

УДК 630\*161.4:634.23:581.17

**А. В. Константинов**

Институт леса Национальной академии наук Беларуси

**ОСОБЕННОСТИ РАЗВИТИЯ РЕГЕНЕРАНТОВ БЕРЕЗЫ (*BETULA SPP.*) НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ КИСЛОТНОСТИ**

Кислотность минерального раствора является одним из основных показателей, определяющих химический баланс питательной среды. В статье представлены результаты изучения процессов морфогенеза микрорастений на культуральных средах с различным показателем pH. На основании анализа биоморфологических показателей растений-регенерантов березы повислой, березы пушистой и гибридной березы, показаны их различное отношение к фактору кислотности. Выращивание регенерантов проводили в течение трех месяцев на модифицированной среде для древесных растений WPM без фитогормонов с доведением кислотности до 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 или 8,0 pH. По результатам экспериментов выявлена относительная толерантность микрорастений гибридной березы к подкислению pH среды. Для культивирования регенерантов березы пушистой следует применять среды с 5,0–6,0 pH, для березы повислой – 7,0–8,0 pH, на которых у них наиболее успешно проходят процессы мультимпликации микропобегов и корнеобразования *in vitro*. Таким образом, выявлены специфические морфогенетические реакции регенерантов березы на культивировании в контролируемых условиях при различных уровнях pH среды, заключающиеся в изменении интенсивности процессов их роста и развития. Указанный прием можно использовать в качестве доступного дешевого, в сравнении с применением фитогормонов, инструмента для регуляции скорости ростовых процессов и повышения эффективности клонального размножения растений для массового получения селекционного посадочного материала различных видов и гибридов березы.

**Ключевые слова:** береза, культивирование *in vitro*, регенеранты, pH, морфогенез.

**A. V. Konstantinov**

Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus

**THE FEATURES OF BIRCH (*BETULA SPP.*) REGENERANTS DEVELOPMENT ON NUTRIENT MEDIUM WITH THE VARIOUS LEVELS OF ACIDITY**

The acidity of the mineral mixture is one of the key indicators that determine the chemical balance of the medium. The paper shows the results of studying the processes of microplants morphogenesis on culture media with different indices of pH. Based on the analysis of biomorphological parameters of silver birch, white birch and hybrid birch regenerants, showing their different attitudes to the factor of acidity. The regenerants growing was carried out for three months on a modified WPM medium for woody plants without growth regulators with bringing acidity to 4.0; 5.0; 6.0; 7.0 or 8.0 pH. The experimental results revealed the relative tolerance of hybrid birch microplants to the level of the medium pH. For the cultivation of silver birch regenerants should be used medium with 7.0–8.0 pH, for white birch 5.0–6.0 pH. In these environments, the most successful are processes of microshoots multiplication and rooting *in vitro*. In such a way, the variation of the pH level of culture medium leads to a change in the intensity of the birch regenerants morphogenesis processes. The above technique can be used as available and cheap admission in comparison with application of phytohormones, to change the speed of growth processes and improve the efficiency of micropropagation for mass production of breeding birch planting stock.

**Key words:** birch, cultivation *in vitro*, regenerants, pH, morphogenesis.

**Введение.** Уровень кислотности среды определяет доступность питательных веществ для растений *in vitro*. Известно, что сильнокислые или щелочные среды лимитируют поступление некоторых элементов, например, фосфора и железа, делая их относительно нерастворимыми, и ограничивают тем самым рост растений. В то же время при высоком pH другие элементы переходят в растворенное состояние и становятся токсичными для эксплантов [1].

Разработка эффективных методик клонального микроразмножения невозможна без

применения новых подходов к повышению коэффициента мультимпликации растений и интенсивности их укоренения *in vitro* [2]. В наибольшей степени это относится к новым формам и сортам древесных растений, мутантным и полиплоидным генотипам [3], массовое получение селекционного посадочного материала которых в культуре тканей следует осуществлять с минимальным использованием регуляторов роста для снижения риска возникновения нежелательных соматоклональных вариаций [4].

Для культивирования микрорастений березы водородный показатель питательных сред устанавливается обычно в пределах 5,6–5,8 рН [5, 6] для сохранения гелеобразующих свойств агара и обеспечения поступления веществ в растущую ткань [7], однако эти условия не всегда являются оптимальными и могут существенно варьировать для растений различных таксонов.

Задачей данной работы было изучение влияния питательных сред с различным уровнем кислотности на развитие *in vitro* регенерантов березы различных таксонов.

Объектом исследования являлись клоны березы повислой (6-161/3, 171-б), пушистой (бпЗф1) и гибридной (52-84/8) из коллекции микроклональных культур лаборатории генетики и биотехнологии. Микропобеги после двух месяцев культивирования микрочеренковали и помещали на модифицированную питательную среду WPM [8] с добавлением микроэлементов и витаминов по прописи MS [9],  $30 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  сахарозы и  $7 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$  пищевого агара. Кислотность сред доводили до определенных значений: 4,0; 0,5; 0,6; 0,7 и 8,0 рН, путем добавления в раствор 0,01 Н щелочи NaOH или кислоты HCl, допуская отклонения от заданной величины на  $\pm 0,2$ . Автоклавировали среды при 1,21 атм в течение 30 мин. Закладывали по две повторности каждого варианта опыта по 20 эксплантов в каждом. Контролем служил вариант среды с водородным показателем 6,0 рН.

Материал выращивали при температуре  $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$  и освещенности интенсивностью 2–3 тыс. люкс. лампами «Lisma» (ГУП РМ «ЛИСМА», РФ). Периодически (каждые 2–3 дня) следили за развитием материала, отмечая проявление или угнетение морфогенетических процессов. После трех месяцев культивирования проводили учет размеров и степени развития микропобегов и их корневых систем. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета анализа *Microsoft Excel*. Для определения достоверных различий между вариантами опыта и контролем применяли *t*-критерий Стьюдента.

**Основная часть.** В ходе визуальной оценки отмечено различие морфологических признаков стволиков и корневых систем регенерантов березы повислой изученных клонов в зависимости от уровня кислотности питательной среды.

Показатели средней высоты стволиков растений березы повислой клона 171-б в варианте опыта с доведением кислотности питательной среды до уровня 8,0 рН также были максимальными  $((62,2 \pm 15,2) \text{ мм})$  и достоверно превышали значения, полученные в контроле

$((45,1 \pm 14,2) \text{ мм})$  и на подкисленной среде (4,0 рН):  $(40,5 \pm 11,5) \text{ мм}$ .

Наибольшее количество междоузлий выявлено у растений в варианте с уровнем кислотности среды 8,0 рН и контрольной группе  $((6,0 \pm 1,2)$  и  $(6,7 \pm 1,3)$  шт./регенерант соответственно), указанные значения статистически достоверно при уровне значимости  $p < 0,05$  превышали результаты в варианте эксперимента с 4,0 рН  $((5,2 \pm 1,1)$  шт./регенерант).

Максимальный показатель средней длины главного корня для регенерантов березы повислой клона 171-б получен в варианте с 7,0 рН и составлял  $(89,4 \pm 25,8) \text{ мм}$ , что в 1,8 раза выше показателя полученного для растений контрольной группы  $((50,3 \pm 17,6) \text{ мм})$ . В остальных вариантах эксперимента изучаемый показатель варьировал в пределах  $(51,1 \pm 14,4\text{--}58,5 \pm 14,5) \text{ мм}$ . Количество корней сформировавшихся на регенерантах изменялось по вариантам опыта от  $(3,7 \pm 1,4)$  до  $(4,7 \pm 1,0)$  шт./регенерант и достоверно не различалось.

Для клона 6-161/3 были получены следующие результаты: наибольший показатель средней высоты стволиков регенерантов установлен в вариантах 6,0 и 8,0 рН  $((57,5 \pm 13,6)$  и  $(54,5 \pm 19,0) \text{ мм}$  соответственно), достоверных отличий между значениями не выявлено  $F_{\text{ст}} = 0,22 < F_{\text{кр}} = 4,23$ , при  $p > 0,05$ ). Культивирование растений на среде с 4,0 рН приводило к угнетению роста:  $(32,5 \pm 14,2) \text{ мм}$ .

Количество сформировавшихся междоузлий при выращивании на слабощелочных средах с 7,0 и 8,0 рН составляло  $(6,8 \pm 1,7)$  и  $(5,9 \pm 1,7)$  шт./регенерант соответственно, при этом микрорастения характеризовались достаточно выраженным старением, проявляющемся в увеличении размеров листовых пластинок, одревеснении стволиков и проявлении интенсивной опушенности листьев и побегов.

На средах со слабощелочной реакцией развивались также наиболее длинные корни регенерантов  $((65,6 \pm 15,4)$  и  $(59,6 \pm 16,2) \text{ мм})$ , указанные значения достоверно не отличаются между собой  $(F_{\text{ст}} = 0,89 < F_{\text{кр}} = 4,27)$ , при  $p > 0,05$  и превышают результаты, полученные для растений контрольной группы  $((48,7 \pm 10,8) \text{ мм})$ .

Для березы пушистой получены следующие результаты: наибольшая высота стволика отмечена в вариантах с 5,0 и 6,0 рН  $((106,3 \pm 17,4)$  и  $(100,5 \pm 18,7) \text{ мм}$  соответственно), что статистически достоверно выше показателей как на слабокислой  $((77,5 \pm 23,1) \text{ мм})$ , так и на слабощелочной среде  $((70,7 \pm 10,7) \text{ мм})$ . В то же время среднее количество междоузлий регенерантов достоверно по вариантам не отличалось, что говорит о некотором вытягивании междоузлий регенерантов.

## Морфогенез микрорастений березы в культуре тканей при различном уровне рН питательных сред

Клон	Вариант	4,0 рН	5,0 рН	6,0 рН	7,0 рН	8,0 рН
Береза повислая, 171-6	I*	40,5 ± 11,5	46,5 ± 19,4	45,1 ± 14,2	52,7 ± 16,2	62,2 ± 15,2
	II**	5,2 ± 1,1	6,0 ± 1,4	6,0 ± 1,2	5,5 ± 1,4	6,7 ± 1,3
	III***	3,8 ± 1,1	4,1 ± 1,1	3,7 ± 1,4	4,0 ± 0,9	4,7 ± 1,0
	IV****	51,6 ± 21,5	51,1 ± 14,4	50,3 ± 17,6	58,5 ± 14,5	89,4 ± 25,8
Береза повислая 6-161/3	I	32,5 ± 14,2	37,0 ± 9,2	57,5 ± 13,6	43,6 ± 9,9	54,5 ± 19,0
	II	4,6 ± 1,4	5,7 ± 1,0	5,7 ± 1,2	6,8 ± 1,7	5,9 ± 1,7
	III	3,9 ± 1,7	3,8 ± 1,4	5,1 ± 1,2	3,4 ± 1,2	4,5 ± 1,8
	IV	29,4 ± 13,3	33,2 ± 6,5	48,7 ± 10,8	65,6 ± 15,4	59,6 ± 16,2
Береза пушистая бпЗф1	I	77,5 ± 23,1	106,3 ± 17,4	100,5 ± 18,7	75,1 ± 21,7	70,7 ± 10,7
	II	7,1 ± 1,6	6,8 ± 1,3	7,3 ± 1,4	6,7 ± 1,0	6,9 ± 1,3
	III	7,4 ± 1,7	7,3 ± 2,6	7,3 ± 1,6	5,4 ± 1,4	5,5 ± 1,8
	IV	40,0 ± 11,8	44,9 ± 16,5	88,9 ± 19,8	36,3 ± 12,8	44,5 ± 13,6
Береза гибридная 52-84/8	I	72,1 ± 15,0	57,1 ± 15,9	68,9 ± 15,0	54,4 ± 19,6	70,2 ± 16,7
	II	8,4 ± 2,2	7,6 ± 2,1	8,6 ± 1,6	7,9 ± 1,6	6,1 ± 0,9
	III	4,6 ± 1,2	4,3 ± 1,5	4,1 ± 1,0	4,4 ± 0,9	3,8 ± 1,3
	IV	39,3 ± 10,8	40,7 ± 9,3	41,1 ± 11,3	46,5 ± 12,3	55,9 ± 12,9

\* Средняя высота стволика, мм.

\*\* Среднее количество междоузлий, шт./регенерант.

\*\*\* Среднее количество корней, шт./регенерант.

\*\*\*\* Средняя длина главного корня, мм.

Средняя длина главного корня микрорастений выявленная в варианте с 6,0 рН составила (88,9 ± 19,8) мм, что в 2,0–2,4 раза выше показателей изучаемого признака в остальных вариантах опыта, значения в которых варьировали в пределах (36,3 ± 12,8–44,9 ± 16,5) мм.

Микрорастения культивируемые на средах со слабощелочной реакцией характеризовались некоторым угнетением процесса ризогенеза ((5,4 ± 1,4–5,5 ± 1,8) шт./регенерант). В то время как при 4,0–6,0 рН формировалось (7,3 ± 2,6–7,4 ± 1,7) шт. корней. Кроме того, в данных условиях была отмечена закладка большого количества боковых корешков.

Для микрорастений клона 52-84/8 гибридного происхождения наибольшие показатели высоты стволика ((72,1 ± 15,0) и (68,9 ± 15,0) мм соответственно) и количества междоузлий ((8,4 ± 2,2) и (8,6 ± 1,6) шт./регенерант соответственно) получены при 4,0–6,0 рН среды.

Выращивание на слабощелочной среде приводило к значительному старению культуры, выражающемуся в развитии крупных листовых пластинок и одревеснению части микропобегов. Тем не менее, среду со слабощелочной (8,0 рН) реакцией можно использовать для ризогенеза микропобегов. В указанном варианте длина главного корня микрорастений достигала (55,9 ± 12,9) мм и достоверно превышала контрольный показатель ((41,1 ± 11,3) мм),

$F_{ст} = 11,27 > F_{кр} = 4,20$ , при  $p < 0,05$ . Количества корней микрорастений по вариантам опыта варьировало в пределах (3,8 ± 1,3–4,6 ± 1,2) шт. корней на регенерант, а достоверных отличий не наблюдалось, что говорит о независимости интенсивности корнеобразования от показателя кислотности, между тем, в случае культивирования на слабокислых средах корни слабо ветвились.

Результаты изучения морфометрических показателей регенерантов березы различных таксонов представлены в таблице.

**Заключение.** Интенсивность тканевого морфогенеза регенерантов березы при изменении уровня рН питательной среды значительно варьирует, что с успехом можно использовать как доступный и дешевый, в сравнении с применением регуляторов роста, прием для изменения скорости ростовых процессов растений *in vitro* культур березы различных таксонов и повышения эффективности их клонального микроразмножения.

Для культивирования микрорастений березы пушистой следует применять среды с 6,0 рН, для березы повислой – 7,0–8,0 рН, для березы гибридной следует дополнительно оптимизировать условия выращивания в культуре тканей.

Норма реакции на изменения химического баланса питательной среды определяется генотипом растений.

### Литература

1. Тимофеева О. А., Невмержицкая Ю. Ю. Клональное микроразмножение растений: учебно-методическое пособие. Казань: Казанский университет, 2012. 56 с.
2. Skoog F., Miller C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro* // Symp. Soc. Exp. Biol. 1957. Vol. 11. P. 118–131.
3. Särkilahti E. Micropropagation of a mature colchicine-polyploid and irradiation-mutant of *Betula pendula* Roth // Tree Physiology. 1988. Vol. 4. P. 173–179.
4. Ryuanen L., Aronen T. Genome fidelity during short- and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*) // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 2005. Vol. 83. P. 21–32.
5. Ditmar O. *In vitro* regeneration on Curly birch, *Betula pendula* var. *carelica*. // Thaisza. 1991. No. 1. P. 119–124.
6. Durkovic J., Ditmar O. *In vitro* micropropagation of Curly birch, *Betula pendula* var. *carelica*, by organ culture // Lesnictvi Forestry. 1994. Vol. 40(11). P. 470–474.
7. Duarte de Oliveira Paiva P., Pasqual M., Paiva R. Efeito de concentrações de agar e níveis de pH na propagação *in vitro* de crisântemo // Revista Ceres. 1999. Vol. 46(264). P. 141–148.
8. Owen H. R., Miller A. R. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations // Plant Cell Tiss. Organ Cult. 1992. Vol. 28. P. 147–150.
9. Murashige T. A., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. P. 473–497.

### References

1. Timofeeva O. A., Nevmerzhitskaya Y. Y. *Klonal'noye mikrorazmnozheniye rasteniy: uchebno-metodicheskoye posobiye* [Clonal micropropagation of plants: Study guide]. Kazan: Kazanskiy Universitet Publ. 2012, 56 p.
2. Skoog F., Miller C. O. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 1957, vol. 11, pp. 118–131.
3. Särkilahti E. Micropropagation of a mature colchicine-polyploid and irradiation-mutant of *Betula pendula* Roth. *Tree Physiology*, 1988, vol. 4, pp. 173–179.
4. Ryuanen L., Aronen T. Genome fidelity during short- and long-term tissue culture and differentially cryostored meristems of silver birch (*Betula pendula*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2005, vol. 83, pp. 21–32.
5. Ditmar O. *In vitro* regeneration on Curly birch, *Betula pendula* var. *carelica*. *Thaisza*, 1991, no 1, pp. 119–124.
6. Durkovic J., Ditmar O. *In vitro* micropropagation of Curly birch, *Betula pendula* var. *carelica*, by organ culture. *Lesnictvi Forestry*, 1994, vol. 40(11), pp. 470–474.
7. Duarte de Oliveira Paiva P., Pasqual M., Paiva R. Efeito de concentrações de agar e níveis de pH na propagação *in vitro* de crisântemo. *Revista Ceres*, 1999, vol. 46(264), pp. 141–148.
8. Owen H. R., Miller A. R. An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 1992, vol. 28, pp. 147–150.
9. Murashige T. A., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, vol. 15, pp. 473–497.

### Информация об авторах

**Константинов Андрей Вячеславович** – магистр биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории генетики и биотехнологии Института леса Национальной академии наук Беларуси (246001, г. Гомель, ул. Пролетарская, 71, Республика Беларусь). E-mail: avkonstantinof@mail.ru

### Information about the authors

**Konstantinov Andrei Vyacheslavovich** – master in Biology, junior research fellow, Laboratory of Genetics and Biotechnology. Institute of Forest of the National Academy of Sciences of Belarus (71, Proletarskaya str., 246001, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: avkonstantinof@mail.com

Поступила 23.02.2015