

Н. В. Шахлан, техник I кат.; Д. В. Кулагин, мл. науч. сотрудник;
Е. Н. Химченко, техник I кат. (ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»)

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА НА МОРФОГЕНЕЗ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ БЕРЕЗЫ ЧЕРНОКОРОЙ

Nowadays in forestry widely used methods of biotechnology. One of such approaches—preservations of rare woody plants. The rare and a little studied from the point of view of species biology representative of genus *Betula* is *Betula obscura* Kotula. Reception of tissue culture of this plant and definition necessary for morphogenesis concentrations of plant growth regulators was the purpose of our investigation. Explant cultivation was carried out on the modified WPM containing 30 g/l sucrose, 7 g/l an agar and pH environments – 5,6–5,9. As plant growth regulators were used BA, 2ip and IBA. Strong stimulating effect of BA and 2ip, and also their combinations with IBA on processes of cellular proliferation was shown. It was determined, that optimum content of BA and 2ip in the medium for tissue culture initiation of *Betula obscura* is 5 and 15 mg/l accordingly.

Введение. В настоящее время в лесном хозяйстве все шире используются методы биотехнологии. Среди них немаловажную роль играет такой подход, как асептические культуры клеток и тканей растений. Этот подход применим как для решения сугубо научных проблем (изучение особенностей физиологии и метаболизма древесных растений), так и научно-практических задач. Такие аспекты, как сохранение редких видов и ценных генотипов древесных растений в культурах *in vitro*, массовое получение посадочного материала путем клонального микроразмножения, отбор ценных мутантных и гибридных генотипов являются характерными приложениями технологии асептических культур растений [1].

Как было сказано выше, немаловажным и перспективным направлением работ с культурами клеток и тканей является сохранение редких и исчезающих видов растений. Имеется большое количество сообщений о получении культур *in vitro* эндемичных и находящихся под угрозой исчезновения видов.

Одновременно с этим большой интерес у исследователей вызывают и культуры различных видов рода *Betula* L. *in vitro*. Одним из представителей этого рода является относительно редкое и мало изученное с точки зрения биологии вида древесное растение – береза чернокорая (*Betula obscura* Kotula). Это растение включено в дополнительный список таксонов, требующих особого внимания, или список таксонов, нуждающихся в профилактической охране (изучении, наблюдении и контроле) Красной книги Республики Беларусь. Последнее связано с тем, что данное древесное растение встречается на территории Беларуси довольно редко в виде отдельных растений или небольших групп. Охраняется береза чернокорая и в Украине, где она внесена в основной список охраняемых видов Красной книги.

Первым этапом работы с культурой тканей растений является ее получение (инициация). Для осуществления этого этапа выбирается

подходящий источник экспланта: сегменты стебля, корня, листа, отдельные почки, конусы нарастания и др. Каждый из этих источников обладает характерным для него уровнем морфогенетической активности. Выбранные в качестве эксплантов части растения подвергаются поверхностной стерилизации и в последующем переносятся на питательные среды различного состава. В случае, если компоненты питательных сред подобраны в необходимом отношении, клетки эксплантов начинают пролиферировать, что в конечном счете приводит к формированию каллуса – неструктурированной клеточной массы или началу морфогенеза – процессу образования упорядоченных по гистологическому строению структур.

Изучение особенностей морфогенеза конкретного растения служит как для расширения знаний о чертах физиологии того или иного рода, так и для определения эффективной схемы получения полноценных растений-регенерантов, которые в свою очередь появляются только после протекания органогенеза или соматического эмбриогенеза в культуре тканей. Последнее указывает на большое значение методики регуляции морфогенеза *in vitro*. Исследования морфогенеза в культуре тканей проводятся на тысячах видах растений [2].

Направленность морфогенетических процессов в культуре тканей растений главным образом зависит от содержания регуляторов роста в средах для культивирования, их минерального состава. Несколько меньший вклад в ход морфогенеза вносят источник экспланта, освещенность и температура, при которой осуществляется культивирование.

Имеется большое количество публикаций, посвященных морфогенезу у различных представителей рода *Betula* (карликовая, пушистая, повислая, карельская, далекарлийская, красная и др.). Работы с культурами тканей березы проводились в Германии, Финляндии, Норвегии, Канаде и других странах мира. Для некоторых видов березы имеются сведения о регенерационной

способности листовых эксплантов, разработаны протоколы, позволяющие получить растение-регенерант из каллуса листового происхождения. Основное внимание исследователей при этом было уделено оптимизации гормонального состава среды для повышения органогенной способности листьев. При этом в качестве регуляторов роста цитокининовой природы преимущественно используются 6-бензиламинопурин (БАП) и зеатин. Из веществ-аналогов ауксина – индолилмасляная кислота (ИМК). Несмотря на большое количество публикаций, посвященных различным аспектам морфогенеза и регенерации растений рода *Betula*, практически отсутствуют сведения о поведении такого вида как береза чернокорая в культуре тканей. Таким образом, целью нашей работы было получение культуры тканей березы чернокорой и определение необходимого для морфогенеза в них соотношения регуляторов роста [3–8].

Материалы и методы. В качестве источника материала использовалось дерево березы чернокорой, произрастающее на территории Буда-Кошелеевского лесхоза. Сбор материала производился в ноябре 2008 г.

Часть собранных однолетних побегов была оставлена при комнатной температуре в условиях досветки для индукции распускания почек.

В качестве эксплантов использовались листья, полученные из распустившихся почек. При отсечении листьев сохранялся небольшой фрагмент черешка (3–7 мм). Стерилизация эксплантов включала 2 этапа: предстерилизацию и непосредственно стерилизацию. Первый этап заключался в обработке листьев поверхностно-активными веществами с последующим их промыванием в проточной водопроводной воде в течение 2,5 ч. Непосредственно стерилизация состояла в обработке эксплантов сначала 0,01%-ным раствором диацета в течение 3 мин, а затем 70%-ным раствором этилового спирта, также в течение 3 мин. После стерилизации осуществлялось 3-кратное отмывание листьев стерильной дистиллированной водой. Помимо описанного выше способа стерилизации нами был апробирован его вариант, в котором вместо диацета использовалось дезинфицирующее средство «Гексадекон». В случае наличия бактериального роста на среде после посадки экспланты подвергались повторной стерилизации по схеме, представленной выше.

После стерилизации при помощи стерильной фильтровальной бумаги с поверхности эксплантов удалялись остатки воды. На каждом экспланте с помощью скальпеля делали несколько насечек на листовых пластинках. Затем листья помещали на среду либо абаксиальной, либо адаксиальной стороной.

Основу питательной среды составляла смесь неорганических веществ WPM. Витамины и микроэлементы добавляли по прописи Мурасиге и Скуга [9]. Среда для культивирования включала 30 г/л сахарозы, pH составлял 5,6–5,9. В качестве уплотнителя использовался пищевой агар в концентрации 7 г/л. В качестве регуляторов роста испытывались БАП, 2ip (N⁶-(изопентен-2-ил) аденин), ИМК. В качестве контроля использовалась модифицированная WPM без добавления аналогов фитогормонов. Автоклавирование среды осуществлялось при 121°C в течение 50 мин.

Материал культивировался при температуре (25 ± 1)°C, при постоянном освещении интенсивностью 2000–3000 лк или в темноте.

Наблюдения за состоянием и ростом культур осуществлялись ежедневно. Учет результатов осуществлялся через каждые 15 дней. Оценивались такие показатели, как цвет экспланта, его жизнеспособность, наличие каллусообразования и морфогенеза.

Результаты и обсуждение. При введении в культуру различных видов растений некоторая часть эксплантов теряется из-за контаминации. Эти потери можно уменьшить применением более эффективных против микробных клеток препаратов. В ходе проводившейся нами работы при стерилизации листовых эксплантов с использованием диацета доля потерянных по причине контаминации эксплантов не превышала 20%. Применение альтернативного основного стерилизующего агента – антисептика «Гексадекон» – вызвало гибель 100% эксплантов через сутки после стерилизации, что говорит о низкой селективности действия данного препарата по отношению к микробным клеткам и тканям растений.

После стерилизации листовые экспланты переносились на среды для культивирования. Индукцию каллуса отмечали спустя 10–15 дней культивирования как на свету, так и в темноте. В процессе культивирования в темновых условиях развитие каллуса отмечалось на всей поверхности листа, а при освещении каллус формировался только на черешке. В большинстве случаев образование каллусной ткани отмечали на абаксиальной стороне листа. Таким образом, существенным для индукции пролиферации клеток листовой пластинки является как ориентация исходного экспланта, так и физические условия культивирования.

Отличия между питательными средами заключались лишь в содержании регуляторов роста. В ходе работы нами было определено влияние таких цитокининов, как БАП и 2ip, а также синтетического ауксина ИМК на эффективность инициации культуры тканей чернокорой березы. Действие БАП в различных кон-

центрациях, а также его комбинации с ИМК демонстрируют рис. 1 и 2.

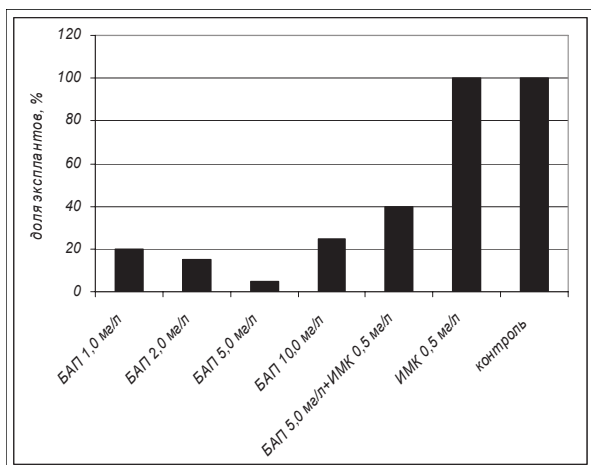


Рис. 1. Доля эксплантов, некротировавших после 30 дней культивирования на средах с различным содержанием стимуляторов роста

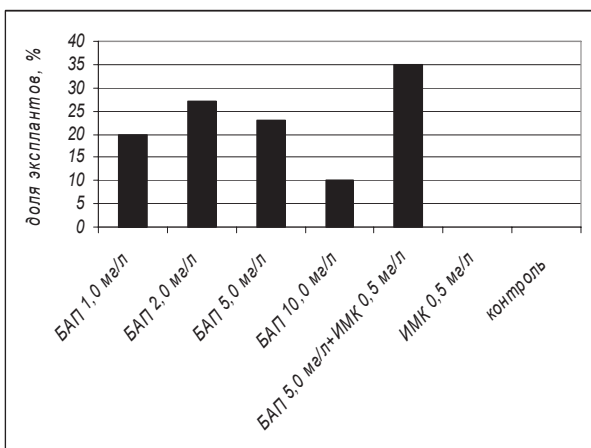


Рис. 2. Доля эксплантов, на которых наблюдалось развитие органогенного каллуса после 45 дней культивирования

Как видно из приведенных диаграмм, наименьшее число некротизировавших эксплантов и наибольшее количество случаев индукции морфогенеза приходится на концентрации БАП 2 и 5 мг/л. Очевидно именно это концентрация БАП оптимальна для инициации культуры тканей березы чернокорой. Следует отметить, что совмещение в одной среде цитокинина БАП и ауксина ИМК заметно увеличило количество эксплантов, на которых началось каллусообразование. Применение ИМК без цитокининов приводит к отмиранию тканей экспланта.

Другим синтетическим цитокинином, влияние которого оценивалось в наших экспериментах, был 2ip. Данные, полученные при работе с ним, приведены на рис. 3 и 4. Как видно из рис. 3, в случае применения некоторых концентраций 2ip не происходит отмирания эксплантов. Эта концентрация близка к 15 мг/л. Однако следует заметить, что как увеличение

этой концентрации, так и ее уменьшение приводит к заметному увеличению количества некротизировавших эксплантов.

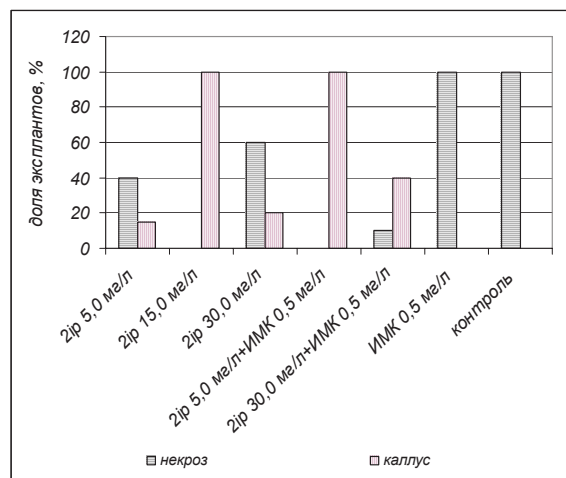


Рис. 3. Доля эксплантов, некротизировавшая после 30 культивирования (поперечная штриховка) и эксплантов, давших начало каллусу после 30 дней культивирования (продольная штриховка)

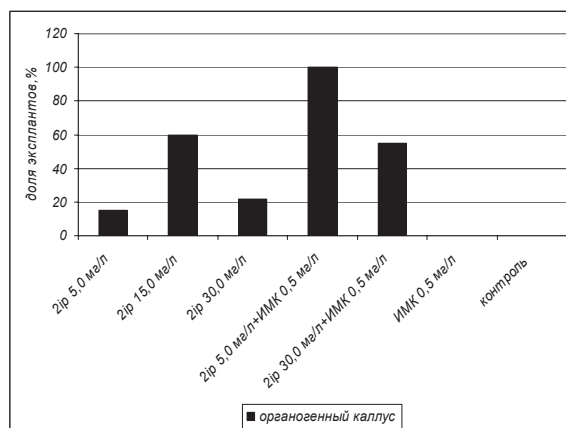


Рис. 4. Доля эксплантов, давших начало органогенному каллусу после 45 суток культивирования

Из рис. 4 видно, что именно концентрация 2ip 15 мг/л вызывает заметное увеличение количества эксплантов с развивающимся на них органогенным каллусом. Количество таких эксплантов в случае использования 2ip заметно больше, и развитие каллуса наступает заметно раньше, чем в случае применения БАП. Совместное применение цитокинина 2ip и ауксина ИМК, как и в предыдущем случае, дает наилучшие результаты. Одновременное присутствие в среде 2 основных классов растительных гормонов (цитокинины и ауксины) сильнее стимулирует морфогенез. Последнее, по всей вероятности, связано с близостью такого сочетания к естественному уровню эндогенных стимуляторов роста.

Следует отметить, что при концентрации 2ip и ИМК 5 и 0,5 мг/л соответственно все эксплан-

ты дают начало органогенному каллусу. Однако при таком соотношении регуляторов роста в качестве органогенеза протекает только ризогенез, что делает применение такого соотношения регуляторов роста малоприменимым для получения полноценных растений в условиях *in vitro*.

В данном случае показательным является избирательность действия тех или иных регуляторов роста растений, относящихся к одному и тому же классу. Такая избирательность представляет интерес не только с точки зрения разработки эффективной методики управления морфогенезом, но и с точки зрения изучения биологии конкретного вида растений. Так, неэквивалентность действия различных регуляторов роста может быть связана с особенностями строения сигнальных путей того или иного вида растений.

В различных вариантах опытов нами было получено каллусообразование, на некоторых из получаемых каллусов начался ризогенез. Однако несомненный интерес представляет подбор условий, при которых на эксплантах или из полученной каллусной ткани начнутся формироваться полноценные растения-регенеранты.

Заключение. Использование нами листовых эксплантов позволило получить каллусные культуры березы чернокорой.

Показано, что добавление регуляторов роста в среду для культивирования является обязательным условием инициации культуры тканей.

Среди проверявшихся регуляторов роста наилучшие результаты были получены в присутствии 2ip, на всех средах с этим аналогом цитокининов началось каллусообразование и ризогенез.

Наилучшие результаты дало применение сред, одновременно содержащих 2ip и ИМК. Так, все экспланты на среде, содержащей 5 мг/л 2ip и 0,5 мг/л ИМК, дали начало каллусным культурам, в которых начались процессы морфогенеза.

Литература

1. Перспективы использования биотехнологии в лесном хозяйстве / И. И. Концевая [и др.] // Лесн. и охотн. хоз-во. – 2007. – № 1. – С. 26–28.
2. Катаева, Н. В. Клональное микроразмножение растений / Н. В. Катаева, Р. Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
3. Концевая, И. И. Морфогенез в культуре тканей березы / И. И. Концевая, А. А. Яцына // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2003. – Вып. 56: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 70–77.
4. Концевая, И. И. Влияние цитокининов на морфогенез в культуре листовых эксплантов березы / И. И. Концевая // Сб. науч. тр. / Ин-т леса НАН Беларуси. – Гомель, 2008. – Вып. 68: Проблемы лесоведения и лесоводства. – С. 205–213.
5. Plantlet differentiation in leaf and root cultures of birch (*Betula pendula* Roth) / P. S. Srivastava [et al.] // Plant cell, tissue and organ cult. – 1990. – Vol. 21. – № 1. – P. 51–54.
6. Simola, L. K. Nitrogen metabolism of leaf and microspores callus of *Betula pendula* / L. K. Simola // Primary and secondary metabolism of plant cell cultures. – 1985. – P. 74–84.
7. Valobra, C. P. *In vitro* shoot regeneration from leaf discs of *Betula pendula* «Dalecarlica» EM 85 / C. P. Valobra, D. J. James // Plant cell, tissue, and organ culture. – 1990. – Vol. 21. – P. 51–54.
8. Chalupa, V. Micropropagation of mature trees of birch (*Betula pendula* Roth) and aspen (*Populus tremula* L.) / V. Chalupa // Lesnictví. – 1989. – Vol. 35. – № 11. – P. 983–993.
9. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. A. Scoog // Physiol. plant. – 1962. – Vol. 15. – № 13. – P. 473–497.