

Применение абсцизовой кислоты при депонировании *Betula pendula* Roth. и *B. pubescens* Ehrh. в культуре *in vitro*

И.И. КОНЦЕВАЯ

Показана возможность хранения культуры березы повислой и пушистой в условиях *in vitro* в течение 12 месяцев при использовании питательных сред, дополненных абсцизовой кислотой, на фоне повышенной концентрации сахарозы, активированного угля и 6-бензиламинопурина. Выявлены существенные различия между апробированными клонами берез по их реакции на длительное хранение. Из тестируемых генотипов клон 3ф1 березы пушистой – наиболее устойчив к длительному беспересадочному культивированию.

Ключевые слова: абсцизовая кислота, регенерационная способность, культура *in vitro*, береза, депонирование.

The possibility of 12-months storing of silver and downy birch cultures *in vitro* using nutrient media supplemented with abscisic acid against a background of high concentrations of sucrose, activated carbon and 6-benzylaminopurine is shown in the paper. Significant differences in the reaction to long-term storage from the approved birch clones were found. Among the tested genotypes, the downy birch clone 3f1 is the most resistant to long-term non-crop cultivation.

Keywords: abscisic acid, regenerative capacity, culture *in vitro*, birch, depositing.

Введение. В последнее десятилетие для поддержания обширных коллекций растений активно используют клеточные культуры [1]. В настоящее время развиваются следующие основные подходы к хранению культур растений: криосохранение, депонирование растущей коллекции при пониженных положительных температурах, изменение концентрации углеводов в среде, индукция осмотического стресса, использование ретордантов, снижение атмосферного давления в культуральных сосудах, гипоксия и другие [2].

Наибольшее распространение получил метод криоконсервации, который активно реализуется в биотехнологических лабораториях при достаточном финансировании [3], [4]. Однако данная процедура включает несколько этапов, на каждом из которых требуется специальное оборудование и индивидуальный для каждой культуры подбор криопротекторов, условий охлаждения и размораживания. Все это ограничивает применение данного способа сохранения. Встречаются единичные сведения о депонировании отдельных лесных древесных пород при низких положительных температурах [5]–[7], хотя такой метод неплохо разработан у лекарственных, плодовых и ягодных культур [8], [9].

Остальные вышеперечисленные методы депонирования растений в культуре *in vitro* применяются редко, поскольку слабо изучен их эффект замедления ростовых процессов в культуре тканей и практически не изучено их влияние на стабильность генотипов растений. Публикации по данному вопросу немногочисленны, хотя, несомненно, вызывают интерес. Поиск веществ, одновременно замедляющих рост растений и поддерживающих их жизнеспособность длительный период времени, отработка способов их применения, всегда будут востребованы.

Одним из наиболее активных эндогенных ингибиторов ростовых процессов является абсцизовая кислота (АБК). АБК рассматривается как антистрессовый фактор [10]. Было обнаружено, что АБК накапливается в растениях при различных неблагоприятных воздействиях (водном дефиците, повышенной концентрации солей, пониженной температуре и других). Вследствие накопления АБК происходит изменение белкового метаболизма и повышение устойчивости к стрессовому фактору [11]. Установлено, что добавление в питательную среду АБК тормозит рост культуры *in vitro* [12]–[14].

Целью настоящей работы явилось изучение возможности длительного беспересадочного культивирования *in vitro* эксплантов березы повислой и пушистой на средах, дополненных АБК, в том числе на фоне включения повышенного содержания сахарозы, активированного угля, 6-БАП.

Материал и методы исследования. В работе использовали микропобеги клона 3ф1 березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.) и клона 31 березы повислой (*B. pendula* Roth). Культуры росли на модифицированной агаризованной среде WPM без гормонов [15] при оптимальных условиях: температуре 23 ± 1 °С, 16-часовом фотопериоде, освещенности 2000–3000 лк. После 1 месяца культивирования в асептических условиях побеги разрезали на 1-узловые сегменты длиной 0,8–1,2 см, содержащие лист. Экспланты помещали на среду с соблюдением вертикальной ориентации. В опытных вариантах при разных комбинациях в составе питательных сред увеличивали содержание сахарозы (до 40 г/л), добавляли активированный уголь (20,0 г/л), 6-бензиламинопури́н (6-БАП) (0,5 и 2,0 мг/л), включали АБК (5,0 или 10,0 мг/л) (таблица 1).

Таблица 1 – Состав питательной среды

Номер среды	Сахароза, г/л	Активированный уголь, г/л	АБК, мг/л	6-БАП, мг/л
контроль	30,0	-	-	-
1	30,0	-	5,0	-
2	30,0	-	10,0	-
3	30,0	-	10,0	2,0
4	40,0	20,0	5,0	-
5	40,0	20,0	5,0	0,5

Объем использованных сосудов составлял 200 мл. В каждом из них было не менее 50 мл агаризованной питательной среды с рН равной 5,6–5,8. В культуральный сосуд помещали по 18–20 эксплантов и инкубировали при оптимальных условиях роста. Состояние эксплантов в процессе хранения визуально оценивали через 1, 3, 6, 9, 12 месяцев культивирования по следующим параметрам: процент эксплантов с признаками некроза, хлороза, усыхания, выраженных в полной степени либо частично; процент погибших эксплантов; интенсивность роста и развития (подсчитывали количество эксплантов с корнями, отмечали высоту побегов, степень развитости корней и побегов).

Спустя 6, 9 и 12 месяцев хранения по одному сосуду каждого варианта были извлечены из культуральной комнаты. Микрорастения черенковали на 1-узловые сегменты и переносили на безгормональную среду. В процессе пассирования материала подсчитывали число эксплантов, полученных из одного культурального сосуда. В течение 1 месяца узловые сегменты инкубировали при оптимальных условиях роста, после чего проводили оценку материала. Контролем служили экспланты, которые росли при стандартных условиях в течение 1 месяца. Определяли морфологические параметры сформировавшихся растений (высоту побегов, число листьев и корней, степень их развитости, длину корней). Обработку экспериментальных данных осуществляли по стандартным статистическим программам Microsoft Excel и «Statsoft (USA) Statistica v.7.0». Для сравнения изучаемых показателей между опытными и контрольными группами использовали t-критерий Стьюдента. Нулевую гипотезу отклоняли при уровне статистической значимости $p < 0,05$ [16].

Результаты и их обсуждение. С момента помещения эксплантов на питательную среду, развитие их проходило неравномерно, в зависимости от генотипа и состава среды. Обычно в течение первого месяца культивирования эксплантов наблюдали формирование из них полноценных растений на большинстве апробированных опытных средах. Наиболее интенсивное развитие микрорастений продолжалось еще и в последующие два месяца культивирования. Затем рост главных побегов минимизировался, хотя ростовые процессы продолжались вплоть до 9 месяца культивирования.

В таблице 2 представлены данные по влиянию условий длительного хранения культуры *in vitro* березы на пяти средах модифицированного состава на деструктивные изменения эксплантов, рост и развитие микрорастений после субкультивирования.

Таблица 2 – Влияние условий длительного хранения на деструктивные изменения эксплантов, рост и развитие микрорастений после субкультивирования

Вариант (среды- длительность хранения, мес)	Экспланты с признаками некроза, хлороза/ усыхания, %		Средняя высота микрорастений, см		Среднее число корней на растении, шт.	
	клоны		клоны		клоны	
	31	3ф1	31	3ф1	31	3ф1
контроль-1	0/0	0/0	5,7 ± 0,3	2,9 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,0 ± 0,3
1–6	75/0	0/30	1,1 ± 0,2*	3,8 ± 0,2	0,2 ± 0,02*	4,1 ± 0,3*
1–9	80/10	0/50	2,9 ± 0,5*	3,9 ± 0,2*	1,0 ± 0,4*	2,7 ± 0,3
1–12	100/0	0/100	3,2 ± 0,5*	2,7 ± 0,2	1,7 ± 0,5*	2,2 ± 0,3
2–6	75/0	0/15	2,9 ± 0,5*	3,7 ± 0,3	1,4 ± 0,4*	4,3 ± 0,4*
2–9	90/5	0/100	2,6 ± 0,6*	3,8 ± 0,2	0,9 ± 0,3*	4,1 ± 0,4*
2–12	95/5	10/90	3,2 ± 0,4*	2,9 ± 0,2	1,4 ± 0,3*	2,0 ± 0,3
3–6	95/0	0/40	3,2 ± 0,2*	4,3 ± 0,6*	1,1 ± 0,2*	3,9 ± 0,3*
3–9	95/0	0/60	3,5 ± 0,4*	3,6 ± 0,2	1,8 ± 0,4	3,7 ± 0,4*
3–12	95/0	0/100	3,9 ± 0,3*	2,9 ± 0,2	1,2 ± 0,4*	3,2 ± 0,3
4–6	0/50	0/20	2,6 ± 0,4*	3,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2*	3,6 ± 0,4*
4–9	60/40	0/100	3,3 ± 0,5*	3,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3*	2,8 ± 0,5
4–12	85/0	0/100	2,6 ± 0,4*	2,7 ± 0,2	1,4 ± 0,7	3,4 ± 0,5
5–6	50/10	0/10	2,4 ± 0,4*	3,8 ± 0,2	0,7 ± 0,2*	4,4 ± 0,5*
5–9	60/10	0/100	2,6 ± 0,3*	3,1 ± 0,2	1,0 ± 0,3*	3,6 ± 0,4*
5–12	85/15	5/95	4,9 ± 0,4	3,0 ± 0,2	2,0 ± 0,6	3,8 ± 0,4*

Примечание: уровень значимости при * $p < 0,01$

Наличие АБК, независимо от его концентрации в питательной среде, способствовало подавлению роста у 60–70 % эксплантов клона 31 березы повислой, которые оставались жизнеспособными, но не развивались в течение 3 месяцев инкубирования. Эти экспланты при дальнейшем культивировании сформировали развитые микрорастения. У клона 3ф1 березы пушистой для завершения ростовых процессов у большинства растений различных вариантов опыта потребовался период 3 месяца. Высота побегов на одной и той же среде существенно варьировала у обоих изученных генотипов во всех опытных вариантах.

Через 6–9 месяцев культивирования отмечали у растений появление боковых побегов, развившихся из пазушных почек. Независимо от состава среды, появление боковых побегов наблюдали у обоих исследуемых клонов березы в 10–100 %. Установлено, что цитокинин 6-БАП практически не подавлял апикальное доминирование. Об этом свидетельствуют результаты, полученные на апробированных генотипах в вариантах 3 и 5. Хотя, несомненно, совместное действие 6-БАП и АБК в первые месяцы культивирования негативно повлияло на рост микропобегов (таблица 2).

Независимо от состава питательной среды, самые развитые микрорастения спустя 9 месяцев культивирования достигали в высоту 8–14 см. Из-за ограничения объема культурального сосуда одревесневшие побеги переплетались, что ухудшало условия работы с материалом при черенковании и переносе эксплантов на свежие среды. Следует учитывать и формирование сильных, развитых корней. Возрастала вероятность инфицирования материала извне. При последующем пассировании таких микрорастений были изменены приемы работы.

Обычно к 12 месяцам инкубирования у растений клона 3ф1 березы пушистой формировались сильные, мощные корни. У клона 31 березы повислой либо совсем отсутствовали, либо были слабо развитые корни в вариантах 1 и 2 (таблица 2). Следует отметить, что независимо от наличия корней у изученных генотипов на среде 3, содержащей 2,0 мг/л 6-БАП, в основании побегов формировалась каллусная ткань кремового цвета с различной интенсивностью роста в пределах одного генотипа.

В результате длительного культивирования, одновременно с ростом и развитием эксплантов, наблюдали деструктивные изменения. Уже в течение трех месяцев хранения у клона 31 березы повислой отмечали в 10–75 %, в зависимости от состава питательной среды, полную

гибель растений в результате некроза и усыхания. Также наблюдали до 5–60 % микрорастений с незначительными признаками некроза. Обычно изменение зеленой окраски начинается постепенно, распространяясь по листу, независимо от положения на растении. Иногда листочки приобретали коричневую окраску, некоторые из них опадали. С удлинением периода хранения микрорастений, описанные выше деструктивные процессы становились у них более выраженными. Полностью засохшие или некротизированные растения обычно наблюдали спустя 6 месяцев. Число таких растений варьировало в зависимости от генотипа материала. Наиболее устойчивым генотипом к хранению оказался клон 3ф1 березы пушистой (таблица 2). По-нашему мнению, это связано с повышенной ploидностью березы пушистой ($2n = 56$).

Несмотря на то, что спустя 12 месяцев хранения количество питательной среды уменьшилось в сосудах незначительно, основная причина гибели растений – усыхание как побегов, так и листьев. К 9–12 месяцам беспересадочного инкубирования почти все растения березы, независимо от видовой принадлежности, полностью или частично подверглись процессу старения (таблица 2). У березы повислой спустя 12 месяцев культивирования наблюдали на фоне полного усыхания 80–95 % материала развитие единичных сильных растений с развитыми побегами. В этих же условиях культивирования у березы пушистой отмечали гибель в 5–10 %, а выжившие микрорастения характеризовались симптомами усыхания в равной небольшой степени.

Способность эксплантов к росту и пролиферации после различных периодов хранения была оценена после того, как культуры перенесли на свежую среду и инкубировали при стандартных условиях в течение 1 месяца. Поскольку ранее на березе повислой было установлено, что с увеличением длительности холододового хранения отмечается тенденция сначала к увеличению, а спустя 5–9 месяцев – к снижению показателей изученных морфологических параметров растений после 30-дневного субкультивирования [5], в настоящем эксперименте пассирование материала на свежую безгормональную среду выполняли после 6, 9 и 12 месяцев.

У изученных генотипов отмечали при дальнейшем клонировании тенденцию уменьшения суммарного числа 1-узловых сегментов побегов от возрастания периода хранения.

В процессе культивирования при стандартных условиях экспланты росли и развивались, формируя побеги и корневую систему. Выявлено, что растения клона 31 березы повислой после инкубирования на опытных средах во втором пассаже имели более низкие значения по высоте растений, числу листьев и корней на растении по сравнению с контролем. И эта тенденция сохранялась независимо ни от состава питательной среды, ни от периода длительности первого пассажа. У растений клона 3ф1 березы пушистой отмечали стабильное развитие эксплантов. В опытных вариантах значения морфометрических показателей микрорастений были равны либо превышали значение в контроле (таблица 2).

Приведенные в настоящей работе результаты свидетельствуют о неоднозначном влиянии апробированных составов питательных сред на состояние эксплантов березы при разной длительности периода хранения. Выявлены симптомы некроза, хлороза, усыхания, затрагивающие частично или полностью микрорастения. Сходные симптомы были отмечены исследователями на других древесных растениях в результате хранения материала при низких положительных температурах [7]. Скорость развития деструктивных изменений на эксплантах зависит от объема питательной среды. Высыхание среды является естественным процессом, прежде всего, из-за потери воды, что, тем не менее, негативно сказывается на статусе длительно инкубированных растений. В данном эксперименте изначально был подобран оптимальный объем питательной среды в одном культуральном сосуде и количество эксплантов, помещенных в сосуд. Спустя 12 месяцев культивирования визуально не наблюдали значительного уменьшения количества среды в сосуде.

По данным НИЦ EVIKA (Эстония), у них сохраняется *in vitro* более 1292 представителей 34 видов растений в генобанке, где основное внимание уделено хранению меристемных растений и микрорастений. При этом активно используются составы сред с цитокининами (БАП, кинетином), повышенным содержанием сахарозы и калия. Лучшие результаты по сохранению высокой жизнеспособности микрорастений отмечали в присутствии высоких концентраций БАП и сахарозы [17].

В ряде случаев серьезной проблемой является выделение растениями в среду фенольных и иных соединений, подавляющих рост и вызывающих гибель культуры. Включение в состав сред активированного угля позволило успешно культивировать такие растения [18]. На древесных культурах (береза, тополь, осина) также показано, что введение активированного угля (1,5–2,0 %) в питательные среды, предназначенные для длительного хранения культур, способствовало удлинению периода между пересадками до 6 месяцев с сохранением их жизне- и регенерационной способности [6].

Существенный интерес представляет исследование применения АБК при криоконсервации растений, чтобы увеличить морозоустойчивость тканей и клеток [11]. Использование АБК для поддержания жизнеспособности культуры тканей при оптимальных условиях роста или в условиях пониженных положительных температур свидетельствует о зависимости эффекта АБК от генотипа материала [13]. На различных видах растений показано позитивное влияние АБК в концентрации 10–20 мг/л на сохранение жизнеспособности и регенерационную активность культуры тканей [13]–[14]. Имеются сведения об ингибирующем влиянии АБК, применяемого в инкубационных средах, на рост и развитие микрорастений дуба после второго периода субкультивирования [12].

Апробированные в нашем эксперименте составы питательных сред практически не влияли на развитие микрорастений ни в первом, ни во втором пассажах после разных периодов хранения. Даже если растения и характеризовались понижением темпов роста побегов по сравнению с контролем, то по развитию корневой системы они превосходили контрольные растения.

Несомненно, состав питательной среды, используемой при депонировании растительного материала, имеет большое значение. При разработке протоколов исследователь обязан выбирать: применять или не применять гормоны, стимуляторы роста или иные БАВ для повышения жизнеспособности и предотвращения потери регенерационной активности у растений, длительное время культивированных при определенных условиях без пассирования. Необходимо помнить о соматоклональной изменчивости в культуре тканей, которая может реализоваться в значительную индуцированную изменчивость.

Заключение. Представленные результаты показали возможность хранения культуры березы повислой и березы пушистой в условиях *in vitro* в течение 12 месяцев при использовании питательных сред, дополненных АБК, при повышенной концентрации сахарозы, активированного угля и 6-БАП. Отсутствует негативное влияние тестируемых веществ на рост и развитие эксплантов березы, субкультивированных после разных сроков хранения на свежие среды. Выявлены существенные различия между апробированными клонами берез по их реакции на длительное хранение. Из исследуемых генотипов клон 3ф1 березы пушистой наиболее устойчив к длительному беспересадочному культивированию независимо от сроков хранения. Необходим периодический визуальный контроль за состоянием микрорастений и, по мере необходимости, пересадка растений на свежую питательную среду.

Работа выполнена при поддержке ГПНИ (№ темы М16-33).

Литература

1. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования / О.И. Молканова [и др.] // Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о Земле. – 2010. – Вып. 3. – С. 33–39.
2. Towill, L.E. Biotechnology and germplasm preservation / L.E. Towill // Plant breed. rev. – 1989. – № 7. – P. 159–182.
3. Cryopreservation of *in vitro* tissue of deciduous forest trees / D.M. Reed [et al.] // Plant cryopreservation: a practical guide. – New York : Springer, 2007. – P. 365–386.
4. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях: методические указания / Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. институт растениеводства им. Н.И. Вавилова ; сост.: С.Е. Дунаева ; под ред. докт. биол. наук Т.А. Гавриленко. – Санкт-Петербург : ВИР, 2011. – 64 с.
5. Концевая, И.И. Хранение *Betula Pendula* Roth. в культуре *in vitro* при низких положительных температурах / И.И. Концевая, А.А. Яцына // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2003. – № 1. – С. 14–17.

6. Рекомендации по сохранению и воспроизводству методами биотехнологии ценных генотипов карельской березы, осины, тополя белого и сереющего / сост. О.С. Машкина, Т.М. Табацкая. – Воронеж : ВГУ, 2005. – С. 2–9.
7. Janeiro, L.V. Cold Storage of in vitro cultures of wild cherry, chestnut and oak / L.V. Janeiro, A.M. Vieitez, A. Ballester // Ann. sci. for. – 1995. – Vol. 52. – P. 287–293.
8. Сохранение генофонда растений, вегетативно размножаемых в условиях in vitro, во Всероссийском институте растениеводства им. Н.И. Вавилова / С.Е. Дунаева [и др.] // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 9. – С. 789–790.
9. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры / В.Б. Белокурова [и др.] // Цитология и генетика. – 2005. – № 1. – С. 41–51.
10. Кефели, В.И. Природные ингибиторы роста / В.И. Кефели // Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 3. – С. 471–480.
11. Четверикова, Е.П. Роль абсцизовой кислоты в морозоустойчивости растений и криоконсервации культур in vitro / Е.П. Четверикова // Физиология растений. – 1999. – Т. 46, № 5. – С. 823–929.
12. Gebhardt, K. Micropropagation and restricted-growth storage of adult oak genotypes / K. Gebhardt, U. Fruhwacht-Wilms, H. Weisgerber // Ann. sci. for. – 1993. – Vol. 50, Suppl. 1. – P. 323–329.
13. Jarret, R.L. Abscisic acid-induced growth inhibition of sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) in vitro / R.L. Jarret, N. Gawel // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. – Vol. 24, № 1. – P. 13–18.
14. Сидорович, Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас. – Минск : Наука і тэхніка, 1996. – 249 с.
15. 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.
16. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
17. Kotkas, K. The application of biotechnological methods on preservation of plant biological diversity in Estonia / K. Kotkas, V. Vasar, A. Vaasa // Бюл. гос. Никит. ботан. сада. – 2002. – № 85. – С. 27–30, 65.
18. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры / В.Б. Белокурова [и др.] // Цитология и генетика. – 2005. – № 1. – С. 41–51.

Гомельский государственный
университет им. Ф. Скорины

Поступила в редакцию 25.03.2018