

УДК 630*161.4

А. В. Константинов, аспирант, младший научный сотрудник (Институт леса НАН Беларуси)**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
НА ПРОЦЕССЫ МОРФОГЕНЕЗА БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ
И БЕРЕЗЫ ПУШИСТОЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

В статье описано влияние различных регуляторов роста ауксиновой природы на рост и развитие микроклональных растений в процессе их культивирования под светом разного качества. В опытах использовали клоновый материал березы повислой и березы пушистой, изучая влияние четырех ауксинов в различных концентрациях. Показано, что эффект фитогормонов зависит от качества света и приводит к усилению или ослаблению морфогенетического ответа эксплантов. Внесение ауксинов НУК или ИУК в концентрации 0,3 или 0,5 мг · л⁻¹ вызывает усиление ризогенеза и интенсивности роста побегов различных видов березы в культуре *in vitro*.

This paper describes the effect of different auxins concentrations and different light quality on the growth and development of micropropagated *Betula* plants during their cultivation *in vitro*. The material of two clones of silver birch and white birch were examined in conditions of four auxins (IBA, NAA, IAA, 2,4-D) in different concentrations. It was shown that the morphogenetic answer of explants on the use of plant hormones modified significantly by the quality of light. Additive and opposite effects of these two factors were observed. Adding of auxins NAA or IAA in a concentration of 0.3 or 0.5 mg · l⁻¹ led to increased intensity of rhizogenesis and shoot growth of different species of birch in *in vitro* culture.

Введение. Береза повислая (*Betula pendula* Roth.) и береза пушистая (*Betula pubescens* Ehrh.) являются важными видами в экологическом и экономическом отношении. Они занимают значимое место в лесной отрасли стран Северной и Восточной Европы, в том числе в Беларуси (доля насаждений с участием березы составляет около 23%). Березу как высокопродуктивную породу часто применяют для плантационного лесовыращивания, при котором предпочтительно использование посадочного материала, полученного от селекционно отобранных генотипов [1].

В современной селекции широко применяются методы биотехнологии (эмбриокультура, клеточная и генетическая инженерия, клеточная селекция), которые позволяют направленно создавать сорта, несущие новые, уникальные свойства. Однако для эффективного использования указанной группы методов необходимо определение оптимальных условий культивирования (физических факторов, вида и концентраций регуляторов роста) для обеспечения роста, пролиферации и регенерации тканей и органов растений *in vitro*.

Регуляторы роста представлены широким спектром природных и синтетических веществ, оказывающих воздействие на все этапы онтогенеза растений. Среди них особое место занимают гормоны ауксиновой природы, направленно регулирующие процессы, которые протекают в растениях, что позволяет использовать их в биотехнологиях *in vitro* [2].

Свет является одним из важнейших факторов среды. Изменения его качественного состава могут вызывать различные морфофизиологические эффекты. По этой причине его влия-

ние имеет много общего с действием гормонов, в то же время применение экзогенных регуляторов роста способно вызывать многочисленные реакции, в регуляции которых участвуют фоторецепторы [3]. Исходя из вышесказанного, установление взаимного влияния гормоноподобных веществ и качественного состава физиологически активной радиации в регуляции морфогенетических процессов относится к одному из актуальных вопросов биологии развития.

Цель работы – изучение влияния различных регуляторов роста ауксиновой природы в условиях использования различного качественного состава освещения для создания эффективной системы микроклонального размножения березы повислой (*Betula pendula* Roth.) и пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.).

Объектом исследования являлись клоны березы повислой (бб31) и пушистой (бп3ф1) из коллекции микроклональных культур лаборатории генетики и биотехнологии. Микропобеги после 2 мес. культивирования на безгормональной агаризованной среде разделяли на сегменты, несущие, по крайней мере, один узел (микрочеренки), и помещали на питательную среду, включающую макросоли WPM [4] с добавлением микроэлементов и витаминов по прописи MS [5], 30 г · л⁻¹ сахарозы, 7 г · л⁻¹ пищевого агара. Автоклавировали среды при 1,2 атм в течение 30 мин. Охлажденные до 40–45°C питательные среды в стерильных условиях ламинар-бокса дополняли ауксинами ИМК, НУК, ИУК, 2,4-Д в концентрациях 0,1, 0,3 или 0,5 мг · л⁻¹ (0,01–0,05 мг · л⁻¹ в случае 2,4-Д) в зависимости от варианта опыта. Контрольные растения культивировали без фитогормонов. Закладывали по две повторности каждого варианта опыта по

20 эксплантов в каждом. Материал культивировали при температуре $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

В зависимости от освещения (постоянное интенсивностью 2–3 тыс. лк) все варианты опыта были разделены на две группы: подсветка лампами Lisma (ГУП РМ «ЛИСМА», РФ), дающими тепло-белый свет, и Fluora (Osram, Германия) со спектром, благоприятным для выращивания растений (фитолампы) (максимумы в синей и красной областях). После 2 мес. культивирования проводили учет результатов эксперимента, отмечая появление недифференцированной ткани на эксплантах (каллус), развитие побегов и корней. Определяли размеры сформировавшихся побегов и длину главного корня, количество узлов и корней. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета Microsoft Excel. Для определения достоверных различий между вариантами опыта и контролем использовали *t*-критерий Стьюдента.

Основная часть. В ходе визуальной оценки отмечено различие морфологических признаков регенерантов березы повислой в зависимости от гормонального состава питательной среды и качества света. Растения, культивирование которых проходило под фитолампами Fluora, обладали более интенсивной зеленой окраской побегов, их листовые пластинки в большинстве случаев имели крупные размеры, а стволы – выраженное опушение. В контрольных вариантах начало развития пазушной почки наступало в среднем на 3–4 дня раньше в случае использования ламп марки Lisma, при этом в вариантах с добавлением фитогормонов подобных различий не наблюдали. Анализ морфометри-

ческих показателей также показал, что совместное действие качественно различного света и ауксинов оказывало существенное влияние на микроклональные растения. Биометрические показатели регенерантов березы повислой представлены в табл. 1.

Средняя высота стволика микроклональных регенерантов березы повислой, культивированных под тепло-белым светом в присутствии фитогормонов, в ряде вариантов достоверно превышала соответствующие контрольные растения ($22,6 \pm 15,8$) см). Среди значений изучаемого признака в указанных группах растений наблюдался большой разброс. В случае культивирования растений в средах с добавлением 0,3 или 0,5 мг · л⁻¹ ИУК отличие от контроля было наибольшим ($30,7 \pm 15,2$) и ($32,5 \pm 12,0$) мм соответственно).

Культивирование растений под фитолампами на безгормональной среде не приводило к усилению их развития в сравнении с растениями аналогичного варианта, выращиваемыми под белым светом. В то же время внесение ряда ауксинов вызывало значительное ускорение ростовых процессов, что отразилось на показателе средней высоты стволиков регенерантов. Совместное действие света ламп Fluora и ауксинов ИМК (0,3 мг · л⁻¹), ИУК (0,3 мг · л⁻¹) и НУК во всех испытанных концентрациях приводило к повышению изучаемого параметра до 41,1–44,7 мм. Следует отметить, что показатель среднего количества междоузлий, характеризующий частоту формирования фитомеров при росте побегов, среди изученных вариантов опыта достоверно не отличался.

Таблица 1

Морфометрические показатели регенерантов березы повислой клона бб31 в зависимости от гормонального состава питательной среды и спектральных характеристик используемого света

Регулятор роста	Средняя высота стволика, мм		Количество междоузлий, шт.		Количество корней, шт.		Длина главного корня, мм	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Контроль	22,6 ± 15,8	24,2 ± 15,0	3,0 ± 0,8	3,3 ± 0,7	1,4 ± 0,8	1,3 ± 0,6	25,8 ± 20,9	43,2 ± 19,0
НУК, 0,1	26,1 ± 9,2	44,7 ± 7,0	2,8 ± 0,7	3,5 ± 0,9	1,3 ± 0,5	1,7 ± 0,7	19,3 ± 6,5	31,4 ± 11,6
НУК, 0,3	25,0 ± 8,3	41,7 ± 16,2	2,9 ± 0,8	3,3 ± 0,9	2,7 ± 1,0	2,3 ± 1,0	41,1 ± 13,2	39,4 ± 9,4
НУК, 0,5	19,9 ± 9,7	41,7 ± 11,7	2,5 ± 0,5	3,8 ± 1,1	1,9 ± 0,7	3,6 ± 1,3	44,3 ± 14,8	47,7 ± 13,1
ИМК, 0,1	25,5 ± 12,8	28,3 ± 12,4	3,1 ± 0,9	2,7 ± 0,7	1,4 ± 0,5	1,9 ± 1,1	18,5 ± 11,7	32,9 ± 14,2
ИМК, 0,3	27,8 ± 8,3	41,9 ± 12,3	3,1 ± 0,7	3,3 ± 1,0	1,4 ± 0,5	2,5 ± 1,3	19,8 ± 6,3	29,1 ± 14,5
ИМК, 0,5	30,3 ± 8,7	36,6 ± 11,1	3,1 ± 0,9	3,9 ± 0,9	1,7 ± 0,7	1,8 ± 0,9	27,7 ± 8,6	37,9 ± 13,3
2,4-Д, 0,01	23,1 ± 12,2	32,0 ± 9,8	3,1 ± 1,2	3,1 ± 0,8	2,0 ± 1,2	1,5 ± 0,6	25,3 ± 16,7	37,5 ± 17,0
2,4-Д, 0,03	25,8 ± 13,0	27,6 ± 9,7	2,8 ± 0,9	2,9 ± 0,8	1,3 ± 0,5	2,1 ± 0,7	18,1 ± 9,7	35,6 ± 11,2
2,4-Д, 0,05	21,9 ± 9,0	34,3 ± 9,3	2,4 ± 1,1	3,1 ± 0,7	2,3 ± 1,0	2,6 ± 1,1	22,4 ± 12,3	32,8 ± 11,1
ИУК, 0,1	26,5 ± 7,4	28,7 ± 7,7	3,1 ± 0,9	3,7 ± 0,7	1,6 ± 0,7	2,7 ± 1,0	17,7 ± 7,4	28,5 ± 11,2
ИУК, 0,3	30,7 ± 15,9	41,1 ± 11,9	3,3 ± 0,9	4,7 ± 0,7	2,1 ± 0,8	3,4 ± 1,4	27,5 ± 15,6	26,2 ± 13,2
ИУК, 0,5	32,5 ± 12,0	25,1 ± 16,0	3,4 ± 0,5	2,9 ± 1,0	1,5 ± 0,6	1,3 ± 0,5	19,3 ± 14,3	23,1 ± 12,2

Примечание. I обозначает, что использовалась лампа Lisma, II – Fluora.

Частота ризогенеза была достаточно высокой и варьировала от 85 до 98%. Уже на 9 день на эксплантах отмечали развитие 1–2 корней длиной 3,7–7,0 мм. К концу периода культивирования растений под лампами Lisma наибольшее количество корней наблюдали на черенках березы повислой в случае внесения $0,3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НУК – $(2,7 \pm 1,0)$ шт. ($(1,4 \pm 0,8)$ шт. в контроле). В случае культивирования под фитолампами на безгормональной среде показатель среднего количества корней ($(1,3 \pm 0,6)$ шт.) достоверно не отличался от аналогичного значения у растений из контрольной группы, выращиваемой под лампами Lisma. Внесение $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НУК и $0,05 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ 2,4-Д приводило к увеличению изучаемой величины до $(3,6 \pm 1,3)$ и $(2,6 \pm 1,1)$ шт. соответственно в указанных вариантах и достоверному превышению, как над контролем, так и над лучшим вариантом из группы, выращиваемой под белым светом. Наибольшая средняя длина главного корня у регенерантов березы повислой при выращивании под лампами Lisma наблюдалась при добавлении НУК в концентрациях $0,3$ и $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ($(41,1 \pm 13,2)$ и $(44,3 \pm 14,8)$ мм соответственно), что статистически значимо превышало контрольное значение – $(25,8 \pm 12,8)$ мм. В то же время в случае культивирования микроклональных растений под фитолампами показатель средней длины главного корня в большинстве опытных вариантов достоверно от контроля не отличался или был статистически значимо ниже него.

Следует отметить, что значение указанного параметра при выращивании микрорасте-

ний без регуляторов роста с использованием Fluora достоверно превосходило показатели всех опытных групп, культивирование которых проводилось под белым светом. Исключение составили только два лучших варианта (НУК в концентрациях $0,3$ и $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$; $F_{кр} = 4,19 > F_{ст} = 0,44$ при $p \geq 0,05$ (сравнение со значением $(44,3 \pm 14,8)$ мм)). Исходя из полученных данных, можно заключить, что ризогенез микроклональных растений березы повислой под воздействием излучения фитоламп протекает более интенсивно, чем при использовании тепло-белого света. Эффект, оказываемый экзогенными ауксинами, зависит от их концентрации и условий, в которых они применяются.

Биометрические показатели регенерантов березы пушистой представлены в табл. 2.

Среднее количество междоузлий растений-регенерантов березы пушистой, полученных в результате культивирования на среде без регуляторов роста и под тепло-белым светом ламп Lisma, было равно $(4,5 \pm 0,6)$ шт. и достоверно превышало показатели растений, полученных под лампами Fluora – $(3,9 \pm 0,7)$ шт. ($F_{кр} = 4,09 < F_{ст} = 8,14$ при $p \geq 0,05$). В то же время в большинстве вариантов с добавлением ауксинов подобных различий не наблюдалось. Полученные данные могут свидетельствовать о стимулирующем действии белого света на процессы закладки междоузлий регенерантами березы пушистой, в случае же использования экзогенных ауксинов эффект определяется совместным действием двух факторов.

Таблица 2

Морфометрические показатели регенерантов березы пушистой клона бп3ф1 в зависимости от гормонального состава питательной среды и спектральных характеристик используемого света

Регулятор роста	Высота стволика, мм		Количество междоузлий, шт.		Количество корней, шт.		Длина главного корня, мм	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Контроль	24,0 ± 5,3	19,5 ± 7,9	4,5 ± 0,6	3,9 ± 0,7	3,0 ± 0,8	3,8 ± 0,7	15,2 ± 3,8	11,2 ± 3,6
НУК, 0,1	25,2 ± 11,3	29,1 ± 6,1	4,4 ± 0,8	4,6 ± 1,0	4,4 ± 1,1	5,1 ± 1,2	12,9 ± 3,4	13,0 ± 4,5
НУК, 0,3	27,0 ± 7,5	27,0 ± 8,3	4,6 ± 0,6	4,5 ± 0,9	4,9 ± 1,0	5,4 ± 1,3	14,5 ± 5,8	15,0 ± 6,3
НУК, 0,5	30,7 ± 10,1	32,5 ± 7,7	4,8 ± 0,9	4,3 ± 0,7	5,3 ± 1,1	5,0 ± 1,2	15,9 ± 9,8	15,4 ± 7,5
ИМК, 0,1	27,8 ± 6,7	19,5 ± 5,6	4,6 ± 0,7	3,9 ± 0,6	5,0 ± 0,9	4,8 ± 1,1	13,1 ± 4,8	13,8 ± 4,4
ИМК, 0,3	28,6 ± 6,9	29,1 ± 8,1	4,4 ± 0,6	4,8 ± 0,8	5,0 ± 1,0	5,0 ± 1,1	11,6 ± 2,4	15,7 ± 3,9
ИМК, 0,5	30,1 ± 7,0	21,2 ± 7,0	4,6 ± 1,4	4,4 ± 0,6	4,3 ± 0,9	4,5 ± 1,1	13,3 ± 5,5	11,7 ± 3,4
2,4-Д, 0,01	25,6 ± 6,3	28,3 ± 6,8	3,9 ± 0,7	4,1 ± 0,7	3,9 ± 0,7	3,9 ± 0,7	15,1 ± 5,5	17,4 ± 5,0
2,4-Д, 0,03	28,8 ± 6,3	23,2 ± 9,8	4,4 ± 0,6	3,8 ± 0,6	4,4 ± 0,6	3,6 ± 0,8	12,9 ± 4,7	14,4 ± 5,2
2,4-Д, 0,05	22,5 ± 6,9	29,6 ± 6,2	3,8 ± 0,8	3,9 ± 0,7	4,4 ± 1,0	4,1 ± 1,1	13,8 ± 5,6	13,2 ± 6,1
ИУК, 0,1	35,6 ± 8,5	26,4 ± 6,5	4,4 ± 0,7	3,7 ± 0,6	4,1 ± 0,7	4,4 ± 1,0	15,5 ± 6,1	24,4 ± 8,6
ИУК, 0,3	44,4 ± 7,9	39,4 ± 10,5	4,2 ± 0,7	3,9 ± 0,7	5,2 ± 1,2	5,1 ± 1,4	16,8 ± 7,9	34,1 ± 19,3
ИУК, 0,5	47,2 ± 11,9	36,9 ± 8,9	4,7 ± 0,8	3,5 ± 0,8	6,2 ± 2,1	5,4 ± 1,0	21,3 ± 9,3	36,5 ± 12,9

Примечание. I обозначает, что использовалась лампа Lisma, II – Fluora.

Показатели средней высоты стволика регенерантов березы пушистой недостоверно отличались в случае культивирования растений на безгормональных средах под действием света разного качества: $(24,0 \pm 5,3)$ и $(19,5 \pm 7,9)$ мм (в случае использования ламп Lisma и Fluora соответственно). В то время как совместное действие света и фитогормонов оказывало существенное влияние в ряде вариантов опыта. Так при культивировании под белым светом в вариантах с внесением $0,3$ или $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ауксинов ИМК или ИУК средние показатели высот стволиков достоверно и значимо превышали контроль. Аналогичное превышение наблюдалось и в случае культивирования растений под фитолампами на средах с добавлением ИМК в концентрациях $0,3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, ИУК – $0,3$ и $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, НУК – $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$.

Частота ризогенеза на черенках березы пушистой также варьировала в широких пределах (от 88 до 100%), появление первых корней отмечено на 11 день. Наибольшее количество корней к концу периода культивирования наблюдалось на черенках березы пушистой в присутствии $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ИУК под тепло-белым светом $((6,2 \pm 2,1)$ шт.). Данный показатель достоверно превышал средние значения в вариантах опыта с применением других ауксинов. Наибольшее количество корней в случае применения фитолампы составило 5,4 шт. в присутствии $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ИУК или $0,3 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ НУК. Следует отметить, что при сочетании использования ИУК и света, имеющего оптимизированный для фотосинтеза состав, показатель средней длины главного корня растений $((24,4 \pm 8,6)$, $(34,1 \pm 19,3)$, $(36,5 \pm 12,9)$ мм при концентрациях ИУК $0,1$, $0,3$ и $0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ соответственно) значительно превосходил тот же показатель других опытных групп.

В ходе наблюдения за состоянием и ростом культур *in vitro* нами было отмечено, что низкая концентрация ауксина 2,4-Д, не приводя к существенным изменениям морфометрических показателей, в определенной степени сказывалась на состоянии регенерантов березы повислой и пушистой в процессе культивирования. Это явление отражалось в более интенсивной зеленой окраске побегов и формировании незначительного утолщения основания побега в связи с развитием каллусных тканей. Повышение концентрации указанного гормона приводило к снижению интенсивности ризогенеза и

формированию больших количеств каллусной ткани на исходном экспланте, что, тем не менее, не замедляло роста побегов, а в некоторых случаях даже стимулировало его.

Заключение. В результате проведенных исследований нами было установлено, что морфогенетическая реакция эксплантов березы на культивирование с использованием света различного качественного состава в ряде случаев сходна с таковой в случае внесения определенных ауксинов.

Совместное действие регуляторов роста и освещения фитолампами Fluora приводило к стимуляции морфогенетических процессов в эксплантах березы, что можно использовать для тонкой регуляции роста микроклональных культур при низких концентрациях фитогормонов.

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что на этапе мультипликации растения березы изученных клонов следует культивировать с использованием ламп, дающих теплый белый свет, в то время как для стимуляции ризогенеза на последнем пассаже перед переносом растений в условия *ex vitro* целесообразно применение фитолампы.

Литература

1. Silviculture of birch (*Betula pendula* Roth. and *Betula pubescens* Ehrh.) in northern Europe / J. Hynynen [et al.] // Forestry. – 2008. – Vol. 83, № 1. – P. 103–119.
2. Нам, И. Я. Оптимизация применения регуляторов роста и развития растений в биотехнологиях *in vitro*: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.23 / И. Я. Нам. – М.: Москов. с.-х. акад. им. К. А. Тимирязева, 2004. – 42 с.
3. Wynne, J. Adventitious root formation in woody plant tissue: the influence of light and indole-3-butyric acid (IBA) on adventitious root induction in *Betula pendula* / J. Wynne, M. S. McDonald // In vitro Cell. Dev. Biol. – Plant, 2002. – Vol. 38. – P. 210–212.
4. Lloyd, G. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Proc. Inter. Plant Prop. – 1980. – Vol. 30. – P. 421–427.
5. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – P. 473–497.

Поступила 21.01.2013