



ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ГОРМОНОВ В СРЕДЕ ПРЕКУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА РЕГЕНЕРАЦИЮ В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ БЕРЕЗЫ ПОВИСЛОЙ (*BETULA PENDULA* ROTH.)

АНДРЕЙ В. КОНСТАНТИНОВ

Аннотация. В статье описаны схема стерилизации листовых эксплантов березы повислой для получения каллусных культур и процессы морфогенеза, протекающие в них в зависимости от состава регуляторов роста и условий культивирования. Приведены данные о влиянии длительного культивирования каллусных культур, полученных от материнских деревьев различных генотипов на их регенерационную способность.

Ключевые слова: *Betula pendula*, береза повислая, стерилизация, листовые экспланты, каллусные культуры, регуляторы роста, культивирование *in vitro*

Институт леса НАН Беларуси, ул. Пролетарская 71, Гомель, 247000, Беларусь; avkonstantinof@mail.ru

Введение

Береза занимает около 23% лесопокрытой площади Беларуси, древесина этой породы находит широкое промышленное применение. В настоящее время одной из актуальных задач, связанных с выращиванием берёзы является создание плантационных культур с использованием селекционного посадочного материала (НУНУНЕН *et al.* 2008). Одним из способов производства больших количеств саженцев элитных форм является вегетативное размножение. Однако в случае березы, в особенности старовозрастных деревьев, его традиционные способы малоэффективны. Одним из вариантов решения данной проблемы является использование методов лесной биотехнологии, в частности микроклонального размножения (СНЕНГ *et al.* 2000; КОНСТАНТИНОВ и КУПРИЕНКО 2012)

Изучение особенностей морфогенеза тканей березы в культуре *in vitro* необходимо не только для разработки технологии массового клонирования ценных генотипов, но и для решения ряда задач, связанных с получением хозяйственно-ценных форм на основе применения методов клеточной селекции и инженерии (КОНСТАНТИНОВ 2012). Одним

из ключевых моментов при этом является изучение индукции процессов морфогенеза и разработка эффективных систем регенерации как из отдельных частей растений (эксплантов) (РУУНАНЕН & РУУНАНЕН 1986), так и из недифференцированной ткани (WAKITA *et al.* 1996). Особое значение имеет исследование механизмов дедифференцировки клеток и их дальнейшей пролиферации, а также факторов их обуславливающих (в т.ч. генотипа материнских растений, условий культивирования и состава питательной среды) (БУГАЕНКО и ИВАНОВА-ХАНИНА 2011).

Исходя из вышеизложенного, целью работы являлось получение каллусных культур и изучение влияния состава экзогенных регуляторов роста на процесс регенерации растений березы повислой в культуре тканей.

Материалы и методы исследований

В ходе исследования были использованы побеги с трех плюсовых деревьев березы повислой (возраст деревьев составлял около 50 лет), отобранных в насаждении естественного происхождения ГОЛХУ «Буда-Кошелёвский опытный лесхоз» (номера в Республиканском реестре:

6/161-3, 6/172-14, 6/184-26). Сбор экспериментального материала (ветви) проводили в сентябре 2011 года. Выгонка побегов из зимующих почек производилась в лабораторных условиях в ноябре того же года. Листья с фрагментами (около 2 мм) черешков (исходные экспланты для инициации каллусных культур) выдерживали в течение 30 минут при помешивании на шейкере в двух типах дезинфицирующих растворов: а) сочетании средств «Domestos» («Unilever», Великобритания; концентрация 0,01%) и «AOS» («Невис косметикс», Россия; концентрация 0,005%) или б) только 0,005% раствор «AOS». Далее экспланты выдерживали в течение трех минут в 10% растворе перекиси водорода и промывали под проточной водопроводной водой. Дальнейшая стерилизация проводилась в условиях ламинарного шкафа путем выдерживания в течение 30-40 секунд в 70% этаноле и затем трехминутной обработки 0,1% раствором сулемы с последующим трехкратным промыванием стерильной дистиллированной водой.

На листовые пластинки скальпелем наносили насечки и помещали их на чашки Петри со стандартной средой MS (MURASHIGE & SKOOG 1962) и регуляторами роста. Всего было испытано 10 вариантов опытных сред. Все среды содержали 6-БАП ($2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ или $5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) и НУК ($1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). В часть сред дополнительно вносили 2,4-Д ($1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ или $2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$) либо TDZ ($0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ или $0,01 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Источником углеводов служила сахароза ($30 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$), в качестве уплотнителя добавляли агар в концентрации $7 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$, рН сред доводили до значения 5,6-5,8 растворами гидроксида натрия и хлороводородной кислоты.

Для каждого варианта опыта было использовано по 20-25 эксплантов. Материал культивировали в течение 2 месяцев при температуре $+25 \pm 1^\circ\text{C}$ в темноте. После чего часть каллусов переносили на среду MS с добавлением 6-БАП и НУК в концентрации $1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ и $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ соответственно и помещали на 2 месяца в условия постоянного освещения лампами марки Fluora («Osram»,

Германия) интенсивностью около 2000 люкс для регенерации. Другую часть эксплантов субкультивировали на свежие среды, аналогичные по составу исходным и оставляли в темноте на такой же период. Наблюдения за состоянием эксплантов осуществляли каждые пять дней, учитывали процент некротизированных эксплантов, способность эксплантов к органогенезу и каллусообразованию. Каллус оценивали по цвету и консистенции.

Результаты и их обсуждение

В ходе исследований наиболее эффективным вариантом обеззараживания первичных эксплантов явилось промывание в растворе «Domestos» + «AOS» – выход стерильных эксплантов около 93%. В случае применения только «AOS» доля стерильных жизнеспособных эксплантов не превысила 78%. Доля некротизировавших эксплантов варьировала среди изученных генотипов. Так для генотипа 6/172-14 она была равна 7%, в то время как для генотипов 6/161-3 и 6/184-26 данный показатель составил 16% и 21% соответственно.

Частота каллусогенеза генотипов 6/161-3 и 6/172-14 оказалась высокой и составила около 78%, в то время как для генотипа 6/184-26 данный показатель не превысил 40%.

В процессе культивирования листьев березы повислой в течение первых 2 месяцев в темноте с целью инициации каллусных культур нами было отмечено значительное влияние состава регуляторов роста на морфогенез в тканях эксплантов. Вне зависимости от генотипа исходного растения в вариантах с $5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ 6-БАП каллусогенез протекал на всей поверхности экспланта и не имел явной приуроченности. В случае добавления $2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ 6-БАП интенсивность развития каллуса была ниже, он возникал только вдоль жилок и у основания листа, а край листовой пластинки постепенно некротизировал. Добавление в среду для культивирования тиазурина (регулятора роста с цитокининовой активностью)

приводило к усилению каллусообразования вне зависимости от концентрации, однако каллус, полученный при добавлении $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$, отличался светлой окраской, большей плотностью и однородностью. В случае дополнительного внесения 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты в обеих использованных концентрациях отмечалось усиление каллусообразования, однако полученный каллус был коричневого или рыжевато-кремового цвета и имел рыхлую консистенцию, при этом $2 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ 2,4-Д стимулировали интенсивный адвентивный ризогенез на 67% эксплантов.

Каллусные культуры, полученные на средах с добавлением TDZ в обеих концентрациях, после перемещения на среды со сниженной концентрацией фитогормонов в условия освещения в течение 4-7 дней переходили к интенсивному росту и регенерации. На них возникали участки, имеющие ярко-зеленый цвет вследствие начала образования адвентивных почек. Наиболее интенсивно этот процесс протекал на эксплантах генотипа 6/161-3, более 30% которых перешли к регенерации и еще через 12 дней дали побеги длиной 3-4 см с 2-4 развитыми междоузлиями, пригодные для дальнейшего культивирования. В то время как экспланты генотипа 6/172-14, несмотря на интенсивный рост каллуса, дали короткие побеги (до 2 см с 1-2 узлами) светло-зеленого цвета. Следует отметить, что процесс закладки адвентивных почек протекал, в том числе в каллусах данного генотипа, полученных на средах с добавлением 2,4-Д в высокой концентрации. Наиболее низкая регенерационная способность отмечена для генотипа 6/184-26: за весь срок культивирования отдельные почки образовались только на эксплантах, культивированных в присутствии тиазурона в концентрации $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$. Регенерация в каллусных культурах, полученных от деревьев различных генотипов, представлена на Рис. 1.

Длительное культивирование в течение 4 месяцев в темноте на средах с добавлением 2,4-Д приводило к гибели эксплантов всех трех генотипов. При внесении TDZ каллусные

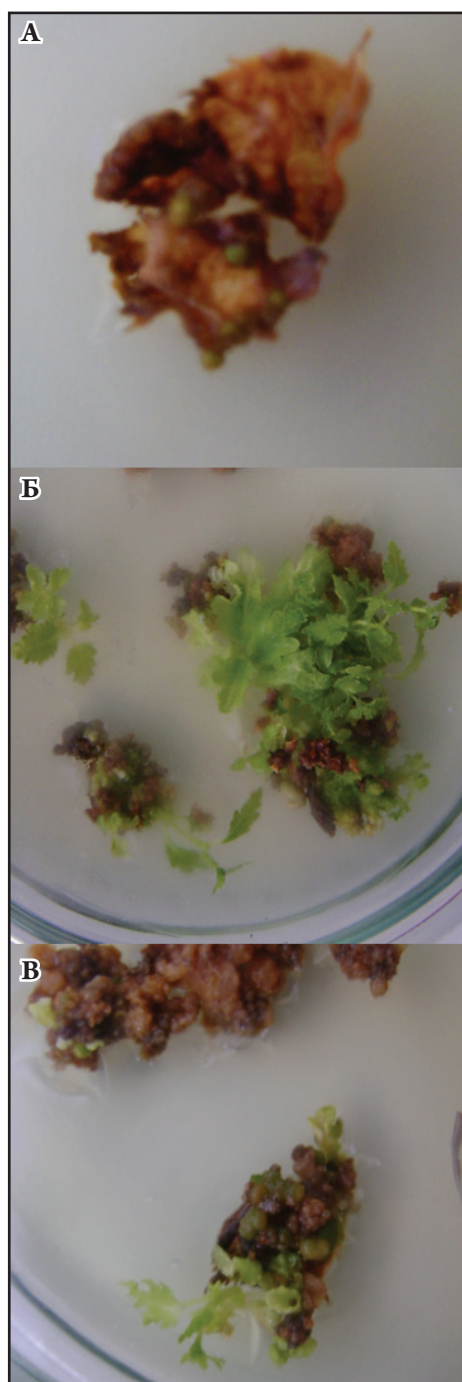


Рис. 1. Регенерация в каллусных культурах березы повислой: **А** – генотип 6/172-14; **Б** – генотип 6/161-3; **В** – генотип 6/184-26.

Fig. 1. Regeneration in callus cultures of *Betula pendula*: **A** – genotype 6/172-14; **B** – genotype 6/161-3; **B** – genotype 6/184-26.

культуры отличались светло коричневой окраской, плотной консистенцией, адвентивный ризогенез отмечали в случае генотипов 6/172-14 и 6/161-3. При их помещении в условия освещения через 4-6 дней на них отмечали появление адвентивных почек. Каллусы генотипа 6/184-26 при длительном культивировании некротизировали полностью.

Таким образом, процесс регенерации в каллусных культурах напрямую зависел от состава регуляторов роста в среде прекультивирования и генотипа исходного дерева.

Помещение в условия освещения стимулирует побегообразование в каллусных культурах березы, в то время как культивирование в темноте способствует интенсивному адвентивному ризогенезу.

Выводы

В результате исследований было установлено, что тидиазурон в концентрации $0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ стимулирует регенерацию побегов в каллусных культурах березы повислой генотипов 6/172-14 и 6/161-3. Внесение 2,4-Д в применявшихся количествах приводит к смещению морфогенеза в сторону образования адвентивных корней.

Цитируемые источники

- БУГАЕНКО Л.А., ИВАНОВА-ХАНИНА Л.В. 2011.** Морфогенез винограда в культуре *in vitro*. Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, Серия «Биология, химия» **63** (2): 73–82.
- КОНСТАНТИНОВ А.В. 2012.** Особенности каллусогенеза на листовых эксплантах березы повислой различных генотипов. Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы (мат-лы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 8-11 октября 2012 г.): 74.
- КОНСТАНТИНОВ А.В., КУПРИЕНКО Д.Г. 2012.** Влияние различных питательных сред и регуляторов роста на морфогенез в культуре ткани березы повислой (*Betula pendula* Roth.). Лесоуправление, лесостроительство и лесозащита – настоящее, будущее (мат-лы междунар. науч.-практ. конф., Брянск, 11–13 октября 2012 г.): 117–119.
- CHENG Z., SCHNURR P.J., DAI W. 2000.** Micropropagation of *Betula platyphylla* 'Fargo' via shoot tip culture and regeneration from leaf tissues. *J. Environ. Hort.* **18** (2): 119–122.
- HYNYNEN J., NIEMISTÖ P., VIHÉRÄ-AARNIO A., BRUNNER A., HEIN S. & VELLING P. 2008.** Silviculture of birch (*Betula pendula* Roth. and *Betula pubescens* Ehrh.) in northern Europe. *Forestry* **83** (1): 103–119.
- MURASHIGE T., SKOOG F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* **15** (3): 473–497.
- RYNNANEN L., RYNNANEN M. 1986.** Propagation of adult curly-birch succeeds with tissue culture. *Silva Fenn.* **20** (2): 139–147.
- WAKITA Y., SASAMOTO H., YOKOTA S. & YOSHIZAWA N. 1996.** Plantlet regeneration from mesophyll protoplasts of *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Plant Cell Rep.* **16**: 50–53.

THE INFLUENCE OF HORMONES COMPOSITION IN THE PRECULTIVATION MEDIUM ON REGENERATION OF CALLUS CULTURES OF SILVER BIRCH (*BETULA PENDULA* ROTH.)

ANDREI V. KONSTANTINOV

Abstract. The paper described the scheme of sterilization of silver birch leaf explants for callus culture establishment, and the dependence of morphogenesis from the composition of growth regulators and culture conditions. Noticeable effects of long-term maintenance of callus cultures and individual differences between initial forms on its regeneration capacity have shown.

Key words: *Betula pendula*, silver birch, sterilization, leaf explants, callus culture, growth regulators, cultivation *in vitro*