

УДК 582.632.1:57.085.1:581.4

Влияние тидиазурона на регенерационную способность листовых эксплантов в культуре тканей редких видов рода *Betula* L.

И.И. КОНЦЕВАЯ

Исследуется влияние гормонального состава среды и генотипа исходного материала на морфогенетические реакции листовых эксплантов в культуре тканей редких видов березы. В результате исследований определены оптимальные способы регенерации адвентивных побегов с использованием в составе питательной среды тидиазурона. Констатируется, что дифференциация адвентивных структур осуществлялась только в каллусной ткани.

Ключевые слова: тидиазурон, регенерация, каллусогенез, морфогенез *in vitro*, листовые экспланты.

The influence of the hormonal composition of the medium and the genotype of the starting material for the morphogenetic response of leaf explants in tissue culture of rare species of birch is described. The studies identified the best ways to regenerate adventitious shoots using thidiazuron as a part of the culture medium. It is stated that the differentiation of adventitious structures was carried out only in the callus tissue.

Keywords: thidiazuron, regeneration, callusogenesis, morphogenesis *in vitro*, leaf explants.

Введение. Культура клеток и тканей различных видов рода *Betula* L. привлекает внимание исследователей и находит значительное практическое применение, поскольку позволяет размножать уникальные деревья, гибридные генотипы, отбирать и сохранять ценные мутантные формы. В этом направлении наиболее активно развиваются исследования на березе повислой (*B. pendula* Roth.) и березе карельской (*B. pendula* Roth. var. *carelica* Merckl.) [1]–[6].

Особый интерес представляет редкая генетическая разновидность *B. pendula* – *B. pendula* Roth. var. *carelica*. В странах Северной и Центральной Европы ее древесина ценится из-за своей узорчатости. Беларусь относится к странам с богатым естественным генетическим потенциалом и значительными ресурсами карельской березы. Однако в результате антропогенных и природных воздействий насаждения карельской березы уменьшаются [7]. Диплоидная береза карликовая (*Betula nana* L.), произрастающая в Беларуси, относится к редким, охраняемым растениям [8]. Береза чернокорая (*B. obscura* Kotula ex Fiek) произрастает на Украине, в России, Польше, Чехии, Словакии. В Беларуси встречается сравнительно редко. На территории республики выявлено свыше 30 ее местонахождений в 12 физико-географических районах. Для *B. obscura* характерна высокая декоративность древесины, что делает ее экономически важной культурой. В связи с малочисленностью, вероятным реликтовым происхождением и в силу своих биологических особенностей, очень остро стоит вопрос о сохранении чернокорой березы [9].

Во многих развитых странах в программах по селекции древесных лесных растений, в том числе и березы, широко используются биотехнологические методы. Это позволяет не только ускорить селекционный процесс, но сохранить и расширить генетическое разнообразие растений. Однако следует подчеркнуть, что развитие различных способов микроклонального размножения березы невозможно без знаний о морфогенезе *in vitro* конкретных ее видов.

Эффективность питательных сред, используемых на этапе мультипликации побегов, оценивают по коэффициенту размножения. В последнее десятилетие при работе с культурой тканей березы повислой стали чаще использовать в качестве цитокинина тидиазурон (TDZ) [4], [6], [10]. Тем не менее, отсутствуют работы по выявлению эффекта тидиазурона на других видах березы. Поэтому разработка более эффективных систем регенерации для ценных и/или редких видов березы с использованием в качестве гормонов тидиазурона остается нерешенной и востребованной.

Цель наших исследований – выявление наиболее оптимальных концентраций тидиазурона, определяющих высокую регенерационную активность листовых эксплантов некоторых редких видов берез.

Материал и методы исследования. Объектами исследования явились клоны березы карельской (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merckl.): 76, 81, клон ч 1 березы чернокорой (*B. obscura* Kotula ex Fiek) и клон 2 а березы карликовой (*Betula nana* L.). Субкультивирование те-

стируемого материала выполняли каждые 30 дней на свежие безгормональные среды. В асептических условиях нарезали листья, которые помещали нижней стороной на поверхность среды. Основу питательной агаризованной среды составляла смесь неорганических солей, оптимизированная для древесных (WPM) [11]. Витамины, микроэлементы добавляли по прописи Мурасиге и Скуга [12]. pH среды перед стерилизацией доводили до 5,6–5,8. Автоклавировали среды при 1,1 атм в течение 20 мин. В стерильных условиях в охлажденную до 45 °С агаризованную среду добавляли раствор тидиазурина (1-phenol-3-(1,2,3,-Thiadiazol-5-YL)UREA). Тестировали следующие его концентрации: 0,0005; 0,005; 0,05; 0,5; 1,0 мг/л. Для контроля использовали модифицированную среду WPM, без гормональных добавок. Материал культивировали при температуре 25±1 °С, с фотопериодом 16 часов и освещенностью 2,5–3,5 тыс. лк.

Число повторностей в каждом варианте – 30.

Длительность первого пассажа составляла 30 дней. Наблюдения за состоянием и ростом культур осуществляли каждые 10 дней. Учитывали процент некротизированных эксплантов, способность эксплантов к органогенезу, количество адвентивных почек и побегов на 1 эксплант. Каллус оценивали по цвету, консистенции, интенсивности роста по 3-х балльной шкале.

Для определения регенерационной способности экспланты пассировали вместе с полученными структурами на свежую безгормональную среду, на которой культивировали при оптимальных условиях 20 дней. По окончании данного пассажа подсчитывали число почек, корней. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерных программ Microsoft Excel 2010, StatSoft Statistica 7.0.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные результаты наблюдений представлены в таблице. В первом пассаже первые признаки пролиферации на листьях были отмечены спустя 20 дней культивирования. Наблюдалось увеличение размеров эксплантов и образование каллусной ткани на месте среза черешка. При дальнейшем культивировании отмечали появление каллуса на новых эксплантах и рост каллусной культуры. Следует отметить, что в 100 % случаев листья клона ч 1 березы чернокорой формировали каллусную ткань и на безгормональной среде (таблица 1). Интенсивность роста каллуса зависела от генотипа экспланта и от концентрации тидиазурина в питательной среде.

Таблица 1 – Влияние тидиазурина на морфогенез в культуре листовых эксплантов березы

Концентрация TDZ, мг/л	Число эксплантов, %			Интенсивность роста каллуса	Min-max число на экспланте		Среднее число почек на эксплант (x±Sx), шт. ¹
	с каллусом	с корнями	с почками		почек	корней	
клон 76 березы карельской							
0 (контроль)	0	100	0	0	–	1-4	–
0,0005	100	46,7	93,3	1	5-15	1-3	6,9± 1,40***
0,005	100	0	50,0	3	1-5	–	1,5± 0,30*
0,05	100	0	50,0	3	1-5	–	0,5± 0,05
0,5	100	0	0	3	–	–	–
1,0	100	0	0	1,2	–	–	–
клон 81 березы карельской							
0 (контроль)	0	50,0	0	0	–	1-3	–
0,0005	12,5	0	13,3	1	1-3	–	0,2± 0,05
0,005	100	0	0	2	–	–	–
0,05	100	0	0	2	–	–	–
0,5	100	0	0	1	–	–	–
1,0	100	0	0	1	–	–	–
клон ч1 березы чернокорой							
0 (контроль)	100	63,4	51,2	1	1-10	1-4	2,8± 0,72
0,0005	75,0	0	60,0	1	5-15	–	6,5± 1,00*
0,005	100	50,0	100	2	3-35	3-5	20,3±2,00***
0,05	100	0	13,3	3, 2	5-10	–	1,0 ± 0,20
0,5	100	0	0	3	–	–	–
1,0	100	0	0	3	–	–	–

клон 2а березы карликовой							
Окончание таблицы 1							
0 (контроль)	0	0	0	0	–	–	–
0,0005	0	0	0	0	–	–	–
0,005	0	0	0	0	–	–	–
0,05	0	0	0	0	–	–	–
0,5	100	0	15,0	3, 2	1-4	–	0,4± 0,20
1,0	100	0	5,0	2, 1	1-2	–	0,1± 0,05

Примечание – рост каллуса оценен в баллах: 0 – отсутствует, 1 – плохой, 2 – хороший, 3 – очень хороший; ¹ от всех эксплантов;

*, **, *** отличия от контроля значимы при $P < 0,05; 0,01; 0,001$

Изученные генотипы можно расположить в порядке убывания каллусогенной активности следующим образом: клон ч 1 березы чернокорой, клон 76 березы карельской, клон 81 березы карельской, клон 2 а березы карликовой. Очень хороший рост каллуса отмечен у березы чернокорой на средах, содержащих 0,05–1,0 мг/л тидиазурана. Для клона 76 березы карельской оптимальная концентрация гормона для каллусообразования составляла 0,005–0,5 мг/л, для клона 2 а березы карликовой – 0,5 мг/л.

Помимо каллусогенеза, на листьях отмечали образование органогенных структур: адвентивных почек и побегов, и адвентивных корней. Активность регенерационных процессов зависела как от генотипа исходного растения, так и среды культивирования. У карликовой березы ризогенез не был выявлен ни на контрольной среде, ни на средах опытных вариантов. У остальных генотипов образование корней отмечали у 50–100 % листовых эксплантов, культивированных на среде без гормонов. У клона 76 березы карельской и клона ч 1 березы чернокорой ризогенез также наблюдали на средах с 0,0005 и 0,005 мг/л тидиазурана, соответственно. Число корней на экспланте варьировало от 1 до 4. Чаще всего формирование корней наблюдали напрямую из клеток среза черешка или тканей листовой пластинки, в то время как регенерацию побегов наблюдали из только каллуса. Аналогичные процессы выявлены другими исследователями на березе повислой [1]–[3], [6].

В результате наблюдений было установлено, что сформированный каллус проявлял среднюю и высокую побегообразующую активность у клона 76 березы карельской и клона ч 1 березы чернокорой, в зависимости от концентрации тидиазурана в среде. Наиболее оптимальная концентрация варьировала в пределах 0,0005–0,005 мг/л. Так, у березы чернокорой число эксплантов с адвентивными почками составило 60–100 %, а среднее число почек на экспланте было равно 6,5–20,3. Все апробированные концентрации тидиазурана оказались неэффективными для индукции побегообразования у клона 81 березы карельской и клона 2 а березы карликовой.

Анализ литературных данных показывает, что разработка способа размножения для каждого конкретного объекта требует творческого поиска, поскольку технология и тип размножения могут быть специфичными не только для отдельных видов, но и генотипов лесных древесных пород [13]. Несомненно, это связано, во-первых, с тем, что в описаниях разработок отсутствуют существенные детали условий культивирования, во-вторых, с недостаточной изученностью процессов органогенеза в контролируемых условиях в зависимости от факторов среды. Вероятно, знание эндогенного статуса донорных растений в годичном цикле их развития позволило бы реализовать морфогенетические процессы в культуре тканей. Но при этом сохраняется востребованность в получении знаний об экзогенном эффекте гормонов естественного и синтетического происхождения на ткани растений в условиях *in vitro*.

В литературе имеются многочисленные данные о том, что развитие древесных культур *in vitro* определяется в большой мере взаимодействием двух факторов: генотипа и гормонального состава питательной среды [14], [15]. Поэтому для исследователей важно получить сведения о морфогенетической оценке каждого генотипа, который представляет тот или иной интерес.

При исследовании Н. Glock с соавторами [16] влияния генотипа и условий культивирования на рост и окраску каллусных культур березы повислой было показано, что оба изученных показателя в сильной степени зависят от генотипа клона, и незначительно изменяются под

воздействием состава среды культивирования. Ими было высказано предположение, что различия в росте каллуса связаны с ядерным геномом березы, а различия в окраске определяются совместным действием ядра и цитоплазмы. Результаты наших исследований, выполненных на разных видах березы, подтверждают приоритет генотипа над составом питательной среды.

Полученные в эксперименте каллусные культуры характеризовались большой гетерогенностью по морфологическим параметрам и морфогенетическим потенциям. По аналогии с работой О.С. Машкиной с соавторами [17], выполненной в культуре изолированных пыльников у разных видов берез, культивированных на средах с тидиазуоном, в нашем исследовании также можно выделить три морфотипа каллусных культур. Один из морфотипов отличался повышенной зеленой окраской, блестящей поверхностью, гранулированностью, органогенной способностью. Это было свойственно для эксплантов, культивированных на средах с тидиазуоном в концентрации 0,0005–0,005 мг/л. Второй тип, отмеченный у изученных клонов берез, кроме березы карликовой, культивированных на средах, содержащих тидиазуон в концентрации 0,5–1,0 мг/л, отличался либо желто-кремовой окраской, либо бело-зеленой, он характеризовался отсутствием регенерационной активности. Третий тип по внешнему виду похожий на второй, отличался все же слабой органогенной активностью на средах с 0,05 мг/л тидиазуона.

Полученные экспериментальные результаты свидетельствуют о существенном, хотя и неоднозначном влиянии генотипа на морфогенез в культуре тканей. Следует еще раз подчеркнуть, что видовая принадлежность исходного растения, сезон, возраст и орган, из которого изолирован тканевой эксплант, гетерогенность или единообразие клеточного состава экспланта – все это оказывает влияние на способность культивируемых тканей и клеток к морфогенезу, а иногда и определяет, какой тип морфогенеза будет доминирующим в данной культуре [18].

Процессы каллусообразования и органогенеза у изученных генотипов протекали с разной интенсивностью (таблица 1). Присутствие гормона в составе питательной среды обычно всегда стимулировало процесс каллусогенеза. Несомненно, это в немалой степени связано с реакцией эксплантов на ранение, повреждение тканей в процессе пассирования материала. Индуцирующее действие тидиазуона на ризогенез у листовых эксплантов изученных генотипов березы практически отсутствует. Интенсивность же побегообразования зависела от генотипа материала и концентрации гормона. Следует подчеркнуть, что во всех вариантах опыта дифференциация адвентивных почек и побегов осуществлялась только в каллусной ткани. Поэтому применение тидиазуона нежелательно при массовом производстве посадочного материала методом клонального размножения и оправдано при создании новых генетически улучшенных форм методами клеточной селекции и биотехнологии.

Заключение. На основании выполненных исследований отмечено существенное влияние генотипа исходного материала и гормонального состава среды на морфогенетические реакции листовых эксплантов у изученных клонов березы. Тестируемые концентрации тидиазуона (0,0005–1,0 мг/л) оказались неэффективными для индукции побегообразования у клона 81 березы карельской и клона 2 а березы карликовой. Определена органогенная способность листовых эксплантов клона 76 березы карельской и клона ч 1 березы чернокорой. Для данных клонов оптимальная концентрация тидиазуона в питательной среде, индуцирующая процесс побегообразования в культуре листьев *in vitro*, составила 0,0005–0,005 мг/л. Дифференциация адвентивных почек и побегов осуществлялась только в каллусной ткани.

Литература

1. Srivastava, P.S. Plantlet differentiation in leaf and root cultures of birch (*Betula pendula* Roth.) / P.S. Srivastava, A. Steinhauer, H. Glock // Plant Sci. – 1985. – Vol. 42. – P. 209–214.
2. Perez, C. Micropropagation of *Betula celtiberica* / C. Perez, P. Postigo // Annals of Botany. – 1989. – Vol. 64. – P. 67–69.
3. Яцына, А.А. Регенерация побегов на листьях березы / А.А. Яцына, И.И. Концевая // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений : сборник научных трудов – Гомель : Институт леса НАН Беларуси, 2003. – Вып. 59. – С. 258–262.

4. Концевая, И.И. Влияние цитокининов на морфогенез в культуре листовых эксплантов березы // Проблемы лесоведения и лесоводства : Сборник научных трудов – Гомель : Институт леса НАН Беларуси, 2008. – Вып. 68. – С. 205–213.
5. Машкина, О.С. Воспроизводство и сохранение представителей ценного генофонда лесных древесных растений методами биотехнологии / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая, О.А. Землянхуина // Биотехнология. Состояние и перспективы развития : тез. докл. 6-го Московского междунар. конгресса, Москва, 21–25 марта 2011 г. – Ч. 1. – М., 2011. – С. 275–276.
6. Константинов, А.В. Влияние состава гормонов в среде прекультивирования на регенерацию в каллусных культурах березы повислой (*Betula pendula* Roth.) / А.В. Константинов // Modern Phytomorphology. – 2013. – № 4. – Р. 241–244.
7. Живулькина, Е.В. Береза карельская в Беларуси : ресурсы, структура и состояние насаждений / Е.В. Живулькина [и др.]. // Ботаника (Исследования) / Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича – Минск : Право и экономика, 2005. – Вып. XXXIII. – С. 135–146.
8. Красная книга Республики Беларусь. Редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / редкол. : Л. И. Хоружик (предс.) [и др.]. – Минск : Белорусская Энциклопедия (БелЭн), 2006. – 456 с.
9. Побирušко, В.Ф. Перспективы хозяйственного использования редких видов берез Беларуси в контексте сохранения их генетических ресурсов / В.Ф. Побирušко // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений (Вавиловские чтения) : сборник научных трудов. – Гомель : Институт леса Национальной академии наук Беларуси, 2003. – Вып. 59. – С. 153–156.
10. Pappinen, A. Transgenic silver birch (*Betula pendula*) expressing sugarbeet chitinase 4 shows enhanced resistance to *Pyrenopeziza betulicola* / A. Pappinen [et al.] // Plant Cell Rep. – 2002. – Vol. 20. – P. 1046–1051.
11. Lloyd, G. Commercially Feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Proc. Intl. Plant Prop. Soc. – 1980. – № 30. – P. 421–427.
12. Murashige, T.A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T.A Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15. – № 13. – P. 473–497.
13. Schulzke, R. Die Anwendung von In vitro-Kulturtechniken bei Waldbaumen / R. Schulzke // Osterr. Forstztg. – 1988. – Vol. 99. – № 3. – P. 66–67.
14. Алексеева, Л.Л. Роль генотипа при размножении дуба черешчатого и сосны обыкновенной методом культуры тканей / Л.Л. Алексеева, М.Ю. Нечаева, Г.П. Бутова // Цитогенетические и экономические основы повышения продуктивности лесов. – Воронеж : НИИЛГиС, 1993. – С. 65–73.
15. Бугаенко, Л.А. Морфогенез винограда в культуре in vitro / Л.А. Бугаенко, Л.В. Иванова-Ханина // Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Вып. 63(2). – С. 73–82.
16. Glock, H. Genotype – environment interaction in tissue cultures of birch / H. Glock, H.-R. Gregorius // TAG. – 1986. – Vol. 72. – № 4. – P. 477–482.
17. Машкина, О.С. Культура изолированных пыльников как метод для расширения генетического разнообразия березы / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая // Генетико-селект. основы улучшения лесов. – Воронеж : НИИЛГиС, 1999. – С. 58–75.
18. Бутенко, Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений / Р.Г. Бутенко // Гормональная регуляция онтогенеза растений. – М. : Колос, 1984. – С. 42–54.