



УДК 581.14.6 : 674.031.632.134.2

И.И. КОНЦЕВАЯ, Л.В. ШЕВЦОВА

## ДЕЙСТВИЕ ЦИТОКИНИНОВ И АНТИБИОТИКА ЦЕФОТАКСИМА НА ПРОЦЕСС РЕГЕНЕРАЦИИ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ *BETULA PENDULA* ROTH. VAR. *CARELICA* MERCKL.

The article is devoted the studying of influence of cytokinins and antibiotic cefotaxim on the regeneration of leaf explants of two Karelian birch clones. The variation of induction of shoots formation frequency on the leaf explants of two Karelian birches clones 76 and 81 is revealed. High organogenic ability of leaf explants of clone 76 is established in comparison with clone 81. Optimum concentration of TDZ in a nutritive medium, stimulating organogenesis *in vitro* is 0,0005÷0,005 mg/l. High proliferative activity of adventive buds and shoots is revealed at addition of 2,0 mg/l BAP and 5,0 mg/l zeatin in medium. Addition 500 mg/l of the antibiotic cefotaxim in medium containing thidiazuron and zeatin essentially raises the effect of stimulation of regenerative activity of the Karelian birch somatic tissues by these regulators of growth.

Для деревообрабатывающей промышленности особый интерес представляет редкая генетическая разновидность березы повислой (*Betula pendula*) – береза карельская (*B. pendula* Roth. var. *carelica* Merckl.). Ее древесина благодаря своей узорчатой структуре является очень ценной. Беларусь относится к странам с богатым естественным генетическим потенциалом и значительными ресурсами карельской березы, однако в результате антропогенных и природных воздействий ее насаждения с каждым годом уменьшаются [1]. Использование биотехнологических методов в программах по селекции древесных лесных растений позволяет ускорить селекционный процесс, сохранить и расширить генетическое разнообразие растений.

Для некоторых видов березы имеются сведения о регенерационной способности листовых эксплантов [2–7]. Основное внимание исследователями уделено оптимизации гормонального состава среды для повышения побегообразующей способности листьев. Отмечено преимущество использования в качестве регуляторов роста цитокининовой природы 6-бензиламинопурина (БАП) [5, 6] или зеатина [2–4, 7], установлены их оптимальные концентрации для некоторых видов древесных растений. В последнее десятилетие в работах по агробактериальной трансформации березы повислой в качестве цитокинина стали активно использовать тидиазурон (1-фенол-3-(1,2,3-тиадиазол-5-YL) UREA) (TDZ, дропп) [3, 4]. Предположение о цитокининовой природе тидиазурана и возможности использования его в культуре тканей древесных лесных пород было высказано более 20 лет назад [8].

Анализ литературы показал, что в настоящее время существует острая проблема инфицированности культуры клеток, органов и тканей древесных растений эпифитными и эндофитными микроорганизмами, что создает серьезные затруднения в технологии получения регенерантов и указывает на необходимость применения антибиотиков на разных этапах работы с культурой *in vitro* [6]. Особый интерес в этом отношении представляют антибиотики группы цефалоспоринов, которые эффективны в относительно низких дозах, имеют широкий спектр противомикробного действия и низкую токсичность для эукариот. Подавляя синтез клеточной стенки бактерий, цефалоспорины проявляют высокую бактериоцидную активность в отношении многих грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, устойчивых к другим антибиотикам. Установлено неоднозначное влияние цефалоспоринов на морфогенетическую активность эксплантов различных растений [2, 3, 5, 6]. При этом

пока не выяснено их действие на регенерационные процессы соматических тканей березы карельской. Ранее нами было выявлено, что береза карельская относится к тем видам растений, для которых концепция Скуга – Миллера не соблюдается [5, 6]. Это указывает на необходимость использования эмпирического подхода при работе с культурой тканей данной древесной породы, в частности при конструировании оптимальных сред.

Целью наших исследований было изучение зависимости регенерационной способности листовых эксплантов березы карельской от клоновой принадлежности эксплантов, наличия в составе питательной среды цитокининов, в том числе тидиазурина, и антибиотика группы цефалоспоринов – цефотаксима.

#### Материал и методика

В качестве объектов исследования были выбраны клоны 76 и 81 березы карельской. В качестве эксплантов использовали целые листья одномесячных микрорастений. В асептических условиях отсекали листья с небольшим черешком, которые затем помещали нижней стороной на поверхность среды. Основу питательной среды составляла смесь неорганических солей WPM [9]. Витамины, микроэлементы добавляли по прописи Мурасиге – Скуга [10]. Одновременно ставили две серии опытов: с использованием в одном случае регуляторов роста, в другом – регуляторов роста (в тех же концентрациях) в сочетании с антибиотиком цефотаксимом. Испытывали следующие регуляторы роста растений в указанных концентрациях (мг/л): БАП – 2,0, зеатин – 5,0, TDZ – 0,0005÷1,0. Концентрация цефотаксима во второй серии опытов составляла 500 мг/л. В качестве контроля 1 использовали модифицированную среду WPM без регуляторов роста. Контроль 2 отличался от контроля 1 наличием в составе среды антибиотика цефотаксима в концентрации 500 мг/л. Перед стерилизацией pH среды доводили до 5,6÷5,8. Автоклавировали среды при 1,1 атм в течение 20 мин. TDZ, зеатин и цефотаксим вносили в стерильных условиях в охлажденную до 45 °С агаризованную среду. После этого опытные среды разливали по культуральным сосудам. Материал культивировали при температуре 25±1 °С, фотопериоде 16 ч и освещенности 2–3 тыс. лк. В исследовании использовали каждый вариант в 15÷20-кратной повторности.

Наблюдения за состоянием и ростом культур проводили каждые 10 дней. Материал просматривали под микроскопом МБС-10. Чистоту растительного материала контролировали визуально. В ходе опыта учитывали способность эксплантов к побегообразованию, каллусообразованию, ризогенезу, количество адвентивных почек и побегов на одном экспланте, а также процент некротизированных эксплантов. Состояние каллуса оценивали по цвету, консистенции и интенсивности роста по 3-балльной шкале. Для определения регенерационной способности экспланты вместе с полученными структурами переносили на свежую среду без регуляторов роста и культивировали при оптимальных условиях в течение трех недель. Показатели параметра «среднее число почек на экспланте» рассчитывали с учетом всей выборки. Статистический анализ полученных данных был выполнен с использованием программы Microsoft Excel. Для определения достоверных различий между вариантами опыта и контролем вычисляли критерий Стьюдента *t*.

#### Результаты и их обсуждение

В течение первых 10 дней культивирования на листовых эксплантах не наблюдали никаких изменений. Спустя 20 дней в большинстве опытных вариантов было отмечено увеличение размеров эксплантов и пролиферация клеток на срезе черешка у листьев. Одной из причин индукции каллусогенеза у основания листовой пластинки и на черешке является то, что в отделенном от растения листе транспорт ассимилятов из листовой пластинки в основание черешка продолжается. В дальнейшем в процессе культивирования мы наблюдали за ростом каллуса в зависимости от присутствующего в среде регулятора роста. Помимо каллусогенеза, на листьях было отмечено образование двух типов органогенных структур: адвентивных почек и адвентивных корней. Активность регенерационных процессов зависела как от клоновой принадлежности экспланта, так и от среды культивирования. На среде без регуляторов роста ризогенез происходил на 50÷100 % листовых эксплантов обоих клонов березы. При культивировании эксплантов на средах с цитокининами корнеобразование либо отсутствовало, либо интенсивность его была очень низкой. Интересно, что дифференциация корней происходила непосредственно из тканей среза черешка или листовой пластинки при культивировании их на безгормональных средах, в то время как адвентивные почки образовывались посредством каллусной культуры на средах, дополненных цитокининами. Аналогичные результаты были получены исследователями и на березе повислой [2, 4].

Нами и другими авторами ранее было установлено, что для активизации регенерационных процессов на эксплантах требуется их субкультивирование на свежие среды с уменьшенным содержанием

концентрации гормонов либо при их отсутствии. Это обусловлено тем, что на средах с регуляторами роста процессы дифференциации органогенных структур и их развитие протекают медленнее [2, 5]. В данном исследовании окончательная оценка влияния гормонального состава питательной среды и клоновой принадлежности эксплантов на морфогенез была выполнена в конце второго пассажа, т. е. спустя 50 дней от начала культивирования.

Все апробированные в опыте концентрации цитокининов стимулировали каллусогенез у 100 % листовых эксплантов клона 76. При этом интенсивность роста каллуса при наличии в среде тидиазурина в концентрации 0,005÷0,5 мг/л была оценена как «очень хорошая», в остальных вариантах первой серии опыта (основная среда + регуляторы роста) наблюдали рост каллуса плохой и средней интенсивности. У клона 81 на листовых эксплантах в вариантах данного опыта отмечали чаще плохой рост каллусной ткани, реже – хороший (таблица).

**Влияние цитокининов и цефотаксима (ЦФ) на морфогенез в культуре листовых эксплантов *B. pendula* var. *carelica***

Вариант опыта (концентрация регуляторов роста в мг/л)	Экспланты, %			Рост каллуса, балл	Минимальное и максимальное число на экспланте		Среднее число почек на экспланте ( $\bar{x} \pm Sx$ ), шт.
	с каллусом	с корнями	с почками		почек	корней	
Клон 76							
Контроль 1 (среда WPM, б/г)	0	100	0	0	—	1÷4	—
TDZ 0,0005	100	46,7	93,3	1	5÷15	1÷3	6,9±1,40***
TDZ 0,005	100	0	50,0	3	1÷5	—	1,5±0,4**
TDZ 0,05	100	0	50,0	3	1÷5	—	0,2±0,05*
TDZ 0,5	100	0	0	3	—	—	—
TDZ 1,0	100	0	0	1, 2	—	—	—
Зеатин 5,0	100	20,0	100	2	1÷10	3÷6	5,9±0,91***
БАП 2,0	100	15,0	85,0	2, 1	1÷15	1÷4	4,8±1,01***
Контроль 2 (среда WPM + ЦФ 500 мг/л)	0	100	0	0	—	1÷7	—
TDZ 0,0005 + ЦФ	100	20,0	100	1	2÷15	2÷5	8,3±1,02***
TDZ 0,005 + ЦФ	100	15,0	100	3	3÷30	2÷4	10,9±1,21***
TDZ 0,05 + ЦФ	100	0	15,0	3	1÷3	—	0,3±0,15
TDZ 0,5 + ЦФ	100	0	0	2	—	—	—
TDZ 1,0 + ЦФ	100	0	0	2	—	—	—
Зеатин 5,0 + ЦФ	100	66,7	100	2	1÷15	2÷5	7,8±0,93***
БАП 2,0 + ЦФ	100	80,0	75,0	1, 2	1÷7	2÷5	2,7±0,52***
Клон 81							
Контроль 1	0	50,0	0	0	—	1÷3	—
TDZ 0,0005	12,5	0	13,3	1	1÷3	—	0,2±0,08
TDZ 0,005	100	0	0	2	—	—	—
TDZ 0,05	100	0	0	2	—	—	—
TDZ 0,5	100	0	0	1	—	—	—
TDZ 1,0	100	0	0	1	—	—	—
Зеатин 5,0	100	10,0	0	1	—	1÷3	—
БАП 2,0	100	0	0	2, 1	—	—	—
Контроль 2	0	30,0	0	0	—	1÷2	—
TDZ 0,0005 + ЦФ	0	0	0	0	—	—	—
TDZ 0,005 + ЦФ	100	0	100	3	1÷8	—	3,9±0,62***
TDZ 0,05 + ЦФ	100	0	6,7	2, 3	1÷2	—	0,1±0,05
TDZ 0,5 + ЦФ	100	0	0	1	—	—	—
TDZ 1,0 + ЦФ	100	0	0	1	—	—	—
Зеатин 5,0 + ЦФ	100	6,3	20,0	1	1÷3	1÷3	0,5±0,24
БАП 2,0 + ЦФ	100	0	0	1	—	—	—

Примечание. Рост каллуса: 0 – отсутствует, 1 – плохой, 2 – хороший, 3 – очень хороший; \*, \*\*, \*\*\* – отличия от контроля значимы при  $p < 0,05$ ; 0,01; 0,001 соответственно.

Следует отметить, что каллус, сформировавшийся на средах с цитокининами, проявлял органо-генную активность в зависимости от клоновой принадлежности экспланта. При культивировании листовых эксплантов клона 76 на среде с тидиазурином в концентрации 0,5÷1,0 мг/л регенерация корней и почек отсутствовала. На остальных опытных средах насчитывали до 15÷100 % эксплантов с органогенными структурами. Число сформировавшихся корней на экспланте колебалось от 1 до 6. Число адвентивных почек составляло в среднем 0,2÷6,9 штук. Наиболее высокая побегообразующая

активность установлена у листовых эксплантов при культивировании на средах, содержащих тидиазурон (0,0005 мг/л), зеатин (5,0 мг/л) и БАП (2,0 мг/л) (см. таблицу). У клона 81 мы наблюдали низкую активность регенерации у культуры каллуса и тканей первичных эксплантов. На его листовых эксплантах во всех вариантах опыта органогенез практически отсутствовал, были зарегистрированы только единичные случаи формирования корней и почек.

В ходе исследования установлено, что присутствие в питательной среде цефотаксима в концентрации 500 мг/л в большинстве вариантов опыта не оказывает существенного действия на процесс каллусообразования, так как интенсивность роста каллуса, месторасположение его на экспланте, процент каллусогенеза практически не отличались от таковых в вариантах опыта с цитокининами без антибиотика. Нами не выявлено стимулирующего влияния цефотаксима на активность ризогенеза у листовых эксплантов обоих клонов березы карельской. Однако при включении цефотаксима в состав среды, содержащей 0,005 мг/л тидиазурина, у листовых эксплантов обоих клонов березы карельской произошло увеличение побегообразующей способности в 4÷8 раз ( $p < 0,001$ ). При этом дифференциация адвентивных побегов из каллусной ткани, образовавшейся на листовых эксплантах, и развитие индуцированных в первом пассаже адвентивных почек зависели от клоновой принадлежности эксплантов, вида и концентрации цитокининов. Установлено, что клон 76 березы карельской обладает более высокой побегообразующей способностью по сравнению с другим изученным клоном (см. таблицу).

Эффективность микробицидного действия цефотаксима в культуре тканей *in vitro* была установлена при последующем культивировании экспериментального материала на безгормональных средах. У регенерантов, полученных в первой серии опыта, рост микрофлоры в среде наблюдался через 1÷3 пассажа. Об этом свидетельствовало интенсивное помутнение питательной среды вокруг корней микрорастений. У регенерантов второй серии опыта, когда в состав регенерационных сред вводили цефотаксим, рост микрофлоры наблюдали спустя 6÷9 пассажей.

К настоящему времени уже было известно, что регенерация адвентивных почек на листьях *B. pendula* идет на средах МС и WPM только в присутствии фитогормонов зеатина (группа цитокининов) в концентрации 5÷10 мг/л и индолилуксусной кислоты (ИУК) (группа ауксинов) [2]. Ранее нами было показано, что побегообразование у этого вида березы хорошо осуществляется на средах, содержащих БАП или 2ip [5, 6], но у березы карельской при добавлении ауксинов к среде с БАП интенсивность побегообразования на листовых эксплантах снижается в 2÷10 раз [11].

Представленные в данной статье результаты исследования подтверждают выраженный стимулирующий побегообразование эффект БАП (концентрация 2,0 мг/л) и зеатина (5,0 мг/л) на соматических тканях только одного из двух тестируемых клонов березы карельской. У второго клона эти цитокинины в указанных концентрациях не проявили органогенной, в частности побегообразующей, активности. Нами определена эффективная концентрация тидиазурина – 0,0005÷0,005 мг/л. При этом его стимулирующий эффект при концентрации 0,005 мг/л наблюдали и у клона березы карельской, отличающегося низкой активностью побегообразования и даже его отсутствием при наличии в среде цитокининов, в том числе и тидиазурина в других опытных концентрациях. Полученные результаты согласуются с данными [12]. Это доказывает необходимость оптимизации состава питательных сред в зависимости от биологических особенностей и генотипа исходного растения.

Ранее на березе уже было установлено положительное воздействие антибиотиков на рост культивируемых тканей и морфогенез [2, 3, 5, 6]. Результаты исследований ряда авторов позволили сделать вывод о том, что подбор вида и эффективной концентрации антибиотика нужно проводить индивидуально для каждого генотипа растения. Ранее авторы работы [2] на листьях *B. pendula* показали, что при добавлении оптимального количества цефотаксима (47,7 мг/л) в регенерационную среду число эксплантов с адвентивными побегами возрастает по сравнению с контролем в два раза – с 38 до 78 %. В исследованиях М. Такеши [3] для получения регенерантов на листовых дисках *B. platyphylla* var. *japonica* была использована индукционная гормональная среда, дополненная смесью антибиотиков. В предыдущих наших работах было показано положительное влияние цефотаксима и карбенициллина в концентрации 300÷500 мг/л на регенерационную способность 1–2-почечных сегментов у *B. pendula*. При этом было отмечено выживание 100 % эксплантов, которые не теряли свою регенерационную способность [5]. Данными исследованиями выявлено как стимулирующее, так и подавляющее влияние цефотаксима, добавленного в индукционную регенерационную среду, на процессы каллусогенеза и органогенеза в культуре листовых эксплантов *B. pendula* var. *carelica*. Так, установлено достоверное увеличение в 1,5÷4 раза числа почек на экспланте при добавлении этого антибиотика в среды

с зеатином и тидиазуоном ( $0,0005 \div 0,05$  мг/л). В то же время на среде с БАП на эксплантах отмечено существенное подавление процесса органогенеза в присутствии антибиотика цефотаксима.

\* \* \*

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлено варьирование частоты индукции побегообразования у листовых эксплантов клонов 76 и 81 березы карельской. Установлена высокая органогенная способность листовых эксплантов клона 76 по сравнению с клоном 81. Определена оптимальная концентрация тидиазуона в питательной среде ( $0,0005 \div 0,005$  мг/л), стимулирующая морфогенез *in vitro* в культуре тканей. Высокая пролиферирующая активность у адвентивных почек и побегов на листовых эксплантах березы карельской также проявляется при введении в среду БАП и зеатина в концентрации 2,0 и 5,0 мг/л соответственно. Использование цефотаксима (500 мг/л) на этапе мультипликации позволяет подавлять рост микрофлоры в культуре клеток, тканей и органов в течение длительного периода времени без негативного воздействия на процесс морфогенеза. Добавление в среды с тидиазуоном и зеатином антибиотика цефотаксима существенно повышает эффект стимулирования регенерационной активности соматических тканей березы карельской этими регуляторами роста.

1. Живулькина Е.В., Клименкова Л.К., Короткевич Н.А. и др. // Ботаника: исследования / Ин-т эксперимент. ботаники им. В.Ф. Купревича. Мн., 2005. Вып. 33. С. 135.
2. Valobra C.P., James D.J. // Plant Cell, Tissue and Organ Cult. 1990. Vol. 21. № 1. P. 51.
3. Takeshi M., Mukai Y., Shinohara K. // Plant Science. 1997. Vol. 127. P. 53.
4. Pappinen A., Degefu Y., Syrjälä L. et al. // Plant Cell Rep. 2002. Vol. 20. P. 1046.
5. Концевая И.И., Яцына А.А. // Проблемы лесоведения и лесоводства. Гомель, 2000. Вып. 51. С. 193.
6. Концевая И.И. // Лесоведение. 2011. № 1. С. 45.
7. Концевая И.И. // Проблемы лесоведения и лесоводства: Сб. науч. тр. Гомель, 2008. Вып. 68. С. 205.
8. Huettelman C.A., Preece J.E. // Plant Cell Tissue Organ. 1993. Vol. 33. P. 105.
9. Lloyd G., McCown B. // Proc. Intl. Plant Prop. Soc. 1980. № 30. P. 421.
10. Murashige T., Skoog F. // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15. № 13. P. 473.
11. Яцына А.А., Концевая И.И. // Лес – экология и ресурсы: Материалы Междунар. науч.-практ. конф. Мн., 1998. С. 112.
12. Ryynänen L., Ryynänen M. // Silva fenn. 1986. Vol. 20. № 2. P. 139.

Поступила в редакцию 28.04.11.

**Ирина Ильинична Концевая** – кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии растений ГГУ им. Ф. Скорины.

**Людмила Викторовна Шевцова** – кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии растений ГГУ им. Ф. Скорины.