

Інгібування росту пилкових трубок петунії на середовищі культивування в присутності інгібітору полімеризації актину латрункуліна В супроводжувалося різким (до нуля) падінням ендogenous змісту ІОК, що свідчить про роль цього фітогормону в підтримці полярного росту чоловічого гаметофіту.

The inhibition of petunia pollen tube growth on the culture medium at presence of latrunculin B, inhibitor of actin polymerization, would be accompanied sharp (to zero) by falling of IAA contain that testifies to a role of this phytohormone in maintenance of polar growth of male gametophyte.

КАРПЕЧЕНКО К.А.*, **КАРПЕЧЕНКО Н.А.***, **ЗЕМЛЯНУХИНА О.А.***,
ДЖАНГИРОВ М.Ю.**, **СКРЫПНИК И.А.****

* ФГУП «НИИ лесной генетики и селекции» (НИИЛГиС),
Россия, 394087, Воронеж, ул.Ломоносова, 105, e-mail: oz54@mail.ru

** ФГУ «НИИ горного лесоводства и экологии леса» (НИИ горлесэкологии),
Россия, 354002, Сочи, Курортный пр., 74, nikiforovdn@mail.ru

ВЛИЯНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО И ДУБА СКАЛЬНОГО *IN VITRO*

В настоящее время отмечается деградация и массовое усыхание дубрав, что стало глобальным явлением и отмечено практически во всех ареалах многих видов дуба по всему миру. В этой связи встает проблема лесовосстановления дубрав, которая затруднена периодичностью плодоношения и трудностями закладки лесосеменных плантаций.

Основные проблемы при закладке ЛСП дуба:

- плодоношение с 15–60-летнего возраста;
- интенсивное плодоношение раз в 4–5 лет;
- затруднено определение генетической ценности плюсовых деревьев и их семенного потомства;
- отторжение значительной части прививок от подвоя.

Целью настоящей работы является изучение минерального состава питательных сред и гормональных добавок на регенерацию, размножение и укоренение микрочеренков *Q. robur* L. (дуб черешчатый) и *Q. petraea* (Matt.) Liebl. (дуб скальный).

Материалы и методы

Объекты исследования. Желуди дуба черешчатого были собраны осенью 2009 г. в санатории им. Горького (1 дерево), в парке “Динамо” (2 дерева) (г. Воронеж). Желуди дуба скального были присланы осенью 2009 г. из НИИ горного лесоводства (г. Сочи).

Желуди проращивали в условиях 16-часового фотопериода, в лесной почве, взятой в окрестностях НИИЛГиС.

Стерилизация растительного материала. По достижении достаточной длины для 3–4 сегментов проростки желудей отрезали и стерилизовали.

Срезанные побеги протирали мочалкой со стиральным порошком, тщательно отмывали в проточной воде и помещали на 10 мин. в стеклянные ёмкости с дистиллированной водой, дополненной несколькими каплями жидкого моющего средства. Отмывание проводили на качалке. Затем черенки помещали под проточную водопроводную воду на 20 мин., после чего переносили их в дистиллированную воду на 10 мин. на качалку.

Все последующие стадии проводили в стерильных условиях.

Черенки заливали стерилизующим раствором, содержащим 4% хлорсодержащего отбеливателя “Белизна” и 0,015% мертиолята. Растения выдерживали в течение 15 мин. на качалке, после чего отмывали стерильной дистиллированной водой (трижды по 5 мин.).

Концы проростков подрезали, нарезали на отрезки с одной почкой (верхушечные и боковые сегменты) и помещали в пенициллиновые пузырьки на питательные среды разного минерального состава, содержащие БАП.

Образование микропобегов. На питательных средах почки образовывали побеги, которые по достижении 2 см длины отрезали и переносили либо на дальнейшее субкультивирование на средах того же состава, либо на укоренение.

Укоренение. Для укоренения были использованы среды различного минерального состава, а в качестве гормонов укоренения выбраны ИУК и ИМК в различных концентрациях.

Результаты и обсуждение

В НИИЛГиС исследования по микроклональному размножению дуба черешчатого начались в конце прошлого столетия в работах Г.П. Бутовой, Т.М. Табацкой, Л.Л. Скробовой, Л.Я. Алексеевой [1, 2]. В качестве исходного материала использовались сеянцы дуба от 1 месяца до 1 года, порослевые побеги взрослых деревьев, сегменты одревесневших побегов с пазушными почками, взятые от поросли пня и живых 15–20-летних деревьев дуба. Авторам удалось добиться регенерации адвентивных побегов на ювенильном материале, считая один желудь за один генотип. Отмечено, что морфогенная активность зависит от типа и генотипа экспланта, от возраста материнского дерева.

В наших экспериментах мы использовали только ювенильный материал, полученный из 2-месячных проростков желудей дубов черешчатого и скального.

На первом этапе работы проводили поверхностную стерилизацию растительного материала и выясняли её влияние на жизнеспособность экплантов. Оказалось, что стерилизация проростков дуба черешчатого и скального без добавления мертиолята приводит к усилению роста растений без выявления инфекции (жизнеспособность до 100%).

Биотехнологические методы для тиражирования вида начали применяться давно [3]. Основная проблема, с которой сталкивались исследователи, — апикальный некроз: после введения в культуру *in vitro*, верхняя часть главного побега начинала усыхать, а развивающиеся боковые (адвен-

тивные) побеги росли укороченными, с неразвитыми листьями и в конце также некротизировали [4]. Предотвращением апикального некроза стало микроклональное размножение дуба расширенного (*Q. floribunda* Lindl.) не меристемными тканями, а путем образования адвентивных побегов на стерильных семядолях на гормональных питательных средах [5]. После поверхностной стерилизации с желудей снимали чешуи, дополнительно стерилизовали и помещали в условия 16-часового фотопериода. У позеленевших семядолей аккуратно убирали зародыш, и через 2–3 недели на поверхности образовывались адвентивные почки, развивающиеся в проростки. Нам, однако, не удалось добиться прорастания желудей в безгормональных условиях: даже на средах с фитагелем (0,24%) желуди выделяли фенолы, не зеленели и их выделенные зародыши погибали. Метод, на наш взгляд, подходит для редких, исчезающих видов дуба (например, дуба ножкоцветного) или для сохранения биоразнообразия, но не для размножения ценного генофонда, т.к. ткани семядолей миксоплоидны.

Необходимо отметить, что при введении верхушечных почек дуба в культуру *in vitro* наблюдалось неразвитие меристем. Побег не рос и через некоторое время погибал.

Для микроклонального размножения использовали среды WPM и BTM, дополненные БАП. Хорошо развивались побеги из боковых почек; на этой

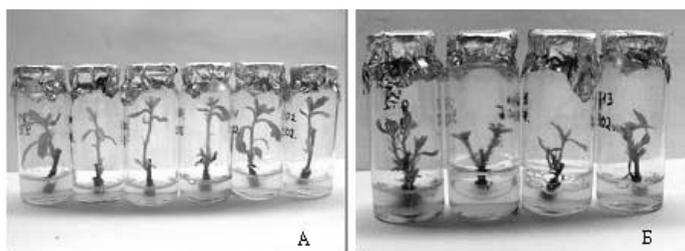


Рис. 1. Типы роста пробирочных растений:

А — растения, растущие одиночным побегом; Б — растения, растущие кустом

Таблица

Укореняемость эксплантов дуба черешчатого на разных типах питательных сред

Питательная среда	Исходное количество эксплантов, %	Конечное количество эксплантов, %		
		всего	из них с корнями	из них с ризогенным каллусом
Агар, 1/2WPM + 0.5 ИМК	100	62,5	60	0
Агар, 1/2WPM + 0.1 ИМК	100	100	12.5	25
Фитагель, 1/2 WPM + 0.5 ИМК	100	37,5	33,3	33,3
Фитагель, 1/2 WPM + 0.1 ИМК	100	75	0	50

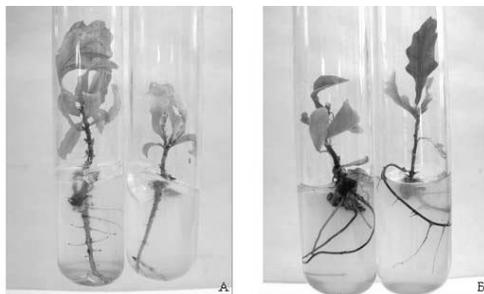


Рис. 2. Ризогенез микрочеренков дуба черешчатого и скального:

А — растения, имеющие мощный одиночный корень; Б — множественные корни
 стадии было заметно отличие генотипов: одни растения росли одиночным прямым побегом, другие — с множеством боковых коротких побегов, в виде куста (рис. 1).

Апикальное усыхание было частым явлением, выход в этой ситуации найден следующим образом: в отличие от исследований, в которых использовались концентрации БАП 1 мг/л, мы добавляли сразу, на первых этапах только 0,2 мг/л бензиламинопурина для дуба черешчатого, и 0,05 мг/л — для дуба скального. При этом развивались нормальные зеленые побеги, которые по достижении длины 2 см отрезали и переносили или на дальнейшее микроразмножение на среды того же состава или на укоренение.

Элонгация побегов достигалась добавлением в среду регенерации (1/2 ВТМ) GA_3 в концентрации 0,1 мг/л. Длительность черенкования адвентивных эксплантов с первичного побега наблюдалась, по крайней мере, в течение полугода без потери регенерационной способности.

Во многих статьях по микрочеренкованию дуба в качестве желирующего агента при укоренении используется наряду с агаром фитагель в концентрации последнего 0,24%. В наших исследованиях оказалось, что фитагель не только не способствовал укоренению, напротив, тормозил его, при этом в среду выделялось значительное количество фенолов, тормозящих развитие побега и корней.

Для укоренения черенков мы использовали среды MS, WPM как полные, так и 1/2, 1/4, 1/8 по макросолям с добавлением ИУК и ИМК в концентрациях 0,5, 0,01 и 0,05 мг/л. Наилучшие результаты получены на среде S WPM, содержащей 0,5 мг/л ИМК (табл.).

В наших экспериментах наблюдалось развитие корней разного типа. Одни появлялись в середине базальной части и росли мощным одиночным корнем, другие образовывали несколько корней, быстро дающих дополнительные корневые волоски (рис. 2).

Выводы

Значение дуба не только в его экономической ценности, связанной с источником ценнейшей древесины, но и в его влиянии на оздоровление всей

экосистемы за счет водоохраных и защитных функций. С другой стороны, состояние насаждений дуба постоянно ухудшается по целому ряду причин: усыхание дубрав; нерегулярное плодоношение; длинный репродуктивный цикл; сильное заражение желудей различного рода паразитами как в природе, так и при хранении; поедание семян мелкими и крупными животными (кабанами, оленями, белками, мышами, птицами); короткий срок жизнеспособности желудей.

Большинство проблем можно было бы решить методами микроклонального размножения дуба. Авторами подобрана оптимальная среда для длительного микрочеренкования: 1/2 ВТМ, содержащая 0,2 мг/л БАП и 0,1 мг/л GA_3 . Укоренение (до 60% для дуба черешчатого и 63% для дуба скального) достигалось добавлением к низкосольевой среде S WPM 0,5 мг/л ИМК. Нами ставится задача отбора клонов (линий) одного растения, наиболее идентичного по генотипу исходному плюсовому дереву. Полученный генетически-улучшенный материал будет использован при закладке лесосеменных плантаций и питомников. Следующей стадией исследования будет генетическая оценка полученных объектов, в том числе с использованием физиолого-биохимических, цитологических и ДНК-технологий.

Литература

1. Бутова Г.П., Табацкая Т.М., Скробова Л.Л. Генетика и селекция в лесоводстве. — М., 1991. — С. 41–49.
2. Алексеева Л.А., Нечаева М.Ю., Бутова Г.П. Сб. науч. тр. НИИЛГиС. — Воронеж. — 1993. — С. 65–73.
3. Vengadesan G., Pijut P.M. *In vitro* Cell. Dev. Biol.-Plant. — 2009. — V.45. — P. 474–482.
4. Veitez A.M., Pintos F., San-Jose M.C., Ballester A. *Tree Physiol.* — 1993. — V.12. — P. 107–117.
5. Purohit V.K., L.V.S.Palni, Nandi S.K., Rikhari H.C. *Current science.* — 2002. — V.83, N.3. — P. 312–316.

Резюме

Описаны условия микроклонального размножения и элонгации черенков желудей *Q. robur* и *Q. petraea*: подобрана низкосольевая среда 1/2 ВТМ, содержащая 0,2 мг/л (дуб черешчатый) и 0,05 мг/л БАП (дуб скальный) и 0,1 мг/л GA_3 . Длительность черенкования при отделении побегов на свежие среды достигала полугода. Укоренение побегов происходило при добавлении к 1/2 WPM 0,5 мг/л ИМК.

Визначені умови мікрочнонального розмноження та елонгації черенків жолудів *Q. robur* і *Q. petraea*: підібрано низькосольове середовище 1/2 ВТМ, яке вміщує 0,2 мг/л (дуб черешковий) і 0,05 мг/л БАП (дуб скальний), а також 0,1 мг/л GA_3 . Тривалість черенкування при відділенні пагонів на свіжі середовища досягало півроку. Укорення пагонів проходило за додавання до 1/2 WPM 0,5 мг/л ІМК.

Acorns from *Q. robur* and *Q. petraea* trees were used as initial explants for micropropagation. WPM and BTM supplemented by low concentrations BAP (0,2 mg/l) and GA_3 (0,1 mg/l) were used as basal mediums. 1/2 WPM with 0,5 mg/l IBM gave the best rooting results. Explants which subcultured to fresh medium after harvesting shoots increased shoot regeneration up to six months.

КОВТУН С.І., ЗЮЗІОН А.Б., ЩЕРБАК О.В., ГОНЧАРЕНКО Л.М.

Інститут розведення і генетики тварин НААН України

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н.,

с. Чубинське, вул. Погребняка, 1, e-mail: kovtun_si@gala.net

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ КРОЛІВ *IN VITRO*

Одним із етапів технології формування ембріонів ссавців *in vitro* є забезпечення ядерного та цитоплазматичного дозрівання ооцитів для більш повного використання генетичного потенціалу самиць. Сучасні репродуктивні технології, які ґрунтуються на розумінні закономірностей біології розвитку, ембріологічної генетики, забезпечують одержання тварин із бажаними та якісно новими ознаками. Клонування шляхом переносу ядер клітин з бажаними генетичними характеристиками дозволяє створювати трансгенних тварин, які продукують біологічно активні речовини [1, 2]. Наразі одним із методів отримання трансгенних тварин є мікроін'єкція розчину генних конструкцій у чоловічий пронуклеус зигот. Хоча цей підхід широко розповсюджений, ефективність переносу генів залишається на досить низькому рівні, що створює проблеми в отриманні трансгенних тварин [3].

В якості клітин-реципієнтів при клонуванні кролів слугують дозрілі *in vivo* яйцеклітини після гормональної обробки самиць, проте синхронізація овуляції гамет ускладнюється часовими параметрами від 10,5 до 14 годин після ін'єкції лютеїнізуючого гормону (ЛГ) [2]. Тому існує необхідність удосконалення методик одержання *in vitro* дозрілих яйцеклітини кролів для вивчення генетичних закономірностей проходження мейозу поза організмом, формування ембріонів та застосування їх для удосконалення методичних підходів щодо одержання клонованих та трансгенних особин.

Практичне застосування методу одержання ембріонів *in vitro* неможливе без відпрацювань методик оцінки ефективності дозрівання та запліднення *in vitro* гамет самиць. Метою наших досліджень було вивчити ефективність дозрівання *in vitro* ооцитів кролиць до стадії метафази II мейозу і проаналізувати сформовані поза організмом ембріони кролів.

Матеріали і методи

Яєчники отримували від забитих клінічно здорових кролиць віком 7,5 міс. Відібрані яєчники не мали ознак патології та знаходились на стадії фолікулярного росту. Ооцит-кумулясні комплекси вилучали шляхом розсічення стінок антральних фолікулів. Гамети із розпушеним кумулюсом, темною гомогенною ооплазмою дозрівали *in vitro* в середовищі ТСМ 199 (Sigma, M-5017) з додаванням 20% еструсної сироватки корів і $3-5 \times 10^6$ клітин гранулози в 1 мл. Для вивчення дозрівання ооцитів кролиць до стадії метафази II мейозу культивування *in vitro* проводили 6 та 24 години при температурі $+38,8 \text{ }^\circ\text{C}$ і 4% CO_2 у повітрі. Після 24 годин дозрівання поза організмом яйцеклітини осіменяли свіжоотриманими сперматозоїдами, які вилучали із хвостової частини придатка сім'яника кроля. Капацитовані поза організмом