

Влияние 6-бензиламинопурина и карбенициллина на морфогенез в культуре листовых эксплантов *Betula pubescens* Ehrh.

И.И. КОНЦЕВАЯ

Статья посвящена определению влияния 6-БАП и антибиотика карбенициллина, добавленных в питательную среду, на процесс морфогенеза в культуре листовых эксплантов *Betula pubescens* Ehrh. Показано, что ориентация листовой пластинки на среде может оказывать значительное влияние на интенсивность побегообразования в зависимости от концентрации органических добавок. Выявлена закономерность: большая часть адвентивных почек и побегов образуется на той стороне листовой пластинки, которая соприкасается со средой.

Ключевые слова: 6-БАП, карбенициллин, морфогенез *in vitro*, регенерационная способность, береза.

The article is devoted to the specification of the effect of 6-BAP and antibiotic carbenicillin, that were added to the substratum on the process of morphogenesis in culture leaves of explants of *Betula pubescens* Ehrh. It is proved that the orientation of the leaf blades on the substratum can make a significant effect on the rate of sprout production depending on the concentration of organic additives. The regularity was found: the majority of adventitious buds and sprouts forms on the side of the leaf blade, which is in contact with the substratum.

Keywords: 6-benzylaminopurine, carbenicillin, morphogenesis *in vitro*, regenerative capacity, birch.

Введение. Во многих странах для реализации государственных программ по генетическому улучшению лесных древесных пород разрабатываются технологии, основанные на культивировании *in vitro* клеток, тканей и органов. Культура *in vitro* представителей рода *Betula* L. вызывает у исследователей и практиков-лесоводов большой интерес. Без совершенствования данного метода невозможно развитие генетической инженерии. В результате различных манипуляций создают трансгенные растения, которые могут обладать важными и полезными признаками. Для получения трансгенных растений должна быть разработана эффективная система регенерации побегов из трансформированных клеток и тканей. Чаще всего при генноинженерных манипуляциях в качестве эксплантов используют листья. Морфогенетические процессы в культуре листовых эксплантов изучены у различных видов растений. Они зависят от многих факторов, таких как генотип источника экспериментального материала, количественный и качественный состав экзогенных регуляторов роста, солевой состав питательной среды, освещенность листовых эксплантов при культивировании, возраст листьев, способ их нарезания, ориентация листа на среде и другие [1]–[3].

Несмотря на интенсивные исследования по микроклональному размножению и получению трансгенных растений разных представителей рода *Betula* L., данные о морфогенетической активности листовых эксплантов *B. pubescens* отсутствуют, хотя как тетраплоидный вид он должен вызывать особое внимание у биотехнологов ввиду высокой морфогенной активности в культуре тканей [4]. Являясь во многих странах, включая Республику Беларусь, естественным часто встречаемым насаждением наравне с березой повислой, береза пушистая может представлять важный исходный материал для лесной промышленности при условии искусственной селекции. Установлены формы березы пушистой, перспективные для отбора по интенсивности роста [5].

На сегодняшний день исследования по оптимизации регенерационной, в том числе побегообразующей, способности для разных видов берез остаются актуальными. Поэтому целью наших исследований явилось изучение зависимости морфогенной и регенерационной активности листовых эксплантов *B. pubescens* от состава питательной среды (концентрации 6-бензиламинопурина и присутствия антибиотика карбенициллина) и ориентации листового экспланта на питательной среде.

Материал и методы исследования. Объектом исследования явился клон 3ф1 березы пушистой (*B. pubescens* Ehrh.). Исходный материал был получен из вегетативной почки взрослого плодоносящего материнского дерева. Выбор дерева определялся быстрым ростом и здоровым состоянием насаждения. В качестве эксплантов использовали листья, вычлененные у 1-месячных микроклональных растений, которые культивировали на безгормональной среде. В асептических условиях отсекали листья, оставляя небольшой черешок длиной 1–2 мм. На каждом экспланте с помощью скальпеля делали несколько насечек на листовых пластинках. Затем листья помещали на среду: либо абаксильной (нижней) либо адаксильной (верхней) стороной. Основу питательной среды составляла смесь неорганических солей для древесных WPM [6]. Витамины, микроэлементы добавляли по прописи Мурасиге и Скуга [7]. В качестве фитогормонов испытывали цитокинин 6-бензиламинопурин (6-БАП, БАП) в концентрации (мг/л): 1,0; 2,0; 5,0. Также изучали влияние антибиотика карбенициллина в концентрации 500,0 мг/л на морфогенетические процессы в тканях листьев. Стерильный раствор карбенициллина добавляли в асептических условиях в проавтоклавированную и охлажденную до 45 °С питательную среду, которую готовили с добавлением агара (6 г/л) и сахарозы (30 г/л). В качестве контроля использовали модифицированную среду WPM, без органических добавок. рН среды перед стерилизацией доводили до 5,6–5,8. Автоклавировали среды при 1,1 атм в течение 20 мин. Материал культивировали при температуре 25 ± 1 °С, с фотопериодом 16 часов и освещенностью 3–4 тыс. лк. Число повторностей в каждом варианте составляло 30.

Наблюдения за состоянием и ростом культур осуществляли каждые 10 дней. Материал просматривали под микроскопом МБС-10, отмечая появление недифференцированной ткани и различных органогенных структур. Учитывали процент некротизированных эксплантов, способность эксплантов к каллусообразованию, побегообразованию, ризогенезу, количество адвентивных почек и побегов на 1 экспланте. Каллус оценивали по цвету, консистенции, интенсивности роста по 3-х балльной шкале. Для определения регенерационной способности экспланты помещали вместе с полученными структурами на свежую безгормональную среду, на которой культивировали при оптимальных условиях 3 недели. Отмечали степень развития адвентивных почек и побегов.

Полученные данные обработаны статистически с использованием пакета прикладного программного обеспечения «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 $p < 0,05$ [8].

Результаты исследования и их обсуждение. В течение первых 10 дней культивирования на средах, дополненных 6-БАП, выявлено увеличение размеров эксплантов и индукция каллуса на черешке листа. Спустя 20 дней на всех опытных средах наблюдали экспланты с признаками пролиферации тканей. По результатам оценки листовых эксплантов в первом пассаже следует отметить их морфогенетическую активность в отдельных вариантах опыта. Интенсивность каллусообразования, ризогенеза и побегообразования существенно варьировали, как в зависимости от гормонального состава среды, так и от ориентации листа на поверхности среды.

Индукция недифференцированной ткани определена на черешке у всех листьев, помещенных адаксильной стороной на среду без гормонов (контроль). Также каллусогенез отмечали у 100 % эксплантов, культивированных на средах с органическими добавками, независимо от их ориентации на среде (таблица 1). Формирование каллуса наблюдали на черешке и в местах повреждения листовой пластинки, с двух ее сторон. Интенсивность роста каллуса была выше на средах, дополненных 5 мг/л БАП, по сравнению с другими опытными вариантами. Плохой рост каллуса отмечали на листьях, культивированных на среде, дополненной либо 500 мг/л карбенициллина (независимо от ориентации листа на среде), либо дополненной 2 мг/л БАП – в случае помещения листа верхней стороной на среду. Во всех вариантах опыта каллусная ткань характеризовалась как плотная, неоднородная по окраске – зеленого, коричневого, кремового цвета, гранулированная, блестящая. У 5–20 % эксплантов были выявлены участки с каллусом желтого и светло-коричневого цветов. Каллусные культуры характеризовались большой гетерогенностью по морфологическим характеристикам. На одной

и той же среде можно было наблюдать несколько морфотипов каллусов по цвету и интенсивности роста. Они возникали как в пределах одного экспланта, так и у разных эксплантов. Интенсивность роста каллуса в большей степени зависела от гормонального состава среды.

Таблица 1 – Каллусогенез на листовых эксплантах в зависимости от их ориентации и состава питательной среды

Гормоны, антибиотик, мг/л	Число эксплантов с каллусом, %	Интенсивность роста	Цвет каллуса, его структура, прозрачность
поверхность соприкосновения экспланта со средой – адаксильная (верхняя)			
б/г (контроль)	100	1	зеленый, снежный, матовый
БАП, 1,0	100	2	кремовый, зеленый, крупнозернистый, матовый
БАП, 2,0	100	1	зеленый, коричневый, крупнозернистый, блестящий
БАП, 5,0	100	2, 3	зеленый, коричневый, крупнозернистый, блестящий
карбенициллин, 500	100	1	зеленый, снежный, блестящий
БАП, 2,0 + карбенициллин, 500	100	1, 2	зеленый, коричневый, снежный, матовый
БАП, 5,0 + карбенициллин, 500	100	2	зеленый, коричневый, крупнозернистый, блестящий
поверхность соприкосновения экспланта со средой – абаксильная (нижняя)			
б/г (контроль)	0	–	–
БАП, 1,0	100	2	зеленый, крупнозернистый, блестящий
БАП, 2,0	100	2	зеленый, крупнозернистый, блестящий
БАП, 5,0	100	3, 2	зеленый, коричневый, крупнозернистый, блестящий
карбенициллин, 500	100	1	зеленый, гранулированный, блестящий,
БАП, 2,0 + карбенициллин, 500	100	2	кремовый, зеленый, крупнозернистый, блестящий
БАП, 5,0 + карбенициллин, 500	100	2	желтый, коричневый, крупнозернистый, блестящий
Примечание: интенсивность роста в баллах: 1 – плохой, 2 – хороший, 3 – очень хороший			

Помимо каллусогенеза, на листьях отмечали образование двух типов органогенных структур: адвентивных почек и побегов, и адвентивных корней. Чаще всего определяли прямой ризогенез из тканей листьев, в то время как регенерацию побегов наблюдали из каллусной культуры. Аналогичные процессы выявлены другими исследователями на березе повислой [1]–[3].

Несмотря на отмеченную в первом пассаже способность листовых эксплантов березы пушистой к органогенезу, требуется их перенос на свежие среды, без гормонов. Это вызвано тем, что на средах с фитогормонами обычно медленнее осуществляются процессы дифференциации новообразований и развитие органогенных структур. Следует отметить, что каллус, сформировавшийся на опытных средах, являлся высоко органогенным, о чем свидетельствуют интенсивные процессы корнеобразования и побегообразования, имеющие место при переносе эксплантов с новообразованиями на свежую среду (таблица 2). У 100 % эксплантов корнеобразование отмечали на среде без гормонов при помещении листа адаксильной поверхностью на среду, и, независимо от ориентации листа, на средах, содержащих в своем составе карбенициллин или еще дополнительно 5 мг/л БАП. В этих вариантах число корней на экспланте варьировало от 1 до 5, при длине 0,5–11,0 см. Процент ризогенеза в остальных опытных вариантах варьировал от 17 до 84 %. На листьях насчитывали от 1 (чаще 3) до 10 корней, с длиной обычно менее 1 см. Только единичные корни достигали 3–7 см. Установлено, что интенсивное корнеобразование было индуцировано на каллусной ткани с антоциановыми вкраплениями.

Таблица 2 – Органогенез на листовых эксплантах в зависимости от их ориентации и состава питательной среды

Гормоны, антибиотик, мг/л	Число эксплантов, %		Среднее число почек на экспланте ($\bar{x} \pm Sx$), шт.	Min – max число на экспланте, шт.		Min – max длина корней, см
	с корнями	с почками		почек	корней	
поверхность соприкосновения экспланта со средой – адаксильная (верхняя)						
б/г (контроль)	100	0	–	0	1–5	0,5–9,5

Окончание таблицы 2

БАП, 1,0	72,0	100	$15,0 \pm 1,34^{**}$	3–25	1–5	0,1–4,0
БАП, 2,0	53,3	83,3	$4,2 \pm 0,72^{**}$	1–10	1–5	0,1–7,0
БАП, 5,0	72,0	100	$14,3 \pm 1,42^{**}$	1–30	1–5	0,5–5,0
карбенициллин, 500	100	0	–	0	3–5	0,5–7,0
БАП, 2,0 + карбенициллин, 500	56,7	20,0	$0,7 \pm 0,3^*$	2–5	1–3	0,5–3,0
БАП, 5,0 + карбенициллин, 500	100	23,3	$0,5 \pm 0,2^*$	1–3	1–3	0,5–7,0
поверхность соприкосновения экспланта со средой – абаксильная (нижняя)						
б/г (контроль)	0	0	–	0	0	–
БАП, 1,0	80,0	100	$21,4 \pm 2,72^{**}$	3–35	1–5	0,1–0,3
БАП, 2,0	72,2	100	$21,4 \pm 2,70^{**}$	7–35	1–5	0,1–1,0
БАП, 5,0	40,0	90,0	$22,0 \pm 2,79^{**}$	10–50	1–5	0,1–2,0
карбенициллин, 500	100	53,3	$1,8 \pm 0,3^{**}$	1–10	3–6	1,0–11,0
БАП, 2,0 + карбенициллин, 500	83,3	92,0	$4,3 \pm 0,41^{**}$	3–10	3–10	0,3–7,0
БАП, 5,0 + карбенициллин, 500	100	16,7	$0,3 \pm 0,2$	1–3	3–8	0,2–5,1
Примечание: уровень значимости при * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$						

Причины, влияющие на проявление морфогенетических реакций листовых эксплантов, многообразны, сложны, и до конца не выяснены. Вероятно, ориентация листа может оказывать воздействие на процесс поступления в ткани определенных гормонов из среды культивирования, что, в свою очередь, определяет появление тех или иных новообразований. Выявлено, что в опытных вариантах ориентация листа на поверхности среды не оказывала существенного воздействия на параметры каллусогенеза. Интенсивность процесса ризогенеза на эксплантах также зависела в большей мере от состава среды, чем от ориентации листа на ее поверхности. И в тоже время на процесс побегообразования ориентация листьев на среде культивирования оказывала существенное влияние в ряде вариантов опыта (таблица 2). При этом интенсивность побегообразования была выше на эксплантах, помещенных абаксильной стороной на среду. Возрастали показатели «число эксплантов с почками» и «среднее число почек на экспланте». Во втором пассаже наблюдали активный рост и развитие адвентивных почек и побегов, высота которых колебалась от 0,2 до 2,5 см. Практически все адвентивные почки развивались в побеги.

Полученные результаты на березе пушистой (клон 3ф1) свидетельствуют о высокой регенерационной активности изученного генотипа. Параметры побегообразования, при помещении эксплантов абаксильной стороной на среды, в состав которых включали БАП в концентрации 1,0–5,0 мг/л, составляли от 83 до 100 % эксплантов с почками, и насчитывали от 3 до 50 почек на экспланте, при среднем значении 21,4. То есть при указанном составе среды побегообразующая способность березы пушистой (клон 3ф1) была на таком же высоком уровне, как и у березы чернокорой [9].

Ранее нами было показано положительное влияние цефотаксима и карбенициллина в концентрации 300–500 мг/л на регенерационную способность 1–2-почечных сегментов у березы повислой. Отмечали выживаемость у 100 % эксплантов, которые не теряли свою регенерационную способность [10]. Как видно из таблицы 2, карбенициллин существенно подавлял регенерационную способность листовых эксплантов березы пушистой, в отличие от березы чернокорой, когда действие антибиотика оказалась аналогично действию цитокинина 6-БАП [9]. Результаты, полученные при культивировании листовых эксплантов березы пушистой на среде без гормонов, дополненной карбенициллином, свидетельствуют об органогенной активности антибиотика, при условии культивирования листьев абаксильной стороной на среде. В этом варианте насчитывали 53 % эксплантов с почками, от 3 до 6 штук.

Заключение. Таким образом, в результате выполненных исследований выявлена высокая органогенная способность листовых эксплантов клона 3ф1 березы пушистой. Определена эффективная концентрация 6-БАП (1,0–5,0 мг/л) в питательной среде, позитивно влияющая на морфогенез *in vitro* и индуцирующая высокие параметры побегообразования. Установле-

но, что добавление карбенициллина в среды, содержащие 6-БАП, существенно подавляет процесс формирования адвентивных почек. Показано, что ориентация листовой пластинки на среде может оказывать значительное влияние на число адвентивных почек и побегов на экспланте и частоту регенерации в зависимости от концентрации органических добавок (6-БАП или карбенициллина). Выявлена закономерность: большая часть адвентивных почек и побегов образуется на той стороне листовой пластинки, которая соприкасается со средой.

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

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. Valobra, C. In vitro shoot regeneration from leaf disks of *Betula pendula* «Dalecarlica» EM 85 / C. Valobra, P. Piagnani, D.J. James // Plant cell, Tissue and Organ Cult. – 1990. – Vol. 21, № 1. – P. 51–54.
3. Simola, L.K. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula* f. *purpurea* / L.K. Simola // Scientia Hortic. – 1985. – Vol. 26. – P. 77–85.
4. Perez, C. Micropropagation of *Betula celtiberica* / C. Perez, P. Postigo // Annals of Botane. – 1989. – Vol. 64. – P. 67–69.
5. Лесной фонд. Лесное хозяйство // Министерство лесного хозяйства Республики Беларусь [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа : <http://www.mlh.by/ru/forestry/resources.html> – Дата доступа : 19.03.2016.
6. 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.
7. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol.Plant. – 1962. – Vol. 15, № 13. – P. 473–497.
8. Лакин, Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
9. 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.трудов. – Гомель, 2005. – Вып. 64. – С. 219–227.
10. Концевая, И.И. Каллусообразование и органогенез на листовых эксплантах березы / И.И. Концевая, А.А. Яцына // Проблемы лесоведения и лесоводства : Сб.науч.трудов – Гомель, 2000. – Вып. 51. – С. 193–201.

Гомельский государственный
университет им. Ф. Скорины

Поступила в редакцию 23.03.2017