

Определение регенерационной способности междоузлий культуре *in vitro* рода *Betula* L.

И.И. КОНЦЕВАЯ

На основании выполненных исследований выявлена межвидовая, внутривидовая, межклоновая и внутриклоновая изменчивость по пролиферирующей и органогенной способности у отрезков междоузлий в культуре *in vitro* рода *Betula* L. Из органогенных процессов преобладал процесс побегообразования. Адвентивные почки и побеги формировались только на каллусной ткани. Ризогенез на отрезках междоузлий отмечали как напрямую из ткани экспланта, так и из каллусной ткани. Клон ч1 березы чернокорой проявил высокую побегообразующую способность на средах, дополненных 6-БАП и зеатином, и на безгормональной среде.

Ключевые слова: каллусогенез, органогенез *in vitro*, регенерационная активность, культура *in vitro*, 6-бензиламинопурин, зеатин, междоузлия, береза.

On the basis of the performed studies, interspecific, intraspecific, interclonal and intracolon variability in proliferating and organogenic capacity of internodes segments *in vitro* of the genus *Betula* L. was revealed. Of the organogenic processes, the shoot formation process prevailed. Adventive buds and shoots were formed only on callus tissue. Rhizogenesis in the internodes segments was noted both directly from the explant tissue and from the callus tissue. Clone ch1 of black birch showed a high shoot-forming ability on media supplemented with 6-BAP and zeatin, as well as on a hormone-free medium.

Keywords: callusogenesis, organogenesis *in vitro*, regenerative activity, culture *in vitro*, 6-benzylaminopurine, zeatin, internodes, birch.

Введение. Культура *in vitro* различных видов рода *Betula* L. вызывает у исследователей большой интерес и находит значительное практическое применение, поскольку позволяет размножать уникальные деревья и выдающиеся насаждения, отбирать ценные мутантные формы, гибридные генотипы [1], [2]. Без совершенствования данного метода нельзя представить развитие очень перспективного направления улучшения растений – генетической трансформации. Однако для получения трансгенных растений должна быть разработана эффективная система регенерации побегов из трансформированных клеток и тканей. Чаще всего для генноинженерных манипуляций в качестве эксплантов используют листья, в меньшей степени - черешки листьев, междоузлия. Усовершенствование знаний о пролиферирующей и органогенной способности культуры тканей растений также представляет интерес для получения организмов с измененной ploidy, соматоклональных вариантов и для микроклонального размножения.

Для различных видов березы имеются сведения о регенерационной способности листовых эксплантов [3]–[11]. Использование же отрезков междоузлий в качестве эксплантов отмечено в единичных работах [3], [12]–[14]. Поэтому целью наших исследований явилось оценка пролиферирующей и регенерационной способности отрезков междоузлий различных генотипов березы.

Материал и методы исследований. Объектами исследования явились клоны 3ф1 и 1б березы пушистой (*B. pubescens* Ehrh.), клоны 31 и 4б березы повислой (*B. pendula* Roth.), клоны 7б и 81 березы карельской (*B. pendula* Roth. var. *carelica* Merckl.) и клон ч1 березы чернокорой (*B. obscura* Kotula ex Fiek.) В качестве эксплантов использовали отрезки междоузлий, вычлененные у одномесечных микрорастений вышеперечисленных клонов.

Методика работы с эксплантами, прописи питательных сред, этап наблюдения за состоянием и ростом культур, критерии оценки изложены в работе [15]. По литературным данным, выбранные концентрации цитокининов – наиболее оптимальные для стимулирования побегообразующей способности на листьях [3]–[6], [9]–[11].

Статистическую обработку полученных результатов исследований проводили с помощью пакета прикладного программного обеспечения Microsoft Excel и «Statsoft (USA) Statistica v.7.0» с расчетом выборочной средней и стандартной ошибки среднего. Достоверность различий данных определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение. В течение первых 10 дней культивирования не выявлено никаких визуальных изменений на эксплантах. Спустя 20 дней отмечали в большинстве опытных вариантов увеличение в той или иной степени размеров эксплантов и индукцию каллусогенеза. Формирование каллуса наблюдали по краям отрезков междоузлий, в местах срезов. В таблице 1 представлены результаты по влиянию гормонального состава среды и генотипа экспланта на процесс формирования каллусной ткани на отрезках междоузлий березы.

Таблица 1 – Влияние гормонального состава питательной среды и генотипа экспланта на каллусогенез в культуре тканей березы (возраст – 50 дней)

Гормоны, мг/л	Число эксплантов с каллусом, %	Интенсивность роста каллуса*	Морфологические особенности каллуса
клон 3ф1 березы пушистой			
б/г	0	–	–
Зеатин, 5,0	6,7	1	зеленый, блестящий, гранулированный
БАП, 2,0	100	1, 2, 3	коричневый, зеленый, блестящий, гранулированный
клон 1б березы пушистой			
б/г	0	–	–
Зеатин, 5,0	15,0	2	зеленый, блестящий, гранулированный
БАП, 2,0	90,0	1	кремовый, зеленый, блестящий
клон 31 березы повислой			
б/г	7,7	1	зеленый, блестящий
Зеатин, 5,0	30,0	1	кремовый, зеленый, блестящий, гранулированный
БАП, 2,0	100	2	зеленый, кремовый, блестящий
клон 4б березы повислой			
б/г	0	–	–
Зеатин, 5,0	100	1	темно-зеленый, блестящий
БАП, 2,0	100	2	кремовый, зеленый, коричневый, блестящий
клон ч1 березы чернокорой			
б/г	100	1	кремовый, зеленый, блестящий
Зеатин, 5,0	100	1	темно-зеленый, кремовый, блестящий, гранулированный
БАП, 2,0	100	3, 2	кремовый, зеленый, блестящий
клон 7б березы карельской			
б/г	35,0	1	кремовый, зеленый, блестящий
Зеатин, 5,0	100	1, 2	зеленый, блестящий
БАП, 2,0	100	1	кремовый, зеленый, блестящий
клон 81 березы карельской			
б/г	0	–	–
Зеатин, 5,0	0	–	–
БАП, 2,0	65,0	1	кремовый, зеленый, блестящий

Примечание: *рост каллуса оценен в баллах: 1 – плохой, 2 – хороший, 3 – очень хороший.

Клон 81 карельской березы отличался незначительной каллусогенной активностью, в то время как клоны ч1 березы чернокорой, 4б березы повислой, 7б березы карельской характеризовались 100 % каллусообразованием на обоих опытных средах. Все экспланты клона ч1 березы чернокорой на безгормональной среде проявляли способность к недифференцированному росту клеток. Рост каллуса варьировал от плохого до, реже, – очень хорошего. Более активный рост каллусной ткани у всех изученных генотипов выявлен на среде, содержащей БАП. Интенсивность каллусообразования существенно снижалась либо была равна нулю при культивировании эксплантов на средах, дополненных зеатином. Наблюдали обычно каллус кремово-зеленого цвета, блестящий, гранулированный по форме, плотный по консистенции. После субкультивирования эксплантов с гормональной на свежую среду, без гормонов, отмечали в ряде вариантов опыта появление каллуса коричневого цвета. Наиболее интенсивно каллус такого цвета развивался на междоузлиях 3ф1 березы пушистой и 4б березы повислой.

Каллусные культуры характеризовались большой гетерогенностью по морфологическим характеристикам. На одной и той же среде можно было наблюдать несколько морфотипов первичных каллусов по цвету и интенсивности роста. Они возникали как в пределах одного экспланта,

так и у разных эксплантов. Интенсивность роста каллуса и его окраска в большей степени зависели от генотипа экспланта и в меньшей степени – от изученного гормонального состава среды. Полученные данные согласуются с результатами, установленными на березе повислой Н. Glock с соавт. [16], которые предположили, что влияние среды сильно модифицируется генотипом каллуса, в то время как генотипические эффекты слабо взаимодействуют с эффектами среды.

При визуальной оценке эксплантов с новообразованиями констатировали сильный некроз первичных эксплантов у некоторых клонов. От 70 до 100 % некротизированных эксплантов было выявлено на безгормональной среде у клона 3ф1 березы пушистой, клона 31 березы повислой, клонов 81 и 76 березы карельской. Также гибель междоузлий отмечали у клона 3ф1 березы пушистой в 50–80 % на среде с БАП. При изменении окраски тканей отрезков междоузлий с кремового цвета на коричневый, сформированные на них каллус и органогенные структуры обычно сохраняли жизнеспособность.

Органогенную способность эксплантов оценивали спустя 30 культивирования на средах с гормонами, и спустя еще 20 дней, после дополнительного субкультивирования на среде без гормонов во втором пассаже (таблица 2). В первом пассаже на отрезках междоузлий наблюдали формирование адвентивных почек, дальнейший рост и развитие которых отмечали после субкультивирования на свежую среду. Такая тенденция установлена почти для всех изученных генотипов, кроме клона 31 березы повислой. У данного генотипа наблюдали в конце первого пассажа каллус, по основным морфологическим параметрам – органогенный, но, тем не менее, визуально практически не идентифицировали зоны меристем (обычно на это указывает, помимо салатно-зеленой окраски, наличие характерных зеленых точек). Только во втором пассаже проходил процесс дифференциации тканей.

Помимо каллусогенеза, на отрезках междоузлий отмечали формирование двух типов органогенных структур: адвентивных почек и побегов, и, значительно реже, адвентивных корней. Индукцию корней наблюдали как из ткани эксплантов, так и на каллусе. На междоузлиях, культивированных на среде без гормонов, формирования корней не установлено. Небольшое корнеобразование было выявлено у клонов ч1 березы чернокорой и клона 76 березы карельской на обоих изученных средах, и у клона 3ф1 березы пушистой на среде, дополненной БАП (таблица 2).

Регенерацию побегов определяли только из недифференцированной ткани. Аналогичные процессы выявлены другими исследователями на листьях березы повислой [4]–[6].

У клона ч1 березы чернокорой побегообразующая способность каллуса была равна 100 %, независимо от наличия гормонов в среде культивирования. На безгормональной среде число почек на экспланте колебалось от 1 до 8, среднее значение составляло 6,8. На средах с цитокининами среднее число почек достигало 29–30. Для клона 81 березы карельской наблюдали совершенно противоположную картину: междоузлия не проявляли органогенной способности при культивировании на апробированных гормональных средах (таблица 2). Регенерационная активность у остальных изученных генотипов в той или иной степени зависела от гормонального состава среды.

Определена межклоновая изменчивость по показателю «побегообразующая способность эксплантов». У всех изученных видов березы между клонами отмечали существенные различия. У березы повислой клон 4б, а у березы карельской клон 76 оказались более отзывчивы на апробированные гормональные среды, они обладали хорошими показателями побегообразующей способности по сравнению с другими клонами своего вида.

Несомненно, БАП оказался более эффективным цитокинином, стимулирующим побегообразование на отрезках междоузлий, чем зеатин (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние гормонального состава питательной среды и генотипа эксплантов березы на органогенез в культуре тканей (возраст – 50 дней)

Гормоны, мг/л	Число эксплантов, %		Среднее число на эксплант		Min–max	
	с корнями	почками	почек ¹	корней ²	число почек на эксплант	длина корней, см
клон 3ф1 березы пушистой						
б/г	0	0	–	–	–	–
Зеатин, 5,0	0	0	–	–	–	–
БАП, 2,0	33,3	70,0	5,9 ± 1,2***	2,6 ± 0,8**	5–10	0,1–0,9

Окончание таблицы 2

клон 1б березы пушистой						
б/г	0	0	–	–	–	–
Зеатин, 5,0	0	7,5	0,3 ± 0,29	–	2–3	–
БАП, 2,0	0	90,0	1,7 ± 0,5**	–	1–3	–
клон 31 березы повислой						
б/г	0	0	–	–	–	–
Зеатин, 5,0	0	26,7	0,27 ± 0,1	–	1–2	–
БАП, 2,0	0	90,0	4,0 ± 0,8***	–	1–7	–
клон 4б березы повислой						
б/г	0	0	–	–	–	–
Зеатин, 5,0	0	80,0	3,3 ± 0,6***	–	1–7	–
БАП, 2,0	0	100	7,2 ± 0,6***	–	1–15	–
клон ч1 березы чернокорой						
б/г	0	95,0	6,8 ± 1,7***	–	1–8	–
Зеатин, 5,0	40,0	100	30,1 ± 3,3***	2,4 ± 0,2***	5–40	1,0–4,0
БАП, 2,0	15,0	100	29,0 ± 1,2***	1,3 ± 0,6	5–40	0,1–0,5
клон 7б березы карельской						
б/г	0	0	–	–	–	–
Зеатин, 5,0	26,7	100	12,7 ± 1,4***	3,0 ± 1,4*	8–30	0,5–1,0
БАП, 2,0	5,0	100	15,1 ± 1,7***	1,0 ± 0,6	7–30	0,1–0,5
клон 81 березы карельской						
б/г	0	0	–	–	–	–
Зеатин, 5,0	0	0	–	–	–	–
БАП, 2,0	0	0	–	–	–	–

Примечание – ¹ от всех эксплантов, ² от эксплантов с корнями; отличия от контроля значимы при *P < 0,5, **0,1, ***0,01.

Кроме клона 81 березы карельской, у остальных тестируемых клонов при культивировании междуузлий на среде, дополненной БАП, частота побегообразования равнялась 70–100 %, среднее число почек на экспланте составляло от 2 до 30. В то же время на среде с зеатином эффективность побегообразования из каллусной ткани была существенно ниже у большинства изученных клонов.

По литературным данным, органогенез на каллусе отрезков междуузлий березы повислой был получен на среде, содержащей 1–2 мг/л БАП и 0,5–8,0 мг/л НУК [17]. При тестировании способности к побегообразованию на листовых эксплантах, междуузлиях и 1-почечных сегментах, культивированных на среде WPM, дополненной 1,0 мг/л БАП, у 12 раннецветущих клонов березы повислой отмечали варьирование частоты индукции между клонами и по типам эксплантов: у листьев – 80–100 %, у междуузлий – 13–90 %, у узловых сегментов – 17–97 % [18]. У тополя при сравнительном изучении эффективности регенерации почек из различных органов микроклонированных растений лучшие результаты были получены при использовании междуузлий в качестве эксплантов [19].

Анализ литературных данных показывает, что разработка технологии и протоколов размножения *in vitro* для каждого конкретного объекта требует творческого поиска, поскольку способы размножения могут быть специфичными не только для отдельных видов, но и генотипов лесных древесных пород [19]–[22], а также зависят от типа экспланта [19], [22]. 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 донорских растений в годичном цикле их развития позволило бы реализовать морфогенетические процессы в культуре тканей. В литературе отмечено, что развитие древесных культур *in vitro* определяется в большой мере взаимодействием двух факторов: генотипа и гормонального состава питательной среды [23]–[26]. На основании исследований с ювенильным материалом дуба черешчатого и сосны обыкновенной авторы высказали предположение, что дальнейшие исследования целесообразно проводить в 2-х направлениях: с одной стороны, выявлять генотипы, обладающие высокой морфогенной реге-

нерациональной способностью, с другой – подбирать условия (в частности, гормональные воздействия) для тех клонов, которые представляют определенный селекционный интерес, но трудно поддаются культивированию [23].

Учитывая вышесказанное, по нашему мнению, не корректно интерпретировать полученные результаты категорично и однозначно. Имеется большая вероятность того, что, подбирая гормоны в разных сочетаниях и количествах, можно получить положительные результаты. В своей работе мы изучали только возможность использования отрезков междоузлий в качестве эксплантов при работе с культурой тканей березы.

Выводы. На основании выполненных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Выявлена межвидовая, внутривидовая, межклоновая и внутриклоновая изменчивость по пролиферирующей и органогенной способности у отрезков междоузлий.

2. Из органогенных процессов преобладал процесс побегообразования. Адвентивные почки и побеги формировались только на каллусной ткани. Ризогенез на отрезках междоузлий отмечали как прямую из ткани экспланта, так и из каллусной ткани.

3. Клон ч1 березы чернокорой проявил высокую побегообразующую способность на средах, дополненных цитокининами (6-БАП в концентрации 2,0 мг/л и зеатином в концентрации 5,0 мг/л), и на безгормональной среде (соответственно, 29–30 почек/на эксплант, и 6–7 почек/на эксплант).

Литература

1. Rathwell, R. In vitro propagation of cherry birch (*Betula lenta* L.) [Electronic resource] / R. Rathwell [et al.] // Canadian Journal of Plant Science. – Mode of access : <https://doi.org/10.1139/cjps-2015-0331>. – Date of access : 12.10.2020.

2. Sarvašová, I. Differences in survival and phenotypic traits of curly birch preserved by heterovegetative propagation: a case study from Central-East Europe [Electronic resource] / I. Sarvašová [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – Vol. 11, № 8079. – Mode of access : <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87508-0>. – Date of access : 12.12.2021.

3. Chalupa, V. In vitro propagation of Birch (*Betula verrucosa* Ehrh.) / V. Chalupa // Biologia plantarum (Praha). – 1981. – Vol. 23, № 6. – P. 472–474.

4. Srivastava, P. S. Plantlet differentiation in leaf and root cultures of birch (*Betula pendula* Roth.) / P. S. Srivastava [et al.] // Plant Science. – 1985. – Vol. 42. – P. 209–214.

5. Симола, Л. К. Каллусные культуры и размножение березы in vitro / Л. К. Симола // Культура клеток растений и биотехнология. – М., 1986. – С. 102–106.

6. Valobra, C. In vitro shoot regeneration from leaf disks of *Betula pendula* «Dalecarlica» EM 85 / C. Valobra [et al.] // Plant cell, Tissue and Organ Cult. – 1990. – Vol. 21, № 1. – P. 51–54.

7. Takeshi, M. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. Japonica) / M. Takeshi [et al.] // Plant Science. – 1997. – Vol. 127. – P. 53–60.

8. 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.

9. Концевая, И. И. Каллусообразование и органогенез на листовых эксплантах березы / И. И. Концевая, А. А. Яцына // Проблемы лесоведения и лесоводства. – Гомель, 2000. – Вып. 51. – С. 193–201.

10. Яцына, А. А. Регенерация побегов на листьях березы / А. А. Яцына, И. И. Концевая // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений : сб. науч. тр. – Гомель, 2003. – Вып. 59. – С. 258–262.

11. Концевая, И. И. Изучение морфогенеза в культуре тканей листьев *Betula obscura* Kotula ex Fiek / И. И. Концевая, А. А. Яцына // Проблемы лесоведения и лесоводства : сб. науч. тр. – Гомель, 2005. – Вып. 64. – С. 219–227.

12. Galoch, E. Growth and Organogenesis of Callus from Juvenile and Adult Plants of *Betula verrucosa* Ehrh. / E. Galoch, J. Czalewska // Bul. Of the Polish Academy of Sci. Biol. Sci. – 1991. – Vol. 39, № 3. – P. 275–280.

13. Lemmetyinen, J. Activity of the CaMV35S promoter in various parts of transgenic early flowering birch clones / J. Lemmetyinen [et al.] // Plant cell Reports. – 1998. – Vol. 18. – P. 243–248.

14. Mashkina, O. S. In vitro selection of birch for tolerance to salinity stress [Electronic resource] / O. S. Mashkina, T. M. Tabatskaya, O. M. Korchagin // IOP Conference Series : Earth and Environmental Science. – 2021. – Vol. 875 (1). – Mode of access : <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/875/1/012082/pdf>. – Date of access : 14.12.2021.

15. Концевая, И. И. Изучение морфогенетического потенциала сегментов междоузлий в культуре тканей березы повислой / И. И. Концевая, С. В. Жадько // Интернаука : научный журнал. – 2017. – № 8 (12), ч. 1. – С. 15–17.
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. Galoch, E. Growth and Organogenesis of Callus from Juvenile and Adult Plants of *Betula verrucosa* Ehrh. / E. Galoch, J. Czalewska // Bul. Of the Polish Academy of Sci. Biol. Sci. – 1991. – Vol. 39, № 3. – P. 275–280.
18. Lemmetyinen, J. Activity of the CaMV35S promoter in various parts of transgenic early flowering birch clones / J. Lemmetyinen [et al.] // Plant cell Reports. – 1998. – Vol. 18. – P. 243–248.
19. Jehan, H. Ontogenesis and ploidy level of plantlets regenerated from *Populus trichocarpa* x *deltoids* cv. Hunnegem root, leaf and stem explants / H. Jehan [et al.] // J. Plant Physiol. – 1994. – Vol. 144, № 4–5. – P. 576–585.
20. Fosker, D. E. Hormonal control of morphogenesis in cultured tissue / D. E. Fosker // Plant Growth Substances. – Berlin e. a., 1979–1980. – P. 362–369.
21. Бутова, Г. П. Клональное микроразмножение лесных древесных растений / Г. П. Бутова // Лесоводство, лесоведение, лесные пользования. Экспресс-информ. – М. : ЦБНТИ Гослесхоза СССР, 1987. – Вып. 7. – С. 1–24.
22. Payamnoor, V. Effects of explant type on callogenesis and the amount of betulin and betulinic acid produced under *in vitro* conditions in two birch species (*Betula* spp.) / V. Payamnoor, J. Nazari, R. Jafari Hajati // Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research. – 2019. – Vol. 35, is. 4. – P. 577–587.
23. Алексеева, Л. Л. Роль генотипа при размножении дуба черешчатого и сосны обыкновенной методом культуры тканей / Л. Л. Алексеева, М. Ю. Нечаева, Г. П. Бутова // Генет. и экол. основы повышения продуктивности лесов / НИИ лес. генет. и селекции. – Воронеж, 1993. – С. 65–73.
24. Станис, В. А. Влияние фитогормонов на морфогенез семядолей яблони в культуре ткани / В. А. Станис, Г. В. Станене, Б. С. Гялвонаускис // Физиол. раст. – 1991. – Т. 38, № 2. – С. 392–398.
25. Бутова, Г. П. Морфогенез и регенерация растений дуба черешчатого в культуре *in vitro* / Г. П. Бутова, Л. Л. Скробова // Физиология растений. – 1988. – Т. 35, вып. 5. – С. 1023–1029.
26. Хмара, К. А. Влияние генотипа материнского растения и веществ цитокининового типа действия на способность тканей зародыша ели обыкновенной (*Picea abies* L.) к органогенезу *in vitro* / К. А. Хмара, Н. В. Катаева // Физиол. раст. – 1993. – Т. 40, № 5. – С. 802–805.