



**МИНИСТЕРСТВО ПРИРОДНЫХ РЕСУРСОВ И ЭКОЛОГИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА**

**ФГБУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЛЕСНОЙ  
ГЕНЕТИКИ, СЕЛЕКЦИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ**

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КЛОНАЛЬНОГО  
МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ДЛЯ РАЗНОВОЗРАСТНОГО МАТЕРИАЛА  
ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО**

**Докладчик:**

**н.с. отдела лесной генетики и биотехнологии ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех»,  
О.Ю. Гусева**

**Воронеж 2024 г.**

**Цель исследований:** оптимизация основных этапов клонального микроразмножения для разновозрастного материала дуба черешчатого

**Объекты исследований:**

**Ювенильный материал (сеянцы)**



**Соматический эмбриогенез**



Незрелые желуди (зиготические зародыши)

Побеги из спящих почек, полученные в лаборатории

**Материал от взрослых деревьев (40-80-л.)**

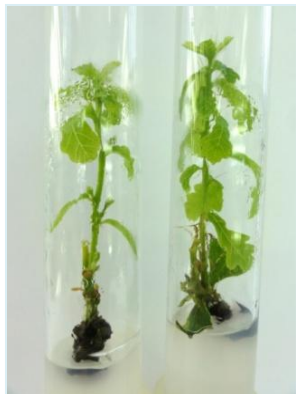
Летние побеги (стволовая поросль) в период вегетации



Побеги из спящих почек, полученные в лаборатории в зимний период

# Клональное микроразмножение ювенильного материала дуба черешчатого

## *I. Получение асептических морфогенных культур (85,0-100,0%)*



## *II. Мультипликация микрообегов in vitro. Коэффициент размножения (Km) = 4,7 hcp= 55 мм*



## *III. Ризогенез микрообегов in vitro (75%)*



## *IV. Поэтапная адаптация к нестерильным условиям (сохранность – 96%)*



# Получение асептических морфогенных культур *in vitro* от 40-летних деревьев дуба черешчатого

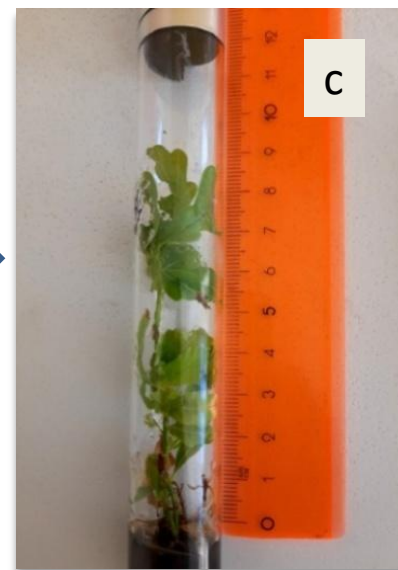
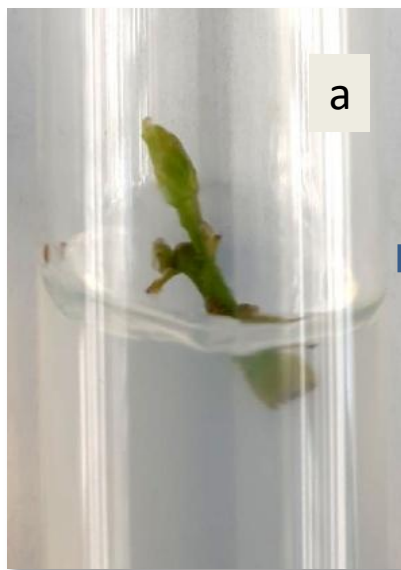
## Эффективность стерилизации и морфогенез первичных эксплантов дуба черешчатого, полученных из летних побегов

№ дерева	Количество асептических жизнеспособных культур,%*	Количество морфогенных культур,%**	
		побеги с $h \leq 15$ мм	побеги с $h > 15$ мм
57/69	$57,0 \pm 2,1$	$30,0 \pm 7,4$	$27,0 \pm 7,4$
189/36	$70,6 \pm 1,7$	$10,2 \pm 7,2$	$60,4 \pm 7,0$
6/36	$64,0 \pm 1,6$	$40,0 \pm 1,7$	$24,0 \pm 0,9$

✓Получено до 70,6% асептических жизнеспособных культур

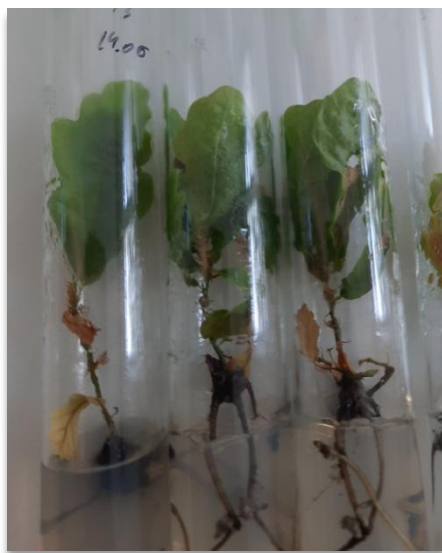
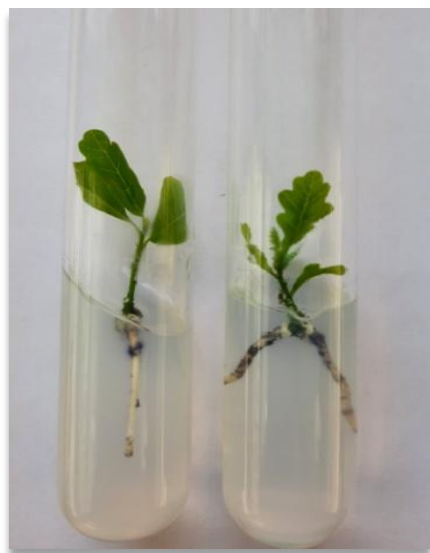
Примечание.\*Режим стерилизации – раствор мертиолята (13 минут); \*\*состав питательной среды – ВТМ + 0,2 мг/л БАП+аденин

## Морфогенез дуба черешчатого через неделю (а), 1 месяц (b) и 2 месяца (с) от начала культивирования *in vitro*





# Мультипликация и укоренение микропобегов *in vitro* от 40-летних деревьев дуба черешчатого



Вариант питательной среды	№ дерева	Средняя высота побега (хср.), мм	Коэффициент размножения, Кт
1	7/4 2	25	2,0
2		30	2,4
3		32	2,5
4		15	-
1	57/65	19	-
2		23	2,3
3		25	1,8
4		13	-
1	5/2 6	28	2,3
2		30	2,5
3		33	2,7
4		15	-

Примечание: варианты питательной среды: 1 - ВТМ+0,2 БАП, 30 г сахарозы, 2 мг/л аскорбиновой кислоты, 2 - ВТМ+0,2 БАП, 30 г сахарозы, 1 мг/л аскорбиновой кислоты, 20 мг/л аденина, 3 - ВТМ+0,2 БАП, 30 г сахарозы, 2 мг/л аскорбиновой кислоты, 20 мг/л аденина, 4 - ВТМ (безгормональная) + 20 г сахарозы, 1 мг/л аскорбиновой кислоты

## Получение опытной партии микрорастений дуба черешчатого в культуре *in vitro* от 40-летних деревьев

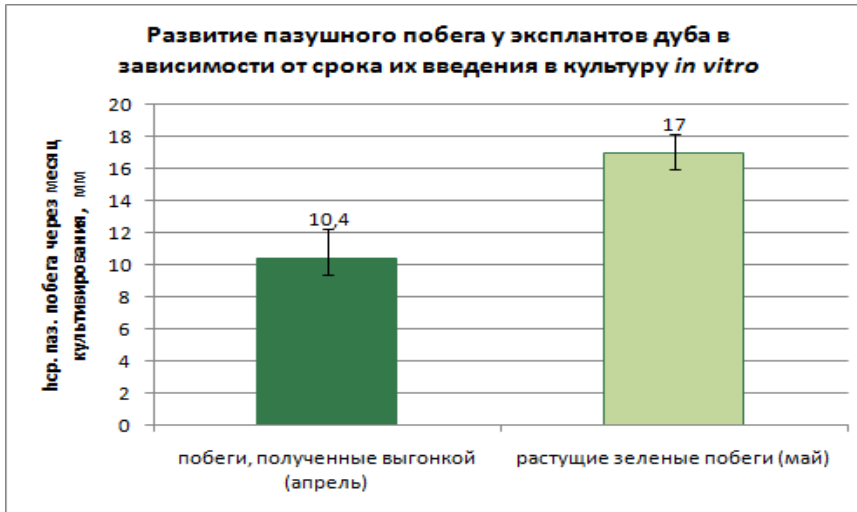
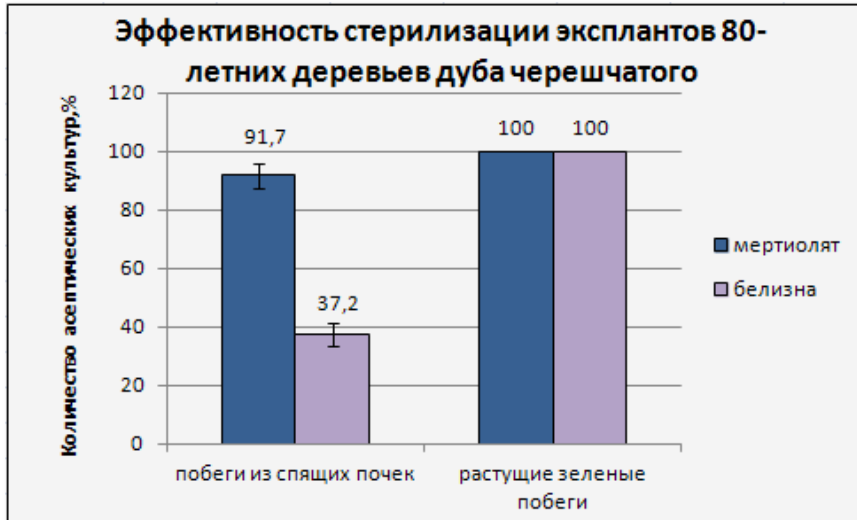


Мультипликация и укоренение микропобегов дуба черешчатого в культуре *in vitro*

- Отмечено, что значения основных показателей роста микропобегов на протяжении многократной мультипликации в пределах одного дерева оставались стабильными.
- Между испытуемыми клонами наблюдались различия по скорости роста, коэффициенту мультипликации и частоте укоренения побегов, что может быть связано с генотипическими особенностями исходных деревьев.
- Большая часть полученных от всех деревьев микропобегов прошла успешное укоренение в культуре *in vitro* (55-72%)

# Получение асептических морфогенных культур от 80-летних деревьев дуба черешчатого

Коэффициент мультипликации ( $K_m$ ) = 2,2-2,8



Стерилизация раствором белизны оказалась эффективной только для растущих зеленых побегов, взятых в мае (100%), в отличие от выгнанных растений в лаборатории в середине весны (37,2%). Количество жизнеспособных асептических культур при обработке всех эксплантов взрослых деревьев 0,02 % р-ром мертиолята составило 91,7-100%.

Более активный морфогенез наблюдался у культур, полученных поздней весной (иср. пазушного побега-17мм)

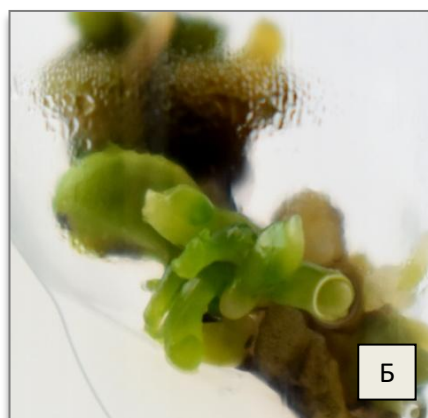
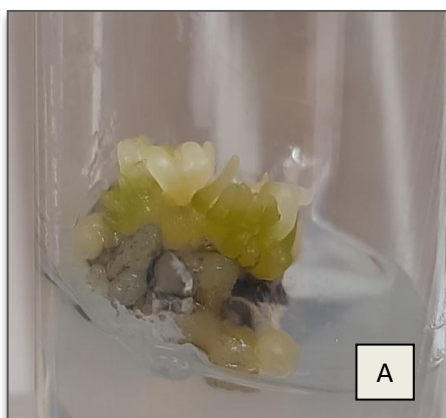


# Исследования по соматическому эмбриогенезу дуба черешчатого

Индукция соматического эмбриогенеза на зиготических зародышах



**Индукция эмбриогенного каллуса и формирование соматических зародышей на стадиях глобулы и сердечка в первый месяц культивирования в темноте**

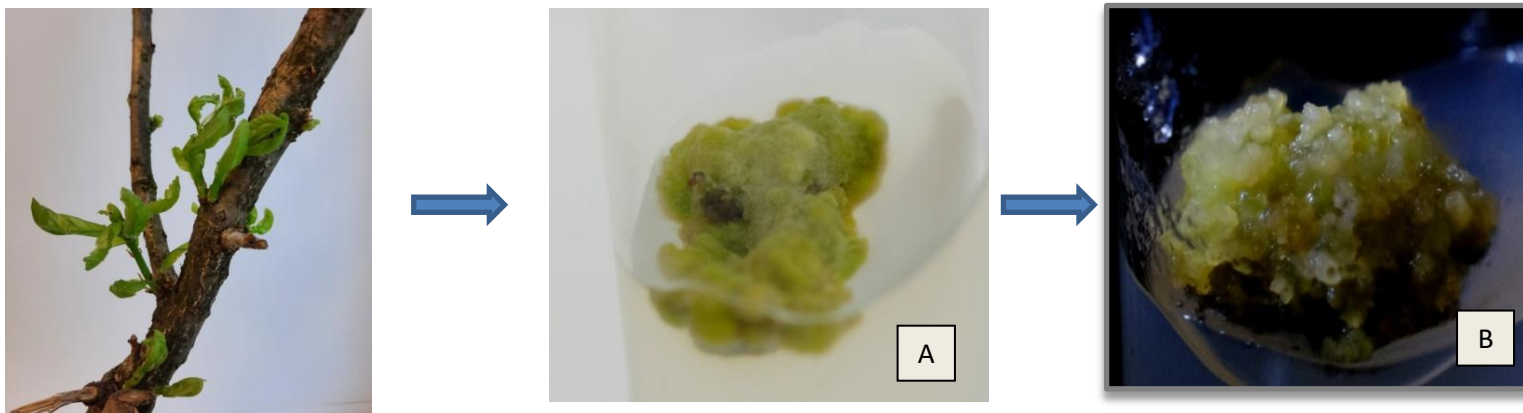


➤ *Определены условия инициации соматических эмбрионов на зиготических зародышах от 40-летнего дуба черешчатого. На питательной среде MS с  $\alpha$ -НУК и 6-БАП в темноте наблюдалось формирование соматоэмбрионов на разных стадиях развития. При переносе культур на свет происходило дальнейшее развитие зародышей*

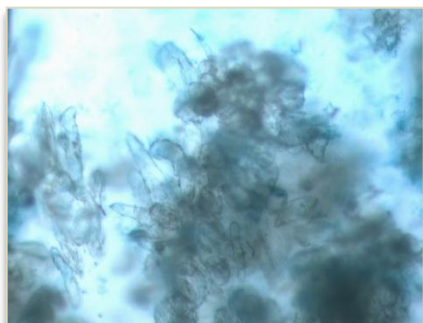
**Вторичный эмбриогенез (А) и соматические зародыши на семядольной (Б) стадии на свету**



## Получение эмбриогенного каллуса от 200-летнего дуба черешчатого



Каллусогенез на эксплантах 200-летнего дуба черешчатого в культуре *in vitro*: А – образование первичного каллуса (неэмбриогенного) через 1 месяц от начала культивирования на свету, В – вторичный каллусогенез после переноса эксплантов в темноту

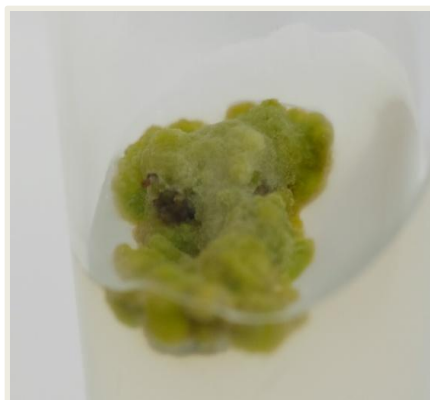


➤ Получен эмбриогенный каллус от 200-летнего дерева дуба черешчатого. В каллусной ткани, полученной из фрагментов побегов 200-летнего дерева, наблюдался процесс дифференцировки клеток, что может свидетельствовать об их переходе на путь эмбриогенеза

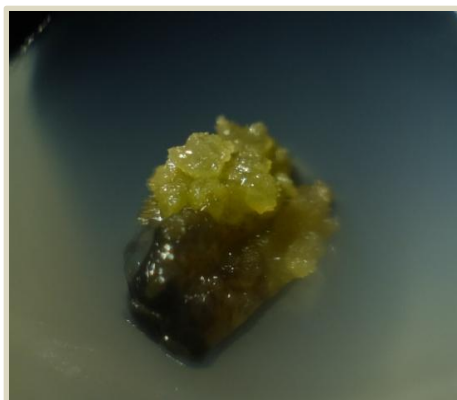
Удлинение клеток вторичного каллуса, полученного от 200-летнего дерева дуба черешчатого после культивирования в темноте на питательной среде с  $\alpha$ -НУК и 6-БАП в соотношении 2:1

## Проведение молекулярно-генетического анализа каллуса дуба черешчатого

**Цель исследования:** изучение сохранности образцов каллусных культур от 200-летнего дуба в процессе длительного культивирования *in vitro*

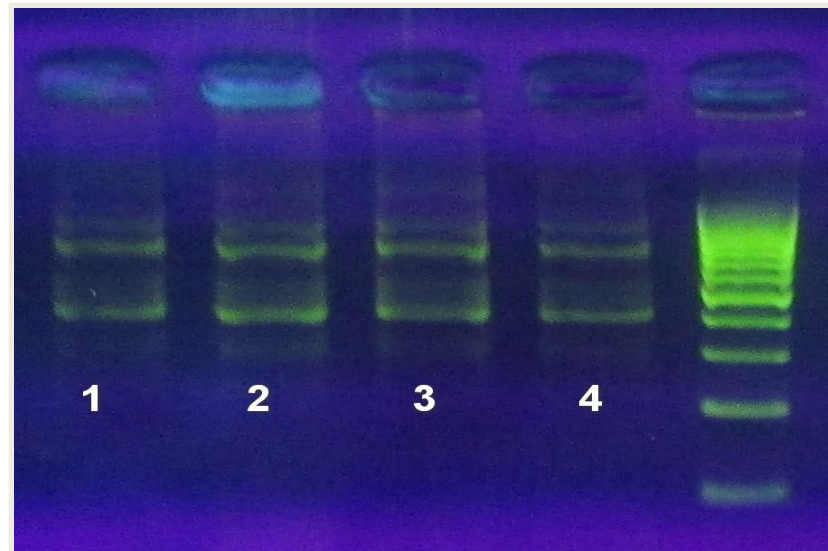


А



Б

Каллусные культуры дуба черешчатого, полученные через месяц (А) и год (Б) от начала эксплантации



Использовались маркеры межмикросателлитных (ISSR) локусов

✓ Показано соответствие продуктов амплификации ДНК из растительного материала исходного 200-летнего дерева и полученных из него каллусов, культивируемых *in vitro* в течение одного года

## Основные выводы

- Оптимизированы основные этапы клонального микроразмножения для ювенильного материала дуба черешчатого. Получено до 100% асептических культур. Коэффициент размножения ( $K_m$ ) на модифицированной питательной среде для твердолиственных пород с добавлением 0,2 мг/л цитокинина 6-БАП составил 4,7. При этом средняя длина микропобегов составляла  $h_{ср} = 55$  мм. Эффективность ризогенеза – до 75% при добавлении ИМК. Дальнейшая поэтапная адаптация микрорастений к нестерильным условиям позволила получить сохранность до 90% растений-регенерантов в условиях *ex vitro*;
- Получена опытная партия посадочного материала от ценных генотипов 40-летних деревьев дуба черешчатого. Эффективность укоренения в культуре *in vitro* составила 55-70% ;
- Получены асептические морфогенные культуры *in vitro* для побегов от 80-летних деревьев дуба черешчатого. Эффективность стерилизации для 80-летних деревьев одинаково успешно проходила с использованием раствора мертиолята. Раствор белизны показал свою эффективность только для летних порослевых побегов;
- Определены условия инициации соматических эмбриоидов на зиготических зародышах от 40-летнего дуба черешчатого на питательной среде MS с  $\alpha$ -НУК и 6-БАП. Получен эмбриогенный каллус от 200-летнего дерева дуба черешчатого. В каллусной ткани, полученной из фрагментов побегов 200-летнего дерева, наблюдался процесс дифференцировки клеток, что может свидетельствовать об их переходе на путь эмбриогенеза.





*БЛАГОДАРЮ ЗА ВНИМАНИЕ!*