

МОДИФИКАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ПРИ ДЕПОНИРОВАНИИ БЕРЕЗЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* Концевая И.И.

Концевая Ирина Ильинична - кандидат биологических наук, доцент,
кафедра ботаники и физиологии растений,
Гомельский государственный университет им. Франциска Скорины, г. Гомель, Республика Беларусь

Аннотация: представленные результаты показали возможность хранения культуры разных видов березы в условиях *in vitro* в течение 12 месяцев при использовании питательных сред, дополненных абсцизовой кислотой (в том числе при включении в состав сред повышенной дозы сахарозы, активированного угля, 6-БАП).

Ключевые слова: депонирование, культура *in vitro*, береза.

В последнее десятилетие для поддержания коллекций растений чаще используют клеточные культуры [1]. На сегодняшний день развиваются такие подходы к хранению культур растений как криосохранение, депонирование коллекции при пониженных положительных температурах, изменение концентрации углеводов в среде, использование ретордантов, гипоксия и другие [2]. Наибольшее распространение получил метод криоконсервации, который активно реализуется в биотехнологических лабораториях при достаточном финансировании [3, 4]. Остальные методы депонирования растений в культуре *in vitro* применяются редко. 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), которая рассматривается как антистрессовый фактор, усиливающий адаптацию растений к различным неблагоприятным воздействиям. Установлено, что добавление в питательную среду АБК тормозит рост культуры *in vitro* [5, 6], но не влияет на жизнеспособность эксплантов.

Целью работы явилось изучение возможности депонирования в культуре *in vitro* эксплантов разных видов березы на модифицированных по составу средах, дополненных АБК.

В работе использовали микропобеги клона 3ф1 березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.), клона 31 березы повислой (*B. pendula* Roth), клона 76 карельской березы (*B. pendula* Roth var. *carelica* Merckl.), клона ч1 березы чернокорой (*B. obscura* Kotula ex Fiek). Культуры росли на модифицированной агаризованной среде WPM, без гормонов [7], при оптимальных условиях. После одного месяца культивирования в асептических условиях побеги разрезали на 1-узловые сегменты, которые помещали по 18-20 штук в сосуд на питательные среды (таблица 1) и инкубировали при оптимальных условиях роста.

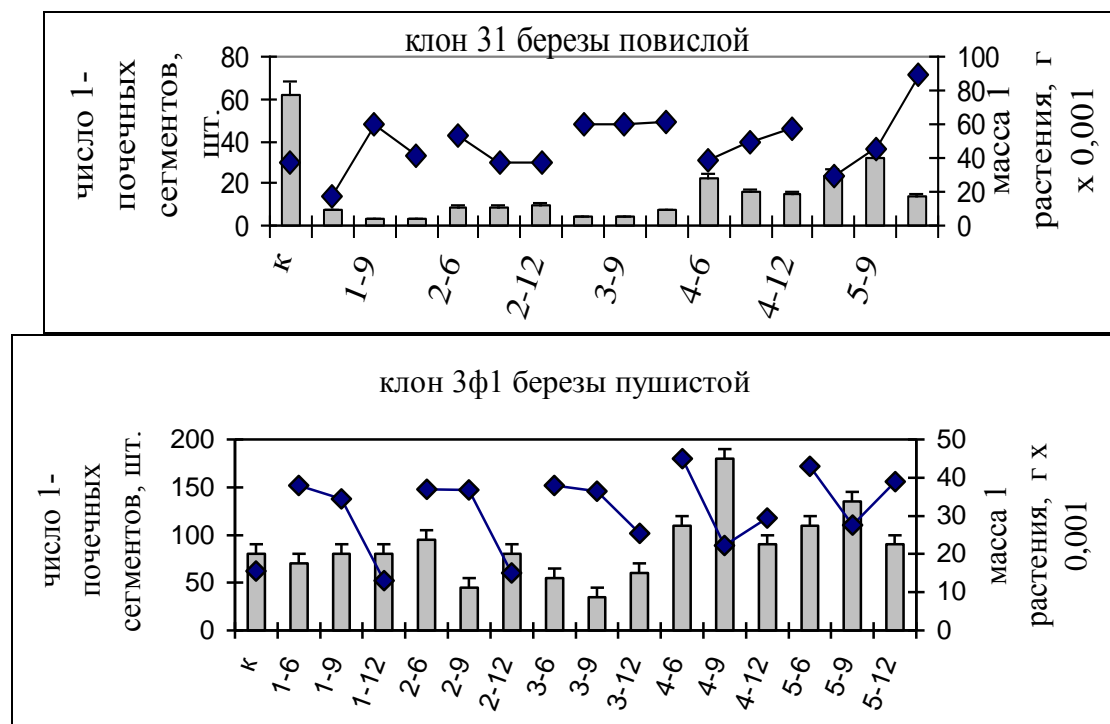
Таблица 1. Состав питательной среды

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

Каждые 3 месяца визуально оценивали материал. 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 пассивирования материала подсчитывали число эксплантов, полученных из одного сосуда. В течение одного месяца экспланты инкубировали при оптимальных условиях роста, после чего определяли сырую массу микрорастений. Контролем служили экспланты, которые росли при стандартных условиях в течение одного месяца. Обработку экспериментальных данных осуществляли по стандартным статистическим программам Microsoft Excel и «Statsoft (USA) Statistica v.7.0».

Влияние состава модифицированных питательных сред на жизнеспособность и поддержание высокой регенерационной активности культуры *in vitro* березы при депонировании оценивали по двум показателям: «число эксплантов с 1 сосуда» и «масса 1 растения». Результаты представлены на рисунке 1.

Выявлено, что генотип оказывал более существенное влияние, чем состав среды, на показатель «число эксплантов с 1 сосуда». После разных периодов хранения на всех тестируемых средах наблюдали существенное снижение данного показателя по сравнению с контролем у березы повислой, чернокорой, карельской. При этом отмечали зависимость, что с удлинением периода депонирования значение показателя «число эксплантов с 1 сосуда» уменьшается (рисунок 1). В тоже время клон 3ф1 березы пушистой проявил более высокую устойчивость при депонировании в разные сроки, независимо от состава среды. На среде 1 и 2 значение показателя колебалось в зависимости от длительности периода культивирования в большую или меньшую сторону по сравнению с контрольным вариантом. На средах 4 и 5, независимо от периодов хранения, число узловых сегментов с одного сосуда возрастало по сравнению с контролем с 80 до 90-180 штук (рисунок 1). Более низкие значения отмечали на среде 3.



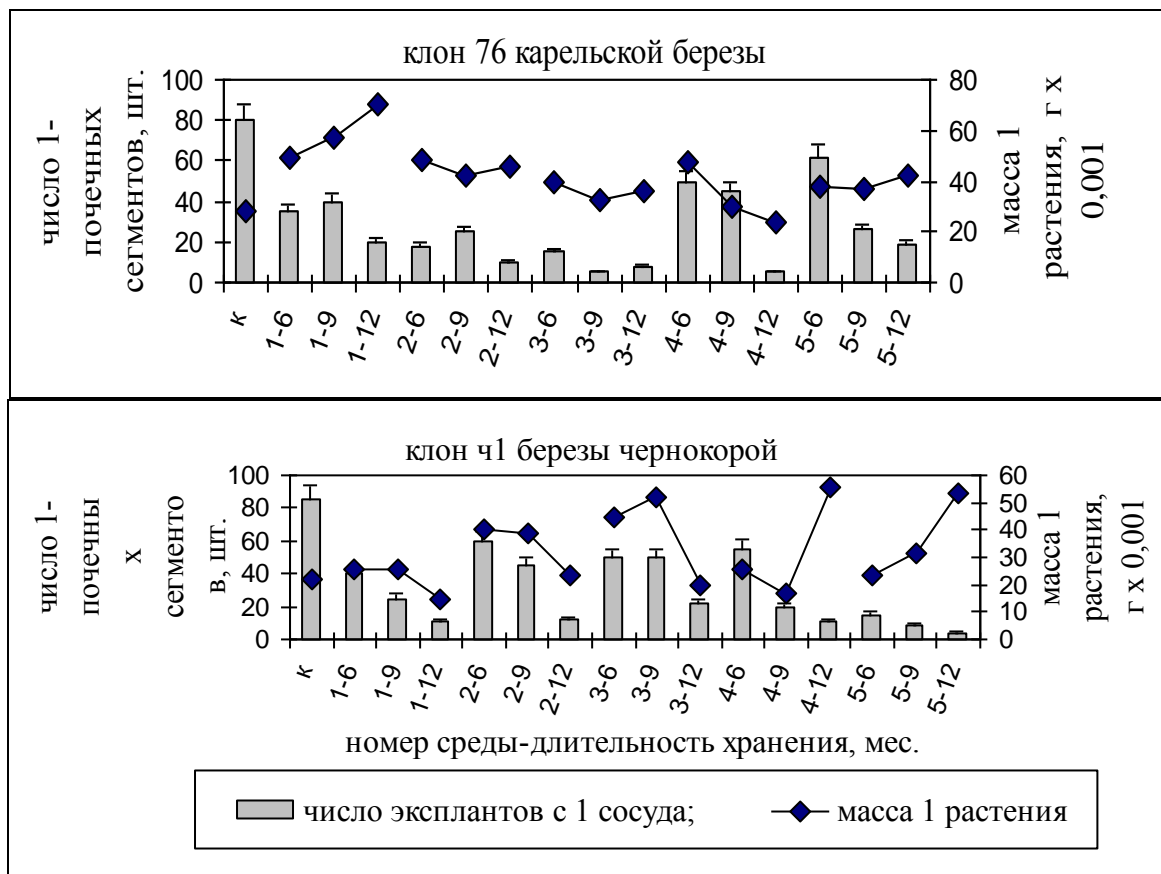


Рис. 1. Влияние состава питательной среды и длительности хранения при депонировании в культуре тканей березы

В процессе культивирования при стандартных условиях 1-узловые сегменты побегов росли и развивались, формируя полноценные растения. Установлена неоднозначная реакция генотипов по признаку «средняя масса 1 растения», в зависимости от состава среды и длительности культивирования. Существенное снижение данного показателя наблюдали в единичных вариантах у березы чернокорой и березы повислой. В основном тестируемые составы сред при разных сроках хранения стимулируют процесс регенерации и формирование хорошо развитых микрорастений.

Для клона 3ф1 березы пушистой отмечены стабильные параметры показателя либо возрастание массы растений при разных сроках хранения по сравнению с контролем. Поскольку же число эксплантов, полученных при субкультивировании после разных периодов хранения в вариантах 1, 2, 4, 5 достаточно велико (90-180), можно говорить о высокой устойчивости данного генотипа к хранению. Предполагаем, что такая реакция обусловлена тетраплоидностью березы пушистой ($2n = 4x = 56$).

Приведенные в работе результаты свидетельствуют о неоднозначном влиянии апробированных составов инкубационных сред на состояние эксплантов исследуемых видов березы при разных сроках хранения. Выявлены симптомы некроза, хлороза, усыхания, затрагивающие частично или полностью микрорастения. Сходные симптомы были отмечены исследователями на других древесных растениях в результате депонирования материала [1, 2, 6].

Апробированные в эксперименте составы питательных сред практически не влияли на развитие микрорастений березы после второго периода субкультивирования, независимо от сроков хранения. Даже если растения и характеризовались понижением темпов роста побегов по сравнению с контролем во втором пассаже, то по развитию корневой системы и накоплению фитомассы они чаще всего превосходили контрольные растения. Результаты текущего опыта согласуются с результатами исследователей на других растениях, также использующих в составе среды АБК, активированный уголь, высокие дозы 6-БАП и сахарозу [1, 5, 8-10].

Представленные результаты показали возможность хранения культуры разных видов березы в условиях *in vitro* в течение 12 месяцев при использовании питательных сред, дополненных АБК (в том числе при включении в состав сред повышенной дозы сахарозы, активированного угля, 6-БАП). Выявлены существенные различия между апробированными клонами берез по их реакции на длительное хранение. Из апробированных генотипов, клон 3ф1 березы пушистой – наиболее устойчив к длительному беспересадочному культивированию, независимо от состава среды культивирования и сроков хранения.

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

Список литературы

1. Молканова О.И., Коротков О.И., Ветчинкина Е.М., Мамаева Н.А., Васильева О.Г. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования // Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о Земле, 2010. Вып. 3. С. 33-39.
2. Towill L.E. Biotechnology and germplasm preservation // Plant Breed. Rev., 1989. № 7. P. 159-182.
3. Reed B.M. Cryopreservation of in vitro tissue of deciduous forest trees // Plant Cryopreservation: A Practical Guide. / B. M. Reed (ed). New York: Springer, 2007. Section II. 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. Jarret R.L., Gawel N. Abscisic acid-induced growth inhibition of sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) in vitro // Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2004. Vol. 24. № 1. P. 13-18.
6. Сидорович Е.А., Кутас Е.Н. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений. Минск: Навука і тэхніка, 1996. 249 с.
7. Lloyd G., McCown B. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture // Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 1980. № 30. P. 421-427.
8. Четверикова Е.П. Роль абсцизовой кислоты в морозоустойчивости растений и криоконсервации культур in vitro // Физиология растений, 1999. Т. 46. № 5. С. 823-929.
9. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры // Цитология и генетика, 2005. № 1. С. 41-51.
10. 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. 29 с.