

А.М. ЛАВРЕНТЬЄВА¹, І.С. КОСЕНКО²

¹ Національний ботанічний сад ім. М.М. Гришка НАН України
Україна, 01014 м. Київ, вул. Тімірязєвська, 1

² Дендрологічний парк "Софіївка" НАН України
Україна, 20300 м. Умань, вул. Київська, 12а

КЛОНАЛЬНЕ РОЗМНОЖЕННЯ П'ЯТИ ГЕНОТИПІВ CORYLUS L. В КУЛЬТУРІ IN VITRO

Наведено результати вивчення клонального мікророзмноження п'яти генотипів ліщини деревовидної в культурі in vitro. Розроблено методи стерилізації та досліджено морфогенний потенціал експлантів дорослих рослин, підібрано оптимальні поживні середовища для культивування.

Види та форми роду *Corylus L.* є цінними декоративними, плодовими та лісогосподарськими рослинами, які для більш широкого введення в культуру [5] потребують значної кількості посадкового матеріалу. Однак ліщина дуже повільно розмножується живцюванням та слабо вкорінюється.

В останні роки значну увагу приділяють розвитку біотехнології, в основі якої лежить метод клонального мікророзмноження. Цей метод базується на тотипотентності рослинних клітин, їхній де- і диференціації і має значні переваги перед іншими технологіями [1]. Завдяки цьому методу досягається високий коефіцієнт розмноження, внаслідок чого можна отримати велику кількість генетично стабільного та оздоровленого посадкового матеріалу.

У зв'язку з цим заслуговують на увагу роботи, присвячені клонуванню різ-

них видів деревних культур. Так, наприклад, для мікророзмноження селекційних сортів каштана апікальні меристеми пагонів ювенільних і дорослих рослин культивували на поживному середовищі Мурасіге – Скуга з БА. Отримані пагони укорінювали на тому ж середовищі з додаванням ІМК (3 мг/л), однак збільшення її концентрації до 5 мг/л спричиняло проліферацію калусу [12].

Не менш цікаві дані були отримані при мікророзмноженні берези. Так, Л.К. Сімола [7] отримала з тканин листків дорослих рослин спочатку калус, а потім і пагони, які укорінювали в субстраті в умовах теплиць.

Інші дослідники вивчали вплив трьох генотипів, вмісту поживних речовин у середовищі та умов культивування на ріст і забарвлення калусів берези. Виявлено, що ці показники значною мірою залежали від генотипу і дуже мало – від складу середовища. Автори припуска-



ють, що різниця у рості калусу пов'язана з ядерним геномом берези, а різниця у забарвленні зумовлена спільною дією ядра та цитоплазми [13].

Калусні культури акації було отримано з гіпокотила, листків і стебла проростків. Пагони утворювались на середовищі М–S з НУК і БА, а корені – на середовищі з ІМК [19, 14].

За допомогою калусних культур була також розмножена тополя (*Populus tremuloides*). Калус отримували із сегментів листків стерильних рослин на поживному середовищі Гамборга, пагони – при додаванні до середовища БАП, а коріння – ІМК [15, 22].

При мікророзмноженні трьох клонів каштана (*Castanea sativa*) використовували експланти, отримані з його проростків. На поживному середовищі М–S з БАП вони формували рослини. Укорінювали їх, занурюючи пагони в умовах *in vitro* у розчин ІМК [20].

Калусні культури було отримано також при культивуванні зрілих зародків гінкго (*Ginkgo biloba*) на поживному середовищі М–S з мезоінозитом та тіаміном. Калус проліферував із тканин сім'ядолі та гіпокотила. Однак рослин не було отримано [21].

Узагальнюючи літературні дані, слід зазначити, що основні принципи методу мікророзмноження деревних рослин розроблені. Встановлено, що калусні і суспензійні культури використовують переважно для листяних порід. При цьому необхідним є цитологічний контроль рослин, що утворились.

Культури ізольованих апікальних і пазушних меристем та бруньок дають змогу індукувати адвентивні пагони, що збільшує коефіцієнт розмноження, а в культурі стеблових експлантів відбувається регенерація адвентивних пагонів без стадії калусогенеза. Найкраще вико-

ристовувати ювенільні частини рослин, які зберігають тотипотентність клітин.

Нині ми маємо кілька різних методів мікроклонального розмноження деревних культур. Вони відрізняються лише за станом вихідних клітин та тканин, які використовують для отримання рослин. В одному випадку вихідні тканини перебувають у стані активного клітинного росту, меристемні тканини регенерують калус, проходять первинну диференціацію, інтенсивний органо- і гістогенез, формуються ембріоїди, бруньки, пагони і утворюють рослини. У другому – спершу розпочинається процес дедиференціації і лише потім поетапно відбуваються процеси, які згадувалися вище.

Однак найперспективнішим у найближчому майбутньому, на наш погляд, буде метод індукції соматичного ембріоїдогенезу з експлантів, калусних тканин або суспензії клітин, оскільки він забезпечує отримання значної кількості рослин-регенерантів.

Аналіз літературних даних виявив також відсутність будь-яких відомостей щодо мікророзмноження ліщини. Тому розробка біотехнології цієї культури є дуже актуальною.

Об'єктами досліджень були п'ять видів роду *Corylus* L.: *C. colurna* L., *C. seiboldiana* Blume, *C. maxima* Mill., *C. mandshurica* Maxim., *C. avellana* L.

Одним з важливих етапів мікророзмноження є отримання стерильного інтактного матеріалу. Як експланти ми використовували сегменти листків, пазушні бруньки, сегменти кори гілочок дорослих рослин. Експланти відбирали навесні, влітку і восени. Усі види експлантів були сильно інфіковані спорами грибів та бактеріями, тому для стерилізації застосовували багатоступеневий режим. Експланти у марлевих мішечках занурювали послідовно у 70%-й етанол



(1 хв.). 3%-й фамосепт (20 хв.), 20%-ве хлорне вапно (15 хв.), 15%-й перекис водню (15 хв.). Після кожного стерилізатора експланти 3–4 рази промивали у стерильній воді. Це дало змогу отримати 60% стерильних експлантів. Ізольовані тканини переносили в культуральне приміщення, де підтримували постійну температуру 25–27° С, відносну вологість повітря 70% та фотоперіод 16 год. Роботи з субкультивування проводили у ламінарному боксі. Для культивування експлантів використовували поживні середовища Кнудсона, М–S, Піріка та їхні модифікації [3].

Попередніми дослідженнями було встановлено, що види роду *Corylus* мають дуже низький морфогенний потенціал у культурі *in vitro* та слабку регенераційну здатність до утворення пагонів і коріння при живцюванні. Тому надзвичайний інтерес становлять отримані дані з вивчення фітогормонального комплексу деяких видів ліщини на різних фенологічних фазах їхнього розвитку [6]. Авторами встановлено, що для періоду розпукування вегетативних бруньок (квітень–травень) характерним є високий вміст ІОК, який переважає рівень АБК та інших компонентів інгібіторного комплексу. У зв'язку з цим ми вважаємо, що в цей період створюються оптимальні умови для індукції ростових процесів і відбору експлантів для мікророзмноження. Цей висновок підтверджують проведені нами дослідження.

Важливого значення набуває також вивчення комплексу фенольних сполук, які нагромаджуються в клітинах рослин перед настанням періоду спокою, через що гальмуються всі регенераційні процеси, і рівень яких знижується при виході рослин зі стану спокою. Цей факт був підтверджений нами при вивченні

морфогенетичного потенціалу ізольованих тканин досліджуваних видів. Експланти, отримані восени, мали дуже низьку регенераційну здатність. У культурі *in vitro* вони погано розвивались, а деякі взагалі загинули. Ми пов'язуємо це з накопиченням у цей період значної кількості фенольних інгібіторів у клітинах експлантів. Менша кількість фенольних сполук спостерігалась влітку. Найбільший морфогенний потенціал мали вегетативні бруньки, відібрані навесні (у травні). Вони виявилися найпридатнішими експлантами для мікророзмноження через те, що співвідношення ІОК/АБК у цей період у рослин було найбільшим.

За деякими літературними даними, глибокий спокій у ліщини закінчується приблизно у січні. Однак і у стані спокою рослини накопичують фітогормональні речовини. Залежно від їх концентрації та фізико-хімічного стану рослин вони можуть діяти як стимулятори, інгібітори або нейтральні речовини [4]. Тому у бруньках протягом року співвідношення стимуляторів та інгібіторів різне: в осінній та зимовий період воно різко зменшується, а з лютого по травень відмічається стійке накопичення стимуляторів росту. Можливо цим фактом пояснюється різна регенераційна здатність експлантів ліщини залежно від пори року.

Крім того, як експланти нами були використані також фрагменти стебла. З літературних джерел відомо, що такі експланти можуть містити велику кількість цитокінінів і мати високу здатність до регенерації калусу навіть за відсутності фітогормонів у поживному середовищі [9, 10].

Проведеними нами дослідженнями було встановлено, що не всі види ліщини можуть регенерувати калус із фрагментів стебла. Так, у *Corylus colurna* та

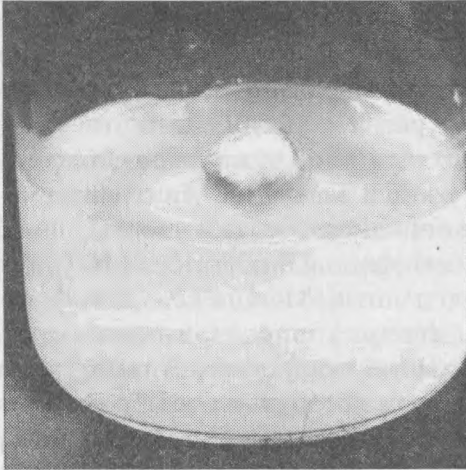


Рис. 1. Регенерація калусу із сегмента стебла *C. maxima*

C. maxima калусоутворення відбувалося значно швидше, ніж у інших видів (рис. 1). Слід зазначити, що калус мав низьку регенераційну здатність. Отримати з нього пагони вдалося лише у *C. colurna*, *C. maxima* та *C. avellana*.

При використанні в культурі *in vitro* як експлантів сегментів листків було отримано калус, але при подальшому культивуванні його ріст був слабким. Калус, отриманий із тканин вегетативних бруньок, був морфогенним, але регеновані з нього рослини становили лише 5%.

Значну кількість пагонів (30%) було отримано з бруньок молодих гілок. Основними труднощами при їх культивуванні є досягнення стерильності експлантів і слабке укорінення.

У літературних джерелах неодноразово згадувалася відсутність кореляції між вмістом вільних фітогормонів у вихідних експлантах та їхньою реакцією на екзогенні регулятори росту. Існує припущення, що екзогенні фітогормональні сполуки індують автономний синтез фітогормонів в експлантах, при цьому в тканинах формується

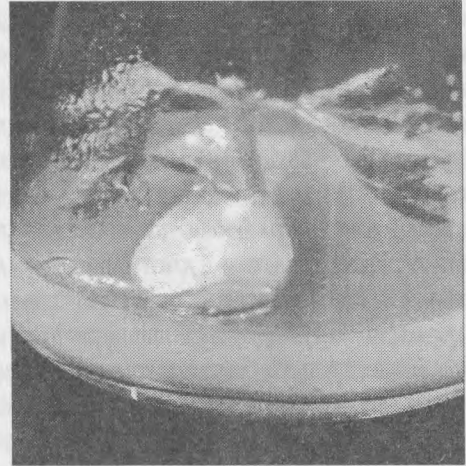


Рис. 2. Регенерація ембріоїдів з тканин сім'ядолі *C. colurna*

гормональна система, типова для культури тканин рослин даного виду або сорту [8, 11]. Дані, отримані нами при вивченні морфогенетичного потенціалу досліджуваних видів підтверджують це припущення.

Під час експериментів з насінневого розмноження ми виявили дуже цікавий вияв морфогенезу у досліджуваних видів у культурі *in vitro*. Через 6 місяців культивування на поживному середовищі Кнудсона з підвищеним вмістом аденіну на деяких частинах сіяньців диференціювались ембріоїди. Було встановлено, що процес ембріоїдогенезу відбувався двома шляхами. Перший — це прямий ембріоїдогенез, коли безпосередньо з тканин експланта, у нашому випадку з тканин сім'ядолі *C. colurna*, диференціювались ембріоїди (рис. 2). Як видно з фото, сіянець вже був використаний для живцювання (відрізана верхня частина пагона). У цьому випадку ембріоїди утворилися на місцях поранення сім'ядолей. На рис. 3 можна бачити регенерацію ембріоїдів шляхом непрямого ембріоїдогенезу. Спочатку з тканин зародка регенерував калус і лише згодом з меристематич-

них клітин диференціювались ембріюди. Аналогічні результати були отримані і при мікророзмноженні кінського каштана (*Aesculus hippocastanum L.*). У цих експериментах як експланти використовували листкові сегменти, які продукували три типи калусу та ембріюди. Іноді ембріюди з'являлися безпосередньо з листкового експланта. Гістологічний аналіз виявив подібність їх до зиготичних зародків, у культурі *in vitro* розвиток стебла та листків відбувався швидше, ніж ріст кореня [17]. В іншому випадку первинними експлантами були незрілі зародки. На поживному середовищі М–S з 2,4-Д та проліном вони формували ембріюди. При цьому пролін виявився важливим фактором індукції соматичного ембріюдогенезу [18].

Значну увагу при розробці методу мікророзмноження видів роду *Corylus* ми приділяли вивченню впливу різних факторів поживного середовища на проліфе-

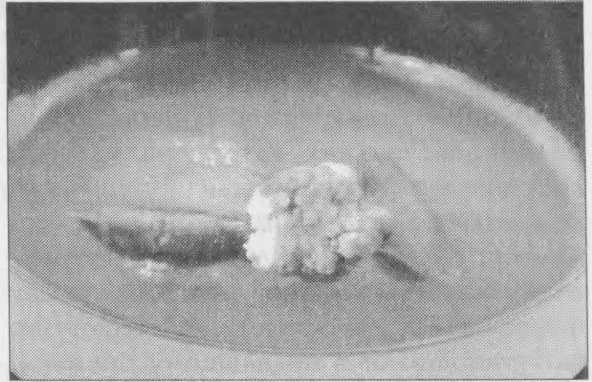


Рис. 3. Утворення ембріюдів з морфогенних тканин калусу *C. columa*

рацію калусу, регенерацію ембріюдів та індукцію морфогенезу. Перебіг цих процесів залежить від співвідношення регуляторів росту у поживному середовищі. У досліджах використовували різні модифікації поживних середовищ М–S і Піріка. Вплив різних компонентів поживного середовища на ізолювані тканини досліджуваних видів наведено у таблиці.

Вплив складу поживного середовища на морфогенез ізолюваних тканин видів роду *Corylus L.* у культурі *in vitro*, % від загальної кількості експлантів*

Варіант поживного середовища	№ варіанта	<i>C. columa</i>				<i>C. avellana</i>			<i>C. maxima</i>			<i>C. sieboldiana</i>			<i>C. mandshurica</i>		
		ка-лус	па-гін	емб-рію-іди	не-разви-нулись	ка-лус	па-гін	не-разви-нулись	ка-лус	па-гін	не-разви-нулись	ка-лус	па-гін	не-разви-нулись	ка-лус	па-гін	не-разви-нулись
Піріка + + 5 мг/л 2,4-Д + + 2 мг/л аденіну + + 1 г/л а. в.**	1	50	40	–	10	30	10	60	40	10	30	20	10	70	20	10	70
Піріка + 10 мг/л БАП + 2 мг/л ІОК	2	30	30	–	40	10		50	30	20	40	20	50	30	20	60	20
М–S*** + + 20 мг/л аденіну + + 5 мг/л НОК	3	30	20	40	10	20	50	30	30	30	40	30	50	20	30	30	40
М–S (1/2) + + 5 мг/л ІМК + + 10 мг/л ІОК + + 2 мг/л БАП	4	20	50	–	30	20	60	20	10	50	40	30	60	10	40	40	20

* У всіх варіантах використовували по 10 експлантів.

** а.в. – активоване вугілля. Додавалось до кожного варіанта.

*** М–S – поживне середовище Мурасіге – Скуга.

Аналіз даних таблиці показав, що процес морфогенезу у досліджуваних видів проходив у два етапи. Перший — це дедиференціація, тобто перетворення спеціалізованих клітин на калусні. Цей процес був найінтенсивнішим для всіх видів на середовищі № 1. На другому етапі — диференціації — в культивованих тканинах у процесі органогенезу формувались морфологічні структури, які утворювали в подальшому бруньки, пагони, ембріоїди, корені. Високий відсоток утворення пагонів з незначними коливаннями у різних видів відмічено на середовищі № 4.

Для індукції ембріогенезу у *S. soligna* оптимальним виявилось поживне середовище № 3. На жаль, отримати ембріоїди в інших видів нам поки що не вдалось. На даний момент нами досліджується процес ембріогенезу з експлантів ліщини, умови його виникнення та проходження.

Таким чином, проведені дослідження дали змогу розробити методи клонального розмноження видів роду *Corylus* L. в культурі *in vitro*. Були визначені оптимальні експланти, поживні середовища та умови культивування ізольованих тканин, розроблено біотехнологію, що дає змогу значно збільшити морфогенетичний потенціал цих рослин.

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. — М.: ФБК-Пресс, 1999. — 160 с.

2. Бутова Г.П. Использование изолированных культур для вегетативного размножения древесных растений // Достижения лес. генет., селекции, семеновод., интродукции и сортоиспытания: Матер. 3-й науч. конф. науч. сотр. ЦНИИ лес. генет. и селекции. — Воронеж, 1984. — С. 4–5.

3. Калинин Ф.П., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. — К.: Наук. думка, 1980. — 488 с.

4. Кефели В.И. Природные ингибиторы роста // Физиол. раст. — 1997. — 44, № 3. — С. 471–480.

5. Косенко И.С. Лещина древовидная на Украине. — К.: Наук. думка, 1991. — 105 с.

6. Косенко І.С., Драгозов І.В., Яворська В.К. та ін. Фітогормональний статус бруньок та однорічних пагонів видів роду ліщина в зв'язку з проблемою її вегетативного розмноження // Физиол. и биох. культ. растений. — 2002. — 34, № 2. — С. 175–180.

7. Симола Л.К. Каллюсные культуры и размножение березы *in vitro* // Культура клеток растений и биотехнология. — М., 1986. — С. 102–106.

8. Bajaj I.P.S. Biotechnology in Agriculture and Forestry. — Berlin: Springer Verlag, 1986. — P. 1–23.

9. Bonga J.M. Applications of tissue culture in forestry. In: Applied and fundamentals aspects of plant cell, tissue and organ culture. — Berlin: Springer Verlag, 1977. — P. 93–108.

10. Bonga J.M., Durzan D.I. Tissue culture in forestry. The Hague, Nijhoff. — 1982. — 245 p.

11. Boxus Ph., Druart P. Biotechnology in agriculture and forestry. — Berlin: Springer Verlag, 1986. — 60 p.

12. Gastaldo P., Carlis S., Profumo P. Somatic embryogenesis from stem explants of *Aesculus hippocastanum* // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 1994. — 39, No 1. — P. 97–99.

13. Glock H., Gregorius H.-R. Genotype — environment interaction in tissue cultures of birch // Theor. and Appl. Genet. — 1986. — 72, No 4. — P. 477–482.

14. Meyer H.I., Van Staven I. Acacia melanoxylon *in vitro*. Regeneration of Acacia melanoxylon plantlets *in vitro* // S. Afr. J. Bot. — 1987. — 53, No 3. — P. 206–209.

15. Noh Eun-Woon, Minocha Subhash C. High efficiency shoot regeneration from callus of quaking aspen (*Populus tremuloides* Michx.)



// Plant Cell Repts. — 1986. — 5, No 6. — P. 464–467.

16. *Pierik R.L., Oosterkamp J., Manschot G.A.J. et al.* Agar bromd a dominating factor for shoot growth of juvenile and adult *Quercus robur L.* 'Fastigiata' *in vitro* // Plant Tissue Culture and Biotechnology. — 1997. — 3, No 1. — P. 27–31.

17. *Profumo P., Dameri R.M., Caffaro L.* Histological study of calli and embryoids from leaf explants of *Aesculus hippocastanum L.* // J. Plant Physiol. — 1986. — 126, No 1. — P. 97–103.

18. *Radojevic L.* Plant regeneration of *Aesculus hippocastanum L.* (horse chestnut) through somatic embryogenesis // J. Plant Physiol. — 1988. — 132, No 3. — P. 322–326.

19. *Rao P., Lakshmana V., De Deepesh N.* Tissue culture propagation of tree legume *Albizia lebbek (L.) Benth* // Plant Sci. — 1987. — 51, No 2–3. — P. 263–267.

20. *Vietez Ana M., Ballester A., Vietez M.* *In vitro* plantlet generation of mature chestnut // J. Hort. Sci. — 1983. — 58, No 4. — P. 457–463.

21. *Webb David T., Arias W., Hostos E.* Callus formation by *Ginkgo biloba* embryos on hormone-free media controlled by closures and media components // Phytomorphology. — 1986. — 36, No 1–2. — P. 121–127.

22. *Welander M., Jansson E., Lindquist H.* *In vitro* propagation of *Populus wilsoniana* a hybrid of ornamental value // Plant Cell Tiss. Org. Cult. — 1989. — 18, No 2. — P. 209–219.

КЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ПЯТИ ГЕНОТИПОВ *CORYLUS L.* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

*A.N. Lavrentyeva*¹, *I.S. Kosenko*²

¹ Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины, Украина, г. Киев

² Дендрологический парк "Софиевка" НАН Украины, Украина, г. Умань

Представлены результаты изучения клонального микроразмножения пяти генотипов лещины древовидной в культуре *in vitro*. Разработаны методы стерилизации и изучен морфогенный потенциал эксплантов взрослых растений, подобраны оптимальные питательные среды для культивирования.

CLONAL PROPAGATION OF FIVE GENOTYPES OF *CORYLUS L.* IN VITRO

*A.N. Lavrentyeva*¹, *I.S. Kosenko*²

¹ M.M. Grishko National Botanical Gardens, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, Kiev

² Dendropark *Sofiyivka* of the NAS of Ukraine, Ukraine, Uman

The results of study of the stages of clonal propagation of five genotypes of *Corylus L.* *in vitro* are presented. The methods of explants sterilization are developed. The morphogenetic potential of explants from adult plants is studied. The optimal nutrient media are selected.