

УДК: 581.143.6:58.085

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ГРЕЦКОГО ОРЕХА (*YUGLANS REGIA* L.) ПУТЁМ СОМАТИЧЕСКОГО ЭМБРИОГЕНЕЗА

Н. Ж. ЗАРНАДЗЕ, Н. Д. ЛОМТАТИДЗЕ, Р. Ж. ЗАРНАДЗЕ,
Н.И. ВАРШАНИДЗЕ, З.Т. ДЖАПАРИДЗЕ

Государственный университет им. Ш.Руставели, Грузия, г. Батуми

С использованием модифицированной среды Гамборга В5, дополненной БАП и НУК или БАП и ИМК в разных концентрациях и соотношениях, разработана система получения регенерантов грецкого ореха путём соматического эмбриогенеза, которую можно использовать для массового размножения посадочного материала.

*Ключевые слова: *Yuglans regia*, микрклональное размножение, соматический эмбриогенез.*

Введение. Изолированные клетки и ткани растений достоверно показали свои уникальные возможности – при соответствующих условиях пролиферировать и образовывать зиготоподобные клетки, которые дают начало соматическим зародышам, а затем полноценным растениям — регенерантам *in vitro* [1,2].

Методы клеточной технологии обеспечивают селекцию растений исходным материалом и одновременно служат способом сохранения редких экономически ценных сортов, а также для создания новых высокопродуктивных форм разных растений [3–5]. Однако надо отметить, что микрклональное размножение древесных видов *in vitro* довольно сложно и всё же остаётся нерешенной проблемой [3].

Целью наших исследований являлось изучение возможности клонального микроразмножения путём соматического эмбриогенеза грецкого ореха (*Yuglans regia*).

Культура грецкого ореха существует с древнейших времён. Она знаменита деревянистым плодом, который широко употребляется в пищу. Плод содержит превосходное масло, кожура орехов — много дубильных веществ, особенно в незрелых плодах. Из него производят варенье. Дерево грецкого ореха достигает больших размеров и даёт ценную древесину, которая имеет большое значение в мебельной и строительной промышленности. Вышесказанное определяет значимость

© Н. Ж. ЗАРНАДЗЕ, Н. Д. ЛОМТАТИДЗЕ, Р. Ж. ЗАРНАДЗЕ, Н.И. ВАРШАНИДЗЕ, З.Т. ДЖАПАРИДЗЕ, 2008

грецкого ореха в народном хозяйстве, разработка метода клонального микроразмножения важна для гарантированного получения высокопродуктивных и урожайных клонов, так как при семенном размножении многие ценные признаки могут быть утрачены.

Материалы и методы

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* служили мясистые семядоли плода. Для получения асептических культур стерилизацию плода проводили 96% этанолом с последующим обжиганием на пламени спиртовки. Процедура стерилизации происходила в ламинар-боксе, затем плоды раскрывали, вынимали из косточки семядоли, нарезами на несколько частей и сажали на питательные среды.

На следующем этапе – собственно микроразмножения, в качестве эксплантов использовали почки пробирочных асептических культур, регенерированных из эмбриоидов.

Основной средой для эксперимента служила модифицированная среда Гамборга В5 [4]. В зависимости от вариантов опыта в среду добавляли разные концентрации регуляторов роста: нафтилуксусную кислоту (НУК), индоллилмасляную кислоту (ИМК) и бензилламинопурип (БАП). Р₂ среды составляло 5,7–5,8, автоклавирование сред проводили при 0,9 ± 0,1 атм. в течение 20 минут. Пассирование на свежую питательную среду проводили через каждые 25–30 суток. Условия культивирования эксплантов: на первом этапе (10 дней) в темноте при 27 ± 1 °С, затем переносили на свет (3 люкс), фотопериод 16/8 часов, температура 27 ± 1 °С.

Результаты и обсуждение

На первом этапе культивирования целью являлось получение асептического материала и индукция каллусогенеза.

Участки простерилизованных семядолей помещали на питательные среды В5, содержащие 2 мк БАП, разные концентрации ауксинов ИУК и ИМК 8, 12, 16, 20 мк.

Проведённый эксперимент показал, что описанный метод стерилизации эффективен для получения свободных от микрофлоры и вирусов культур. Используемые концентрации фитогормонов вызывали пролиферацию клеток первичного экспланта с образованием каллусной ткани. Интенсивность каллусообразования зависела от концентрации ауксинов в среде (табл. 1). Максимальная скорость прироста сырой массы отмечалась на среде с 20 мк НУК и 2 мк БАП. Однако надо отметить, что более низкие концентрации (8, 12, 16 мк) способствовали получению каллуса эмбриогенного типа. Сначала происходил каллусогенез, а затем образование эмбриоструктур на поверхности биомассы, постепенно охватывая весь эксплант. После появления эмбриоструктур различать стадии каллусо- и эмбриогенеза было невозможно, так как процессы проходили параллельно. Интенсивность каллусо- и эмбриогенеза была оптимальной на среде, содержащей 12 мк НУК и 2 мк БАП. Инициация каллуса отмечалась на 9–10-й день после высадки экспланта, каллус характеризовался плотной консистенцией, узловатой структурой, имел жёлто-молочный цвет. Индукция эмбриоструктур на каллусах начиналась во втором пассаже на 6–7-й день на тех средах, которые содержали НУК в концентрации 12, 16, 20 мк. Образованные эмбриоструктуры имели биполярную

структуру, бледно-зеленый цвет, плотную консистенцию. Внесение в среды 8 мк : 2 мк и 4 мк : 2 мк НУК: БАП соответственно вызывали образование каллусов с низким темпом роста, и только в конце второго пассажа давали эмбриоструктуры в минимальном количестве.

В конце второго пассажа соматические эмбриониды переходили в фазу созревания. Это продолжалось в течение третьего пассажа, образование *de novo* эмбрионидов и созревание уже образованных проходили синхронно. На частоту каллусогенеза и индукцию эмбриоструктур влияла природа использованных ауксинов. Замена НУК на ИМК в тех же концентрациях вызывала положительный эффект на описанные процессы (табл. 1).

Количество ответивших на индукцию эксплантов было гораздо меньше под влиянием ИМК, но эмбриорегенеранты укоренялись более эффективно, чем полученные на среде с НУК.

Еще одним важным фактором, влияющим на индукцию каллуса и эмбриогенеза *in vitro*, оказались физические условия культивирования. Например, часть эксплантов выращивали в тер-

мостате в темноте в течение 10 дней, с последующим переносом на свет, а другую часть выращивали непосредственно на свету. Эксперимент показал, что каллусогенез и индукция эмбриоподобных структур стимулируется темнотой, отмечалось усиление интенсивности этих процессов. Темнота благоприятно влияла также на количество эксплантов, ответивших на индукцию морфогенеза.

Зрелые эмбриониды переносили на органогенные среды, где концентрация цитокинина БАП составляла 5, 10, 15 мк в сочетании с 2 мк НУК. Пассирование проводили как одиночных эмбрионидов, так и пучками с кусочками каллуса. Оказалось, что пассирование одиночных эмбрионидов на свежую питательную среду было более эффективным, чем использование маленьких пучков или колоний эмбрионидов, так как процесс регенерации проходил интенсивнее и побеги быстрее росли. Этот этап позволял игнорировать фазу дорастивания, и побеги можно было сразу перенести на среды для укоренения. Различные концентрации БАП в комбинации 2 мк НУК позволили получить разные результаты регенерации.

Таблица 1. Некоторые характеристики каллусо- и эмбриогенеза ореха *in vitro*

Ауксины		БАП	Каллусогенез		Эмбриогенез	
НУК	ИМК		Интенсивность роста	Количество ответивших эксплантов	День инициации	Количество эмбрионидов
4		2	+	8	12	82
8		2	++	9	9	196
12		2	++++	10	7	256
16		2	++++	10	6	188
20		2	++++	10	6	161
	4	2	+	6	14	49
	8	2	++	7	13	101
	12	2	+++	9	10	197
	16	2	+++	10	10	162
	20	2	++++	10	10	116

Таблица 2. Влияние регуляторов роста на индукцию регенерации эмбриопобегов, N=10

Регуляторы роста		Среднее число побегов на эксплант	Средняя длина побега, мм	Среднее число междоузлий на побег
БАП	НУК			
5	2	1,5	46,2	9,2
10	2	16,7	32,0	6,8
15	2	18,9	19,4	3,9

Низкая концентрация (5 μ m) способствовала формированию из эмбриоидов одиночных побегов с мощным, хорошо развитым стеблем, которые можно было либо укоренить, либо черенковать и использовать как эксплант для следующего цикла собственно микроразмножения.

Среды, содержащие 10 μ m БАП и 2 μ m НУК вызывали высокую частоту регенерации побегов из эмбриоидов и интенсивное побегообразование, особенно отмечалось пазушное ветвление. Надо отметить, что до выхода из покоя пазушных почек соответствующий лист становился жёлтоватого цвета и отпадал со ствола сразу же, как вытягивался первичный лист пазушной почки. Пожелтение листа было индикатором появления новой почки. Пазушным почкам полагался этап доразрастания для ускоренного получения растений-клонов, а затем этап укоренения. Тогда можно было растение черенковать и использовать, как эксплант для следующего цикла собственно микроразмножения.

Пассирование эмбриоидов на средах, содержащих 15 μ m БАП и 2 μ m НУК, вызывало образование одновременно несколько побегов из одной точки эмбриоида. В конце пассажа побеги имели укороченные междоузлия и узкие листья. При пассировании таких побегов на свежей питательной среде развивались апикально-доминирующие побеги. Реализация побегов в определённой степени стимулировалась при

сочетании 2 μ m НУК и БАП. НУК способствовала ускорению индукции побега, соответственно побеги отличались по морфологии (габитусу) от тех побегов, которые регенерировали только под влиянием БАП (табл. 2).

Побеги высотой 25–40 мм переносили для укоренения на среду, содержащую ИМК в концентрации 4 μ m. Используемая среда обеспечила 90% укоренения в нестерильных условиях, акклиматизацию проводили в теплице, а через полгода переносили в открытый грунт.

Выводы

В результате проведённых экспериментов была разработана система получения регенерантов грецкого ореха в культуре *in vitro*, которую можно использовать для массового размножения посадочного материала.

Список литературы

1. Бутенко Р.Г. Клеточные технологии в селекционном процессе. – М: Наука, 1986. – 216 с.
2. Зарнадзе Н., Аласания Н., Ломтатидзе Н., Гогитидзе Ц. Каллусная культура и получение эмбриоидов при микрклональном размножении пасифлоры. Труды Батумского госун-та, 2005. – Т. 4. – С. 105-107.
3. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. — М.: Наука. — 1986. — С. 3-20.
4. Gamborg O.L. Eveleigh D.E. Cutlure methoda and defection of glucanases in cultures of wheat and barley. // Canad. J. Biochem. – 1968, V. 46, N 5. – P. 417-421.

5. Марченко А.О. Реализация морфогенетического потенциала растительных организмов // Успехи совр. биологии. – 1996. — т. 116, №3. -С. 306-319.

*Представлена В.А. Кунахом
Поступила 6. 10.07*

МІКРОКЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ
ВОЛОСЬКОГО ГОРІХА
(*YUGLANS REGIA* L.) ШЛЯХОМ
СОМАТИЧНОГО ЕМБРІОГЕНЕЗУ

*Н. Ж. Зарнадзе, Н. Д. Ломтатидзе,
Р. Ж. Зарнадзе, Н.И. Варшанидзе,
З.Т. Джапаридзе*

Державний університет ім. Ш. Руставелі,
Грузія, м. Батумі

З використанням модифікованого середовища Гамборга В5, доповненого БАП та НОК або БАП та ІМК в різних концентраціях та співвідношеннях, розроблена система отримання регенерантів волоського горіха шляхом соматичного ембріогенезу,

яку можна використовувати для масового розмноження посадкового матеріалу.

Ключові слова: Yuglans regia, мікроклональне розмноження, соматичний ембріогенез.

MICROCLONAL PROPAGATION OF
THE *YUGLANS REGIA* L. THROUGH
SOMATIC EMBRYOGENESIS

*N.Zh. Zarnadze, N.D.Lomtadidze,
P.Zh. Zarnadze, N.I.Varshanidze,
Z.T.Dzhaparidze*

Rustaveli State University Georgia, Batumi Sh.

Using modified Gamborg BS nutrient medium supplemented with BAP and IAA or BAP and IBA in varying concentrations and ratios there was developed strategy for generation of *Yuglans regia* regenerants via somatic embryogenesis suitable for mass propagation as planting stocks.

Key words: Yuglans regia, microclonal propagation, somatic embryogenesis.