллусные культуры, узловыи сегменты) показывает достаточно высокую степень их жизнеспособности и возможности успешной адаптации в открытом грунте.

Для микроклонального размножения березы достаточно эффективным было сочетание следующих способов: активация развития основного (первичного) побега из пазушной почки или индукция дополнительных адвентивных почек с последующим их черенкованием, а также мультипликации вновь образовавшихся на этих черенках пазушных побегов и целых растений.

Использование данного способа позволило существенно увеличить выход растений-регенерантов березы из ограниченного количества исходных эксплантов.

Выявлены факторы, способствующие увеличению количества индуцированных побегов от одного экспланта березы и их эффективному росту, что в дальнейшем определило многочисленность клона и его жизнеспособность.

Из трех испытанных питательных сред (различающихся соляным и гормональным составом) лучшей средой для первичного культивирования эксплантов березы воронежского происхождения и березы карельской была среда Буле с БАП 0,5 мг/л и ИУК 0,5 мг/л; для березы киевского происхождения – 1/2 питательной среды Мурасиге и Скуга с БАП (0,5 – 1 мг/л).

После доращивания и адаптации в теплице саженцы-регенеранты березы, ольхи и тополя использовали для закладки плантационных культур. Весной 1996 года в

квартале 26 Конь-Колодезного лесничества заложены испытательные культуры регенерантами березы повислой воронежского и киевского происхождения а также березы карельской. Впервые в ЦЧР заложены испытательные культуры регенерантами тополя Хоперский 1 и черенками триплоидного тополя бальзамического, полученного Е.М. Гуляевой в НИИ лесной генетики и селекции. Культуры созданы редкой посадкой (3 × 6 м) по раскорчеванной вырубке, в лесорастительных условиях С₂ - С₃. Почвы - серые лесные супесчаные. Учет состояния (жизнеспособности) показал, что все растения – регенеранты, черенковые саженцы и сеянцы хорошего состояния.

Выводы

Показана возможность создания системы методов регенерации ольхи, березы и тополя сереющего на основе культуры *in vitro* различных эксплантов (узловых сегментов, каллусных культур стеблевых сегментов, листьев, черешков).

Определены условия дорастивания регенерируемого материала для успешного его перевода в открытый грунт.

Положительные результаты анализа динамики и степени развития регенерантов в открытом грунте в течение десяти лет подтверждают перспективность метода культуры ткани как для массового воспроизводства, так и для сохранения ценного генофонда лесных древесных растений.

Опыт создания культур ольхи, березы и тополя регенерантами, полученными *in vitro* в Центральном-Черноземном районе России, показал возможность размножения и создания плантационных культур.

Литература

1. *Biondi S.* Practical applications of *in vitro* propagation: present situation and future prospects // *G. Bot. ital.* – 1986. - 120. - № 1 – 6 – P. 29 – 42.
2. *Rutledge G. B.* Culture of meristeme tips and microsporogation of 12 commercial clones of poplars *in vitro* / *G. B. Rutledge, G.C. Douglas* // *Physiol. plant.* – 1988. – 72. - № 2. – P. 367 – 373.
3. *Sadiq Hasnain* . Tissue culture in forestry: economic and genetic potential / *H. Sadiq. C. William* // *Forest. Chron.* – 1986. – 62. - № 4. – P. 219 – 225.
4. *Ryyänen L.* Propagation of adult curlybirch succeeds with tissue culture / *L. Ryyänen, M. Ruynanen* // *Silvae fenn.* – 1986. – 20. - № 2. – P. 139 – 147.
5. *Бутова Г.М.* Способ микроклонального размножения карельской березы / *Г.М. Бутова, Т.М. Табацкая, Л.Л. Скробова* // *Авт. св. 1597386 СССР, МКИ, 12, опубл. 7.10.90. Бюл. № 37.*
6. *Chalupa V.* Micropropagation of malure trees of Birch (*Betula pendula*) and aspen (*Populus tremula*) // *Lesnictvi.* – 1989. – 3. - № 11. – P. 983 – 993.
7. *Старова Н.В.* Культура изолированных почек и микроразмножение лесных древесных растений / *Н.В. Старова, Р.К. Бомбурина, З.Х. Хайрулина* // *Лесная генетика, селекция и физиология древесных растений.* – М., 1989. – С.165 – 167.
8. *Попов В.К.* Регенеранты березы и тополя, полученные *in vitro* в плантационных культурах под Воронежем / *В.К. Попов, Т.М. Табацкая, А.И. Сиволапов* // *Биотехнология в ФЦП «Интеграция»: тез. докл. заочной н.-практ. конф.* – С.-Пб., 1999. – С. 36 – 37.
9. *Sbay M., Guillot I., Danthu P., Prat D.* *In vitro* propagation of interspecific hybrids in alnus // *Ann. Sci forest.* - 1989. - 46. - p. 155-157.
10. *Viera-Aarnio, Ruynanen L.* Growth, crown structure and seed production of birch seedlings, grafts and micropropagated plants // *Silvae Fennica.* - 1995. - V. 29, №1.- p.3-12.
11. *Яцына А.А., Концевая И.И.* Перспективы использования методов культуры клеток и тканей в селекции лесных древесных растений // *Лесная наука на рубеже 21 века.* - Гомель, 1997. - Вып. 49. - с. 127-130.
12. *Табацкая Т.М., Благодарова Т.А., Сиволапов А.И.* Микроклональное размножение ольхи черной и серой. Санкт-Петербург.-1999.- С. 39 - 40.

13. Сиволапов В.А. Получение регенерантов *in vitro* березы для создания лесных культур / В.А. Сиволапов, Т.М. Табацкая, А.И. Сиволапов, А.И. Чернодубов // Восстановление эколого-ресурсного потенциала агролесобиоценозов, лесоразведение и рациональное природопользование в Центральной лесостепи и юге России: сб. науч.-исслед. работ / под ред. авторов; ГОУ ВПО «ВГЛТА», 2007. – С. 157-160.

Резюме

Показаны результаты использования биотехнологии *in vitro* для размножения ценных форм ольхи черной и серой, березы повислой и карельской, тополя сереющего. Получены регенеранты, проведена адаптация в открытом грунте, созданы культуры тополя, ольхи и березы в лесхозах Воронежской области

There were shown the results of the use of *in vitro* biotechnology for the propagation of valuable forms of *Alnus glutinosa* and *Alnus incana*, *Betula verrucosa* and *Betula verrucosa f. carelica*, *Populus canescens*. There were received regenerates, carried out adaptation in field conditions, established same cultures of alna, betula and poplar in the forest rangers of Voronech region.

БУГАРА А.М., ЮРКОВА И.Н., ТЕПЛИЦКАЯ Л.М., БУГАРА И.А., ПАНОВ Д.А.
Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, Украина АР Крым,
95007, г. Симферополь, просп. Вернадского 4
e-mail: nanasilver@rambler.ru

ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ФАТСИИ ЯПОНСКОЙ (*FATSIA JAPONICA* DECHE. ET PLANCH) И АНАЛИЗ В НИХ ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ

Растения способны синтезировать и накапливать различные вещества вторичного метаболизма, многие из которых представляют интерес для фармакологии. В качестве источников лекарственного сырья используются, как правило, дикорастущие виды. Плантационное выращивание лекарственных растений, содержащих вторичные метаболиты, далеко не всегда дает положительные результаты. При плантационном выращивании может значительно снижаться содержание вторичных метаболитов, а многие растения тропической и субтропической флоры практически не возможно выращивать вне этих климатических зон [1].

Фармацевтическая промышленность может рентабельно использовать вторичные метаболиты, которые синтезируются и накапливаются в клетках культивируемых *in vitro*. Использование клеточных культур для получения вторичных метаболитов имеет ряд преимуществ. Они базируются на возможности получения и использования экологически чистого сырья, управления процессом биосинтеза, создания клеточных культур сверхпродуцентов, накапливающих вторичные метаболиты в значительно больших количествах, чем интактные растения [1,2].

Фатсия японская (*Fatsia japonica* Deche. et Planch) – ценное лекарственное растение, которое содержит целый ряд биологически активных веществ: тритерпеновые гликозиды, протокатехиновую кислоту, холин, танины, эфирное масло и др. Это растение издавна используется в народной медицине как тонизирующее средство и анальгетик при болях в суставах, ревматизме и гастрите. На основе растительной массы фатсии выпускается лекарственный препарат "Фатцифлогин", обладающий противовоспалительным действием. Фатсия японская не выращивается как плантационное растение. В этой связи представляет интерес получение клеточных культур данного вида, как потенциального источника сырья для получения биологически активных веществ.