

И. И. КОНЦЕВАЯ

УО «Гомельский государственный университет им. Ф.
Скорины», Гомель, Республика Беларусь
E-mail ikantsavaya@mail.ru

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ДРЕВЕСНЫХ (НА ПРИМЕРЕ БЕРЕЗЫ)

Этап введения в культуру тканей древесных растений и получение стабильного стерильного материала – первый и, несомненно, самый главный этап микрклонального размножения. На данном этапе требуется привлечение специалистов с самой высокой квалификацией и опытом работы, поскольку порой необходимо быстро оценить ситуацию и принять, возможно, новое нестандартное решение. Тем не менее, имеются определенные стабильные знания, на основе которых и следует выполнять работу, и которые подчас игнорируются. На основании литературных данных и, прежде всего, своих собственных многолетних исследований в области культуры тканей растений и, в частности, лесных древесных, рассмотрим такие шаги (этапы) на примере введения в культуру разных видов березы.

1 Отбор растительного материала. Для отбора материнских деревьев следует привлекать селекционеров или других специалистов, владеющих информацией, характеризующей отобранные насаждения. Возраст отобранных деревьев березы может варьировать в широких пределах: от 3-х лет у сеянцев карельской березы до 40–60 лет у других видов березы. Забор материала производят в 2–3 срока: в ноябре (когда почки перешли в стабильно спящее состояние), январе, марте–апреле (когда почки набухли и готовы дать побег). О позитивных результатах по применению спящих почек у березы свидетельствуют работы [1, 2]. От каждого клона следует нарезать не менее 5–10 побегов длиной от 30–40 см. В лабораторных условиях для поддержания жизнеспособности и дальнейшего развития почек, ветки следует поместить в сосуд с водой. Следует учитывать, что развитие почек на одной ветке и у разных клонов происходит неодновременно, и что каждая почка отличается одна от другой по морфологическим, физиологическим признакам и характеризуется различным морфогенным и органогенным потенциалом, имеет разный

характер и степень контаминации.

2 Для березы в качестве первичных эксплантов используют: спящие нераспустившиеся почки как отделенные от побега, так и сидящие на побеге, длиной 0,5–1,5 см, полураспустившиеся почки, хорошо распустившиеся почки, меристемы с субапикальной тканью.

3 Режим стерилизации зависит от сроков забора материала, возраста материнских деревьев и места их произрастания (теплица или открытые насаждения), состояния первичного экспланта. Первым шагом стерилизации является обязательная промывка материала проточной водопроводной водой в течение 30–60 минут, что позволит существенно (почти в 2 раза) сократить степень внешнего инфицирования материала. Для стерилизации применяют общепринятые дезинфицирующие вещества; их комбинация и время воздействия подбираются эмпирически. Из-за сильного токсичного воздействия стерилизующих агентов на материал, хорошие результаты дает использование дробной стерилизации.

4 Посадку стерильного материала производят по одному экспланту в культуральный сосуд. Посадка эксплантов производится обычно с нестрогой вертикальной ориентацией на среде.

5 На первом этапе культивирования агаризованные питательные среды содержат, как правило, высокие концентрации минеральных солей, углеводы, витамины, цитокинины, иногда – ауксины. В качестве питательных сред для размножения березы используют и модифицированную среду для древесных (WPM) [3].

6 Значительной проблемой при работе с культурой *in vitro* древесных растений является быстрое побурение эксплантов и каллуса в среде культивирования, которое происходит из-за окисления полифенолов, выделяющихся из срезанных концов эксплантов, полифенолоксидазами, пероксидазами, кислородом воздуха. Причем, присутствие цитокининов в среде также стимулирует этот процесс. Для предотвращения некроза и побурения, и, в конечном итоге, – гибели эксплантов, добавляют в среды поливинилпирролидон, либо смесь аскорбиновой и лимонной кислот в качестве антиоксидантов, что позволяет существенно уменьшить степень побурения, но полностью его не предотвращает [4].

7 Размножение материала в культуре тканей целесообразно только в случае получения абсолютно здоровых растений. Эта

догма – основное требование массового размножения. Из-за многолетней природы древесных растений, получение стерильной культуры является очень трудоемкой работой. Это связано как с внешней, так и внутритканевой инфекцией растительного материала. Ужесточение режима стерилизации допустимо только до определенных пределов, поскольку в противном случае происходит некроз и гибель материала. Поэтому следует во втором–третьем пассажах в питательные среды внести антибиотики в бактерицидных концентрациях. Из-за широкого круга микроорганизмов, населяющих посадочный материал, рекомендуется использовать сочетание двух-трех антибиотиков.

8 Культивирование материала проводят при следующем режиме: 16-часовой фотопериод, интенсивность освещения составляет 3–4 тыс. лк, температура $18/25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

9 По истечении 30 дней обычно наблюдают пролиферацию тканей эксплантов, индукцию каллуса на местах срезов и ранения эксплантов, и развитие побегов из меристемы. За месячный период число пассажей лимитируется только состоянием эксплантов: степенью инфицирования или чистоты, степенью развития некроза тканей, выделением полифенолов и побурением среды. При необходимости субкультивирование на свежие среды чаще всего идентичного состава проводят каждые 2–5 дней. При каждом пассаже для улучшения обмена питательными элементами между эксплантом и средой, удаляется мертвая ткань и подрезается основание исходных эксплантов. Длительность первого пассажа может составлять 3–4 недели в случае оптимального сочетания всех параметров культивирования и состояния эксплантов.

10 Основная проблема связана с реуенилизацией тканей, механизмы которой слабо изучены. То, что мы знаем о гормонах растений, не позволяет решить стоящие задачи. Пока совершенно неясно значение полисахаридов и продуктов их расщепления в клетках, хотя отрывочные сведения позволяют судить о чрезвычайно важной их роли в регуляции механизмов иммунитета, водно-солевого обмена, роста и развития, а также их чувствительности к физиологическим стрессам.

11 Стадия омоложения растительного материала у березы является длительной. В зависимости от возраста материнского растения она занимает от 6 (для 2–3-летних сеянцев березы карельской, карликовой) до 9–12 месяцев (для берез разных видов, возрастом от 20–40 лет). В течение такого длительного

периода культивирования обязательным условием является присутствие в составе питательной среды цитокининов. Например, оптимальная концентрация бензиламинопурина в питательной среде составляет 0,2–5,0 мг/л. Такая разбежка в концентрации обозначает, что следует чередовать количество цитокинина в питательной среде в разных пассажах.

12 На этапе омоложения материала часто наблюдаются признаки хлороза, особенно на листьях. При констатации такого феномена необходимо субкультивирование материала на среды, содержащие удвоенную концентрацию железа и/или опытным путем подобрать соотношение нитратной и аммонийной форм азота в питательной среде [5].

13 Условия культивирования на стадии омоложения растительного материала аналогичны условиям прохождения первых пассажей культуры тканей. Допускается увеличение густоты посадки эксплантов в культуральном сосуде.

Таким образом, получение стерильного стабильного материала древесных растений не является одномоментным процессом. На этом этапе требуется проведение больших объемов экспериментальных исследований, как дополняющих и расширяющих теоретические знания, так и позволяющих получить практический результат, а также следует определить методику работы на основе анализа фундаментальных знаний в области физиологии растений, биохимии, микробиологии и т. д. Для исследователей, которые занимаются микрклональным размножением древесных, он остается наиболее значимым и существенным, определяющим все их дальнейшие исследования с той или иной древесной культурой.

Список использованной литературы

- 1 Vijayakumar, N. K. In Vitro Propagation of the Endangered Virginia Roundleaf Birch (*Betula uber* [Ashe] Fern.) Using Dormant Buds / N. K. Vijayakumar [et al.] // Forest Science. – 1990. – Vol. 36, N 3. – P. 842–846.
- 2 Яцына, А. А. Развитие побегов из находящихся в покое почек березы карельской в культуре in vitro / А. А. Яцына, И. И. Концевая // Проблемы лесоведения и лесоводства. – Гомель, 2000. – Вып. 51. – С. 183–193.
- 3 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. – Vol. 30. – P. 421–427.

4 Концевая, И. И. Определение условий введения дуба черешчатого в культуру *in vitro* / И. И. Концевая // Генетика и биотехнология XXI века. Фундаментальные и прикладные аспекты: Мат. межд. научн. конф. 3–6 декабря 2008 г., Минск. – Мн., 2008. – С. 103–105.

5 Liu, Y. Размножение *Betula alnoides* *in vitro* путем пролиферации побегов / Y. Liu [et al.] // Forest Res. – 2003. – Vol. 16, № 6. – P. 715–719.

РЕПОЗИТОРИЙ ГГУ ИМЕНИ Ф. СКОРИНЫ