

УДК 630\*232

## ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЯСЕНЯ ОБЫКНОВЕННОГО (*FRAXINUS EXCELSIOR*) *IN VITRO*

**Р.В. Усачева**

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», г. Воронеж, Россия

В настоящей статье приведены результаты культивирования регенерантов ясеня обыкновенного *Fraxinus excelsior*. В работе использовали верхушечные меристемы, побеги и незрелые зародыши со взрослых и молодых деревьев. Подобраны наиболее подходящие среды для асептического введения в культуру *in vitro*. Для изолированных зародышей ясеня обыкновенного рекомендуется питательная агаризованная среда Мурасиге и Скуга половинного состава с регулятором роста БАП (6-бензиламинопурина) в концентрации 3,0 мг/л среды. Для введения в культуру *in vitro* верхушечных меристем наилучшим образом подходит среда Мурасиге и Скуга половинного состава с регулятором роста БАП в концентрации 3,0 мг/л среды и ИМК (индолилмасляной кислоты) 0,1 мг/л. Для успешной регенерации *in vitro* побегов ясеня обыкновенного можно рекомендовать питательную агаризованную среду MS с БАП-4,0 + ИМК-0,1, для стимуляции роста междоузлий подходит среда WPM (Woody Plant Medium), с БАП-4,0 + ИМК-0,1.

**Ключевые слова:** микрочлонирувание, *Fraxinus excelsior*, *in vitro*, морфогенез, регенеранты, незрелые зародыши, апикальные меристемы.

### Введение

Сохранение генетического разнообразия лесных древесных видов и экосистем является важной задачей современного этапа развития общества. Ясень обыкновенный (*Fraxinus excelsior*) представляет одну из самых ценных лиственных пород европейской части России. Это главная порода в защитных лесных полосах, для мелиоративного и ветрозащитного лесоразведения, а так же, за счет декоративного внешнего вида, в ландшафтном дизайне для озеленения в парках и городских садах. Древесина ясеня обыкновенного не уступает дубу по твердости, богатству текстуры и прочности, а по вязкости даже превосходит его. Ясень имеет богатый химический состав, содержащий эфирные масла, дубильные вещества, горечи, кумарины, камедь, смолы, флавоноиды, фенилпропаноиды и др., поэтому его можно широко применять в медицине [4].

Но в последнее время из-за поражения взрослых деревьев узкотелой ясеновой златкой, возникли трудности в воспроизводстве посадочного материала ясеня. Перспективным способом сохранить и воспроизвести ясень является использование культуры *in vitro*. Микроразмножение побегами и верхушечными меристемами, кроме сохранения ценных свойств отдельных деревьев, обладает также большой производительностью и не зависит от времени года.

Помимо быстрого размножения ценных генотипов, культура открывает возможности для проведения генетических манипуляций [1]. Не менее важным является направление использования эмбриокультуры растений *in vitro*, так как зародыш обладает всеми морфогенетическими потенциями взрослого организма [3], а также сходством морфогенетических реакций растений *in vivo* и эксплантов/регенерантов *in vitro* согласно принципу универсальности морфогенеза растений в естественных и экспериментальных условиях [2, 5].

Но, тем не менее, работ по микроразмножению ясеня относительно немного, поэтому **целью исследования** явилось изучение морфогенетического потенциала незрелых зародышей, верхушечных меристем и побегов ясеня обыкновенного и особенностей введения их в культуру *in vitro*.

#### Материалы и методы

В качестве исходного материала использовали незрелые зиготические зародыши, апикальные меристемы и верхушечные побеги длиной 2 - 4 см ясеня обыкновенного с деревьев, произрастающих в лесопарковом участке ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех».

Изолированные зародыши культивировали на питательной среде Мурасиге и Скуга (MS) с половинным составом минеральных солей, развитие стимулировали добавлением БАП (6-бензиламинопурина)- в концентрации от 2,0 до 3 мг/л, ИМК (индолил-масляной кислоты) 0,1 мг/л и абсцизовой кислоты (АБК) 6,0 мг/л. Апикальные меристемы вводили в культуру *in vitro* и культивировали на среде MS с половинным составом минеральных солей с добавлением БАП в концентрации от 1,0 до 3,0 мг/л, ИМК от 0,1 до 0,3 мг/л. Экспланты верхушечных побегов ясеня обыкновенного культивировали на питательных средах MS и WPM (Woody Plant Medium), с сахарозой 30 г/л, а также применяли БАП в концентрации 2,0 - 4,0 мг/л и 0,1 мг/л ИМК.

#### Результаты и обсуждение

На питательной среде MS с половинным составом минеральных солей с добавлением БАП в концентрации от 0,2 до 3 мг/л, достигнувшие в длину 1-3 мм зародыши, далее не созревают путем накопления массы зародыша и увеличения его линейных размеров, а спонтанно начинают прорастать. Так как цитокинины, помимо стимуляции клеточного деления и роста, инициируют дифференциацию клеток и гистогенез (рис. 1).



Рисунок 1. Прорастание незрелых зародышей на среде MS с половинным составом минеральных солей.

На среде MS с половинным составом минеральных солей со стимулированием развития БАП в концентрации от 2,0 до 3 мг/л и ИМК в концентрации 0,1 мг/л происходил как рост самого зародыша, так и его дифференциация (табл. 1). Такой зародыш способен самостоятельно дать начало полноценному растению в адекватных условиях *in vitro* и далее. Это позволяет получать регенеранты напрямую, минуя дополнительный этап формирования морфогенных каллусов

Таблица 1

Регенерация незрелых зародышей *Fraxinus excelsiorin vitro* в зависимости от состава питательных сред

№ варианта опыта	Минеральная основа	Регуляторы роста, мг/л среды	Кол-во проросших зародышей, %
1	MSc половинным составом минеральных солей	БАП-2,0	23
2		БАП-3,0	28
3		БАП-2,0 + ИМК-0,1	18
4		БАП-3,0 + ИМК-0,1	24
5		БАП-2,0 + АБК	14

Прорастание на фоне абсцизовой кислоты (АБК) начиналось на 4-5 суток позже, чем в первых двух вариантах, но не подавляло рост самого зародыша. Проростки по длине побега на средах с АБК на 14–16 сутки приближались к проросткам в первых двух вариантах. Также были отмечены случаи каллусогенеза.

Из анализа полученных результатов введения апикальных меристем в культуру *invitro* следует, что на среде MS с половинным составом минеральных солей с добавлением БАП в концентрации 2,0-3,0 мг/л частота каллусообразования составила 65-73 % (табл. 2).

Таблица 2

Регенерация апикальных меристем *Fraxinus excelsiorin vitro* в зависимости от состава питательных сред

№ варианта опыта	Минеральная основа	Регуляторы роста, мг/л среды	Образование каллуса, %	Морфогенез, %
1	MS с половинным составом минеральных солей	БАП-1,0	42	34
2		БАП-2,0	65	56
3		БАП-3,0	73	59
4		БАП-2,0 + ИМК-0,1	58	54
5		БАП-2,0 + ИМК-0,3	56	48
6		БАП-3,0 + ИМК-0,1	63	58
7		БАП-3,0 + ИМК-0,3	59	46

Каллус был плотный, морфогенный, и доля побегов, образовавшихся из каллусной ткани экспланта, была максимальной – 56-59 % (рис. 2 а). Но сами побеги, по сравнению с эксплантами на среде MS с половинным составом минеральных солей с добавлением БАП в концентрации 2,0 - 3,0 мг/л и ИМК 0,1-0,3 мг/л, были менее развиты (рис. 2 б). Увеличение концентрации как БАП, так и ИМК, угнетало развитие побегов из образовавшейся каллусной ткани.



Рисунок 2. Прорастание меристем на среде MS: а – на среде MS с добавлением БАП и ИМК; б – на среде MS с добавлением БАП.

Первичные экспланты верхушечных побегов ясеня обыкновенного вводили на среду MS с БАП с концентрацией 2,0 мг/л. На 8-12-е сутки культивирования у 68,0 % эксплантов начался процесс активизации развития микропобегов. Регенеранты, пересаженные через 3 недели на среду WPM с БАП 4,0 мг/л и ИМК 0,1 мг/л, показали лучшие варианты по длине побегов, а также по длине междоузлий (рис. 3).

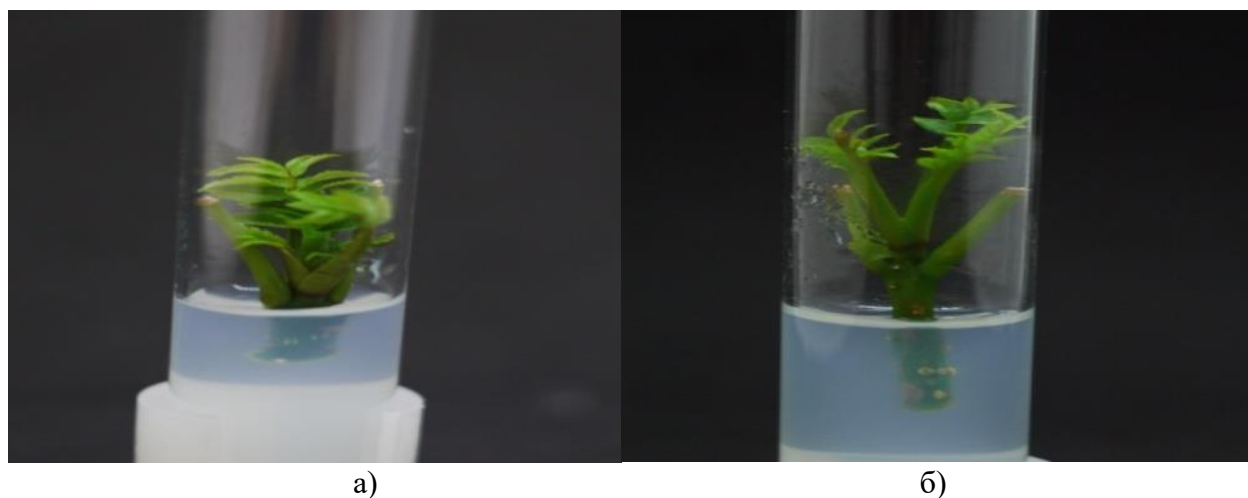


Рисунок 3. Регенеранты, культивируемые на средах: а) MS, с добавлением БАП в концентрации 4,0 мг/л; б) WPM с БАП 4,0 мг/л и ИМК 0,1.

Но коэффициент размножения здесь был ниже, чем в варианте со средой MS с добавлением БАП в концентрации 4,0 мг/л и ИМК 0,1 мг/л, и составил 3,6 – для побегов, взятых с молодых деревьев, и 2,4 – с взрослых деревьев (табл. 3).

Лучшее стимулирующее влияние на регенерацию побегов показала среда MS с концентрацией БАП 4,0 мг/л и ИМК с концентрацией 0,1 мг/л. Коэффициент размножения здесь был 4,8 - для побегов, взятых с молодых деревьев, и 2,9 – со взрослых. Добавление ИМК в среду MS существенно повлияло на длину междоузлий.

Укоренение побегов осуществляли на среде MS с добавлением нафтилуксусной кислоты. Существенного влияния культуральной среды для размножения эксплантов на последующее укоренение обнаружено не было. Эффективность ризогенеза составила 58 %.

Таблица 3.

Регенерация эксплантов побегов *Fraxinus excelsior* *in vitro* в зависимости от состава питательных сред

Минеральная основа	Регуляторы роста, мг/л	Коэффициент размножения	Длина междоузлий, мм
Побеги с молодых деревьев			
MS	БАП – 4,0	4,2	5,8
MS	БАП – 4,0+ ИМК – 0,1	4,8	7,5
WPM	БАП – 4,0	3,6	9,8
WPM	БАП – 4,0+ ИМК – 0,1	3,3	10,2
Побеги со взрослых деревьев			
MS	БАП – 4,0	2,6	5,4
MS	БАП – 4,0+ ИМК – 0,1	2,9	6,5
WPM	БАП – 4,0	2,4	9,4
WPM	БАП – 4,0+ ИМК – 0,1	2,3	9,6

### Выводы

Изучены разные варианты биотехнологических приемов клонального микроразмножения *Fraxinus excelsior*, основанные на различном составе питательных сред и концентрации регуляторов роста в среде. Наиболее подходящей средой для индукции развития незрелых зародышей является вариант со средой MS с половинным составом минеральных солей с регулятором роста БАП в концентрации 3,0 мг/л.

Наилучшие результаты для культивирования верхушечных меристем показала среда MS с половинным составом минеральных солей с концентрацией БАП 3,0 мг/л, и БАП-3,0 + ИМК-0,1 мг/л. На регенерацию верхушечных побегов наибольшее влияние оказала среда MS с БАП-4,0 + ИМК-0,1, для стимуляции роста междоузлий подходит среда WPM с БАП-4,0 + ИМК-0,1.

### Библиографический список

1. Браткова Л.Г. Введение в культуру *in vitro* меристемных эксплантов яблони разного генетического происхождения / Л.Г. Браткова, Н.Н. Цаценко // Сельскохозяйственный журнал. – 2020. - № 1(13). – С.12 – 15.
2. Зинатуллина А.Е. Структурные особенности клеток эксплантов *in vitro* и формированием морфогенных каллусов //Биомика. - 2021. – Т.13. - № 5. - С. 8 – 19.
3. Круглова Н.Н. Культура *in vitro* автономных зародышей, как модельная система для исследования стресс-устойчивости растений к абиотическим факторам // Н.Н.Круглова, А.Е. Зинатуллина и др. // Успехи современной биологии. - 2021. - Т. 141(5). - С.483-495.
4. Лебедев В.Г. Эффективный способ получения посадочного материала ясеня обыкновенного *in vitro* / В.Г. Лебедев, М.М. Шемякина, К.А. Шестибратов и др. // Лесной вестник. – 2010. - № 3. – С. 112 – 118.
5. Фирсова М.В. Особенности введения в культуру *in vitro* боярышника перстонарезанного / М.В. Фирсова, А.Ю. Набиева // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014. - № 1 (111). – С. 58 – 62.