

УДК 630\*161.4

**А. В. Константинов**, аспирант, младший научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси)**АНАЛИЗ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ  
ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА СОМАКЛОНАЛЬНЫХ ГЕНОТИПОВ  
МЕЖВИДОВОГО ГИБРИДА *BETULA PENDULA* × *PUBESCENS***

Были изучены морфофизиологические особенности растений-регенерантов различных соматоклональных линий, полученных способом непрямого морфогенеза из листовых эксплантов гибрида *B. pendula* × *pubescens*. Показано различие ростовых характеристик микроклональных саженцев на последнем пассаже *in vitro* и после двух месяцев их выращивания *ex vitro*. Ряд новых генотипов характеризуется интенсивным кущением и формированием большого количества междоузлий.

Clonally propagated birch seedlings of 10 somaclonal lines derived from leaf explant of hybrid *B. pendula* × *pubescens* were acclimatized to soil conditions. Morphometric parameters of regenerated plants from different lines were studied in *in vitro* and *ex vitro* conditions. The difference of the growth characteristics of plantlets were observed both during the last passage *in vitro* and after two months of cultivation *ex vitro*. A number of genotypes characterized by intense bushing and the formation of a large number of internodes.

**Введение.** Виды рода Береза (*Betula* spp.) занимают важное место в лесной отрасли стран Северной и Восточной Европы. Особый интерес представляют мейотические триплоиды березы, получаемые путем скрещивания тетраплоидной ( $4n = 56$ ) березы пушистой и диплоидной березы повислой ( $2n = 28$ ). Получаемые в результате гибриды *Betula pendula* × *pubescens*, зачастую отличающиеся быстрым ростом, прочной устойчивой к гнилям древесиной, декоративностью и являются перспективным материалом для селекционной работы, в том числе с использованием биотехнологических методов [1].

Исследования по культуре тканей древесных растений объединяют фундаментальное и прикладное направления, позволяющие получать новые генотипы на основе исходного материала, культивируемого в условиях *in vitro*, в связи с усилением частоты и спектра генетической изменчивости в результате изменения гормонального баланса в тканях экспланта после его выхода из-под контроля организма. Ткани листа растения изначально содержат значительное число анеуплоидных и полиплоидных клеток, в связи с чем их дедифференциация и последующая регенерация растений из каллусной ткани эффективны для получения уклоняющихся форм (соматоклональных вариантов) [2, 3]. Самым простым методом, позволяющим обнаружить соматоклональные изменения у растений, является их морфологическая оценка.

Биоморфологические проявления соматоклональной изменчивости часто схожи с морфозами (ненаследуемыми эпигенетическими изменениями), являющимися обратимыми и выражающимися в изменении ростовых показателей, интенсивности ветвления и способности к укоренению. Часто подобные явления происходят в результате воздействия культуральных условий [4].

Существует необходимость различать морфозы и соматоклональную изменчивость. Сохранение признака в процессе микроклонирования и после выведения регенерантов из условий *in vitro* является подтверждением его устойчивого наследования [5].

В связи с вышесказанным, целью работы являлся анализ морфометрических показателей развития растений-регенерантов соматоклональных линий березы.

**Основная часть.** Материалом для исследований служили линии соматоклональных регенерантов гибридной березы № 52-84/8. Указанные культуры тканей были получены способом непрямого морфогенеза из соматических тканей листьев плюсового дерева, отобранного сотрудниками Института лесного хозяйства Литвы (Каунас). Культивирование развившихся регенерантов после отделения от каллуса проводили отдельно на среде WPM (G. Lloyd & B. McCown, 1980) без регуляторов роста с присвоением номеров разным линиям. Материал культивировали на протяжении шести пассажей продолжительностью три месяца. Использование безгормональных сред для поддержания перевиваемой коллекции позволяло исключить влияние регуляторов роста на морфологию регенерантов. Визуально выделили 10 линий различной морфологии, одна из которых была принята за контроль (наиболее типичного для микропобегов березы морфотипа). Для каждой культуры был проведен RAPD-анализ полиморфных локусов с использованием пяти праймеров Oligo 1, 3, 5, 6, 8 и 9, в результате которого установили генетическую разнородность материала.

На последнем пассаже перед перенесением в почву растения выращивали два месяца для обеспечения высокой (94–98%) укореняемости регенерантов.

Адаптацию микрорастений березы проводили в кассетах по 54 ячейки объемом 70 мл в субстрате, представляющем собой смесь нераскисленного торфа и песка в соотношении 3:1. Выращивание растений осуществляли под фитолампами марки Osram Fluora (освещенность 1,5–2,0 тыс. лк, фотопериод 16/8) при температуре 21–23°C. Процесс акклиматизации включал два этапа, на первом кассеты помещали в климатическую камеру, для обеспечения относительной влажности воздуха около 90–95% в течение 30 суток. После чего посадочный материал выращивался в сходных условиях, но без контроля влажности воздуха в течение месяца. Непосредственно перед высадкой растений в субстрат определяли высоту стволика и длину главного корня (мм), количество междоузлий, корней и боковых побегов. В конце периода адаптации проводили изучение аналогичных параметров, дополнительно определяли диаметр стволика (мм), сырую и сухую массу растений (мг) для расчета их оводненности (%). Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета анализа *Microsoft Excel*. Для определения достоверных различий между вариантами опыта и контролем использовали *t*-критерий Стьюдента.

В ходе визуальной оценки отмечено различие морфологических признаков линий соматоклональных регенерантов, полученных на основе клона триплоидного гибридного генотипа березы. Значительные изменения морфотипа отмечались у регенерантов линий SC1, SC2 и SC9. На последнем пассаже *in vitro* перед перенесением в нестерильные условия *ex vitro* они характеризовались интенсивным ветвлением (до 11 побегов на 1 растение у линии SC1) и значительной утолщенностью, при этом отмечалось слабое развитие листовых пластинок по сравнению с другими вариантами. Так у линий SC1 и SC2 их длина не превышала 7 мм, а у растений линии SC9 наблю-

далась почти полная редукция листьев, кроме того они были практически лишены черешков. Особенности развития побега у растений были следующими: удлиненные междоузлия (10–15 мм и более) чередовались с укороченными (менее 0,5 см), при этом интенсивное ветвление наблюдалось

на укороченных междоузлиях. Соматоклоны гибридной березы линий SC1, SC2 и SC9 имели значительно большее количество междоузлий (от  $15,8 \pm 5,3$  до  $22,9 \pm 7,5$  шт.) по сравнению с контрольным вариантом ( $6,8 \pm 2,4$  шт.) и другими линиями. Средняя высота побега регенерантов после двух месяцев культивирования *in vitro* была равна  $38,8 \pm 10,2$  мм и  $25,3 \pm 5,5$  мм у регенерантов линий SC2 и SC9 соответственно, что достоверно ниже показателей у растений линий SC4 и SC6 ( $65,5 \pm 9,6$  и  $60,9 \pm 14,5$  мм). При этом в контрольном варианте (линия SC10) значение изучаемого показателя было равно  $40,3 \pm 9,8$  мм, что свидетельствует о разнородности влияния соматоклональной изменчивости на ростовые характеристики растений-регенерантов.

Наряду с усиленным ветвлением растений отдельных линий наблюдались изменения показателей средней длины их главного корня. Так, значения данного показателя составляло  $11,0 \pm 3,0$  мм,  $13,0 \pm 6,4$  мм и  $5,9 \pm 2,5$  мм для растений линий SC1, SC2, SC9, что достоверно ниже показателей контрольных растений ( $31,9 \pm 17,9$  мм). Количество корней, образованных после двух месяцев культивирования, достоверно не отличалось по вариантам. Кроме того, у регенерантов линий SC1 и SC9 наблюдали формирование каллуса у основания побегов, чего не отмечали в других вариантах.

Морфометрические показатели соматоклональных растений-регенерантов различных линий гибридной березы представлены в табл. 1.

Таблица 1

**Морфометрические показатели соматоклональных регенерантов гибридной березы различных линий перед высадкой в почвенные условия**

Линия	Длина главного побега, мм	Количество побегов на регенерант, шт.	Количество междоузлий на регенерант, шт.	Длина главного корня, мм	Количество корней на регенерант, шт.
SC1	$46,7 \pm 11,0$	$8,6 \pm 2,9$	$22,9 \pm 7,5$	$11,0 \pm 3,0$	$2,2 \pm 0,8$
SC2	$38,8 \pm 10,2$	$5,1 \pm 1,7$	$16,9 \pm 5,5$	$13,0 \pm 6,4$	$2,0 \pm 1,3$
SC3	$51,5 \pm 9,2$	$1,5 \pm 0,7$	$6,9 \pm 2,5$	$20,7 \pm 10,1$	$2,3 \pm 0,8$
SC4	$65,5 \pm 9,6$	$1,3 \pm 0,6$	$7,4 \pm 2,2$	$24,2 \pm 12,1$	$2,9 \pm 1,0$
SC5	$57,8 \pm 11,5$	$1,6 \pm 0,6$	$7,0 \pm 2,4$	$27,4 \pm 16,2$	$2,9 \pm 0,9$
SC6	$60,9 \pm 14,5$	$1,5 \pm 0,5$	$6,4 \pm 2,3$	$28,3 \pm 20,1$	$2,8 \pm 1,2$
SC7	$52,5 \pm 10,2$	$1,2 \pm 0,4$	$6,7 \pm 2,3$	$21,7 \pm 15,8$	$2,1 \pm 1,0$
SC8	$50,9 \pm 12,1$	$1,5 \pm 0,8$	$6,7 \pm 1,8$	$19,9 \pm 13,4$	$2,8 \pm 1,1$
SC9	$25,3 \pm 5,5$	$3,8 \pm 1,4$	$15,8 \pm 5,3$	$5,9 \pm 2,5$	$2,0 \pm 0,9$
SC10	$40,3 \pm 9,8$	$1,1 \pm 0,3$	$6,8 \pm 2,4$	$31,9 \pm 17,9$	$3,1 \pm 1,3$

Таблица 2

**Морфометрические и количественные показатели соматоклональных регенерантов гибридной березы различных линий после двух месяцев адаптации *ex vitro***

Линия	Длина главного побега, мм	Количество побегов на растение, шт.	Количество междоузлий на растение, шт.	Длина главного корня, мм	Количество корней на растение, шт.	Диаметр стволика, мм	Сырая фитомасса, мг	Сухая фитомасса, мг
SC1	127,6 ± 38,0	6,1 ± 2,8	45,9 ± 17,1	61,7 ± 27,8	4,3 ± 1,5	1,7 ± 0,5	533,3 ± 400,3	126,7 ± 81,6
SC2	114,5 ± 28,3	4,8 ± 2,2	36,7 ± 9,7	100,0 ± 26,7	3,2 ± 0,8	1,7 ± 0,4	745,0 ± 336,5	148,3 ± 100,1
SC3	128,9 ± 35,6	1,6 ± 0,8	14,1 ± 3,5	122,2 ± 40,3	6,0 ± 2,0	0,9 ± 0,4	541,7 ± 215,7	200,0 ± 82,0
SC4	154,4 ± 30,1	2,0 ± 0,9	16,2 ± 4,2	94,8 ± 32,0	8,2 ± 3,1	1,6 ± 0,5	598,3 ± 334,2	125,0 ± 48,1
SC5	121,8 ± 18,7	2,2 ± 0,8	19,6 ± 5,0	108,0 ± 33,7	6,2 ± 1,2	0,9 ± 0,2	638,3 ± 179,2	148,3 ± 84,0
SC6	128,8 ± 19,0	1,5 ± 0,6	13,2 ± 3,2	95,5 ± 27,3	5,3 ± 1,9	1,3 ± 0,4	456,7 ± 206,8	125,0 ± 31,5
SC7	124,9 ± 31,2	1,6 ± 0,8	16,1 ± 4,4	79,2 ± 33,8	5,0 ± 2,1	0,8 ± 0,3	331,7 ± 305,2	101,7 ± 45,4
SC8	118,3 ± 27,9	1,7 ± 0,8	17,1 ± 5,0	73,5 ± 24,2	7,7 ± 1,2	1,0 ± 0,9	356,7 ± 174,8	65,0 ± 78,2
SC9	53,2 ± 17,9	6,1 ± 2,5	32,9 ± 10,9	33,3 ± 19,2	5,7 ± 2,8	0,6 ± 0,1	201,7 ± 96,6	41,7 ± 29,9
SC10	113,3 ± 23,8	2,1 ± 1,0	22,7 ± 6,4	69,3 ± 37,9	7,2 ± 1,5	0,8 ± 0,3	500,0 ± 362,0	126,7 ± 81,6

Морфометрические и количественные показатели соматоклональных регенерантов гибридной березы различных линий после двух месяцев адаптации *ex vitro* представлены в табл. 2.

Показатели средней высоты стволика саженцев гибридной березы достоверно не отличались в большинстве вариантов (113,3 ± 23,8 мм в контроле), исключение составляли саженцы линии SC9 (53,2 ± 17,9 мм). Сохранилась тенденция к усиленному ветвлению растений линий SC1, SC2 и SC9 (4,8–6,1 шт. побегов на саженец) в то время как их количество в других вариантах варьировало от 1,6 ± 0,8 шт. до 2,2 ± 0,8 шт. Соответственно и среднее количество междоузлий растений указанных линий превышало показатели ряда других вариантов. Так, среднее значение показателя для линии SC1 в пересчете на одно растение составляло 45,9 ± 17,1 шт., а в контроле – 22,7 ± 6,4 шт. Среднее количество корней на растение варьировало от 4,3 ± 1,5 до 8,2 ± 3,1 шт. на саженец и достоверно не отличалось по вариантам, за исключением линии SC2 (3,2 ± 0,8 шт.). Аналогично не отмечено достоверных отличий показателей средних диаметров стволиков.

Максимальная приживаемость микроклональных регенерантов (100%) отмечена для растений линий SC3, SC5 и SC6, а минимальная (44,4%) – для регенерантов SC9. В контроле данный показатель был равен 53,7%.

Содержание воды в растениях (соотношение разницы между сырой и сухой массой к сухой массе) после двух месяцев выращивания *ex vitro* колебалось по вариантам. Высокий уровень оводненности (80,1 и 81,8%) отмечен со-

ответственно для растений линий SC2 и SC8. Минимальный показатель получен для линии SC3 и был равен 63,1%. Оводненность растений контрольной группы составила 74,7%, а в остальных вариантах 72,6–79,1%. Подобные отклонения говорят о выраженных различиях водного обмена у растений соматоклональных линий, что может определять их различную потребность в воде в естественных условиях.

**Закключение.** Таким образом, в ходе проведения эксперимента и изучения морфометрических параметров соматоклональных растений триплоидного гибридного генотипа березы была выявлена значительная морфологическая изменчивость отдельных линий полученных способом непрямого морфогенеза.

### Литература

1. Бородин Н. А. Полиплоидия в интродукции древесных растений. М.: Наука, 1982. 176 с.
2. Ветчинникова Л. В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. / отв. ред. А. Ф. Титов; Ин-т леса Карельского научного центра РАН. М.: Наука, 2005. 269 с.
3. Картель Н. А., Кильчевский А. В. Биотехнология в растениеводстве: учебник. Минск: Тэхналогія, 2005. 310 с.
4. Проявление соматоклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений / В. Г. Лебедев [и др.] // Известия ТСХА, 2012. Вып. 1. С. 153–163.
5. Хон Б., Денис Э. М. Мобильность генома растений. М.: Агропромиздат, 1990. 271 с.

Поступила 05.02.2014