

ГЕНЕРАЦИЯ *IN VITRO* КУЛЬТУРЫ *CHAENOMELES JAPONICA* (THUNB.) LINDL. EX SPACH

В.Д. Харькова

Белорусский государственный университет, г. Минск;

bio.harkova@bsu.by;

науч.рук. – А. Ю. Шашко

Древесные растения являются важной частью человеческого существования. Большое количество деревьев и кустарников являются востребованными культурными, декоративными, лесообразующими растениями. Микрклональное размножение может стать способом значительно повысить пул доступных для высадки деревьев, при этом требуется значительно меньше места, чем при классических способах размножения. В настоящей работе целью является генерация культуры *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach *in vitro*. В ходе исследования наилучшие результаты показало введение в культуру молодых проростков айвы японской на среду Мурашиге и Скуга с добавлением 5 мг/л 6-бензиламинопурина.

Ключевые слова: культура *in vitro*, *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach, микрклональное размножение, биотехнология растений.

ВВЕДЕНИЕ

Микрклональное размножение ценных сортов различных хозяйственно и медицински важных, а также декоративных древесных культур является одним из наиболее перспективных направлений в практической и фундаментальной биологии растений [1, 2], и на сегодняшний день, тема культивирования в условиях *in vitro* и тиражирования древесных растений представляет собой одну из актуальнейших биотехнологических задач.

На успех начальной стадии микрклонального размножения влияют различные параметры. Критические точки для эффективного создания культуры древесных растений *in vitro* связаны с эффективностью стерилизации собранных эксплантов и ингибированием их фенол-индуцированного потемнения [3]. В качестве эксплантов можно использовать меристемы или кончики побегов (спящие или активно растущие почки) из-за их генетической стабильности [4]. Часто используются фрагменты молодых побегов растения, несущих одну или несколько пазушных почек. При культивировании тканей растений *in vitro* на богатых питательными веществами средах, рост непатогенных в обычных условиях микроорганизмов ускоряется до такой степени, что они могут существенно нарушить или подавить развитие эксплантов [5]. Стандартные методы стерилизации эксплантов подразумевают погружение рас-

тительного материала в стерилизующие растворы на определенный промежуток времени с последующим многократным отмыванием стерильной дистиллированной водой. Потемнение эксплантатов и последующая возможная гибель ткани происходит под действием полифенолоксидазы и пероксидаз, вызывающих защитные реакции, вызванные ранением [6]. Для предотвращения или контроля потемнения чаще всего применяют добавление в исходную среду различных агентов, которые могут предотвращать образование фенольных соединений или удалять их из среды, такие как антиоксиданты, хелатообразующие материалы или адсорбенты [7].

Целью данной работы было произвести генерацию культуры *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach *in vitro*: подобрать оптимальную методику введения айвы японской в культуру, а именно тип экспланта, режим стерилизации, состав питательной среды.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На данный момент существует целый спектр методик генерации культуры *in vitro* для различных представителей семейства Розоцветные, теоретически применимых для *Chaenomeles japonica* (Thunb.) Lindl. ex Spach, или айвы японской. Среди них в качестве эксплантов наиболее часто используются молодые проростки и листовые почки, реже семена и изолированные зародыши.

В первом варианте для введения в культуру были использованы семена *Chaenomeles japonica* урожая 2019 года, прошедшие стратификацию при 4°C в течение 30 сут. Для введения в культуру использовалась методика, описанная в литературе для сходных культур. Стерилизация производилась 0,1% раствором сулемы в течение 7 минут, после чего семена высаживались на среду Мурашиге и Скуга с добавлением 0,5 мг/л 6-бензиламинопурина в асептических условиях ламинарного бокса.

В следующем варианте были использованы молодые проростки айвы японской, полученные из семян после 30 сут стратификации (4°C, темнота) и 30 сут культивирования на ростовых стеллажах. В качестве эксплантов использовались участки побега в 1–2 верхних междоузлия. Непосредственно перед введением в культуру свежесрезанные проростки помещались в химических стакан и промывались проточной водой 10–15 минут. Стерилизация эксплантов проводилась в ламинар-боксе в следующей последовательности: 1) 96% этанол 1 с; 2) отмыв стерильной дистиллированной водой 5 мин; 3) 0,1% раствор сулемы 5 или 7 минут; 4) отмыв 5 мин. Затем экспланты переносились в культивационные сосуды на питательную среду, содержащую 100% микро- и макро-солей

по прописи Мурашиге и Скуга с добавлением 30 г/л сахарозы и 9 г/л агар–агара. В качестве дополнительного компонента тестировались 0,5 мг/л 6–бензиламинопурина (стимулятор побегообразования) и 1 г/л активированного угля (адсорбент фенольных соединений).

Кроме того, тестировалась возможность генерации асептической культуры айвы японской из листовых почек растений открытого грунта или прошедших 14 сут адаптацию к лабораторным условиям. Режим стерилизации и среда культивирования были аналогичны предыдущему варианту.

Культивирование всех вариантов в почвенных субстратах и микроклональных сосудах осуществлялось на ростовых стеллажах в условиях $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, относительной влажности воздуха $75\pm 5\%$ и световом режиме 16 ч свет / 8 ч темнота.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе работы было апробировано несколько методов генерации асептической культуры айвы японской. При использовании в качестве посадочного материала семян айвы японской 20% семян не поддались стерилизации и остались контаминированными; 8% семян проросли, но под семенной кожурой оказались поражены инфекцией; 72% семян простерилизовались, но не взошли.

При использовании в качестве эксплантов молодых проростков, изначально проводился подбор оптимальных условий высадки семян в почву для достижения максимального уровня всхожести. Как видно по представленным в таблице данным, стратификация является обязательным элементом подготовки семян к дальнейшей посадке в грунт, а наиболее эффективным вариантом является высадка семян в субстрат из торфа верхового раскисленного и вермикулита (соотношение 1:1 по объему) с последующим помещением на 30 сут стратификацию в темноте при 4°C .

Таблица

Всхожесть семян айвы японской при различных режимах стратификации

	Торф + вермикулит, % взшедших семян	Песок + вермикулит, % взшедших семян
Без стратификации	–	–
Стратификация в субстрате	52,5	35
Стратификация без субстрата	25	16,3

По результатам эксперимента по введению проростков в культуру можно утверждать, что стерилизации в 96% этаноле в течение 1 секунды и в 0,1% растворе сулемы в течение 5 минут достаточно для молодых

проростков айвы японской, полученных из семян в лабораторных условиях. Среда МС с углем не подходит для введения в культуру айвы – экспланты не жизнеспособны, а добавление бензиламинопурина способствует эффективной генерации культуры. Кроме того, различия по эффективности введения в культуру между проростками с разных типов почв обнаружено не было.

В результате использования в качестве эксплантов листовых почек было показано, что в случае с почками растения из открытого грунта 20% эксплантов не простерилизовались, остальные не жизнеспособны. Экспланты, адаптированные к условиям лаборатории, прижились, наблюдается их рост.

По результатам работы наиболее эффективным оказалось введение в культуру молодых проростков айвы японской на среду Мурашиге и Скуга с добавлением 30 г/л сахарозы, 9 г/л агара и 5 мг/л 6-бензиламинопурина. Различия между режимами стерилизации отмечено не было.

Библиографические ссылки

1. *Dobrąnszki J., da Silva J. A. T.* Micropropagation of apple – a review // *Biotechnology Advances*. 2010. Vol. 28 №. 4. P. 462–488. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.02.008.
2. *Beck S. L., Dunlop R. W.* Micropropagation of the *Acacia* species—a review // *In Vitro Cellular & Developmental Biology–Plant*. 2001. Vol. 37, №. 5. P. 531–538. DOI: 10.1079/IVP2001220.
3. *Pérez-Tornero O., Burgos L.* Apricot micropropagation // *Protocols for micropropagation of woody trees and fruits*. Dordrecht: Springer, 2007. P.267–278.
4. *Kaushal N. et al.* In vitro clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds. 2005. Vol. 43, № 06. P. 561–565.
5. *Giladi I., Altman A., Goren R.* A method for aseptic culture of bud explants from citrus trees // *Scientia Horticulturae*. 1979. Vol. 10, №. 4. P. 357–362. DOI: 10.1016/0304-4238(79)90095-5.
6. *Pan M. J., Van Staden J.* The use of charcoal in *in vitro* culture—A review // *Plant growth regulation*. 1998. Vol. 26, №. 3. P. 155–163. DOI: 10.1023/A:1006119015972.
7. *Sharma M., Modgil M., Sharma D. R.* Successful propagation *in vitro* of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. 2000. Vol.38, № 12. 1236–1240.