

УДК 577.175.1:581.45:582.632.1:57.085

**ВЛИЯНИЕ ТИДИАЗУРОНА НА МОРФОГЕНЕЗ ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТОВ
BETULA PUBESCENS EHRH. В КУЛЬТУРЕ IN VITRO**

**INFLUENCE OF THIDIAZURON ON MORPHOGENESIS OF LEAF
EXPLANTS OF *BETULA PUBESCENS* EHRH. IN CULTURE IN VITRO**

©**Концевая И. И.**

канд. биол. наук

Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины
г. Гомель, Беларусь, ikantsavaya@mail.ru

©**Kontsevaya I.**

Ph.D., Skorina Gomel State University
Gomel, Belarus, ikantsavaya@mail.ru

©**Жадько С. В.**

Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины
г. Гомель, Беларусь, zhadkosv@mail.ru

©**Zhadko S.**

Skorina Gomel State University
Gomel, Belarus, zhadkosv@mail.ru

Аннотация. В работе исследуется зависимость морфогенной и регенерационной активности листовых эксплантов *Betula pubescens* от способа их ориентации на питательной среде и от наличия тидиазурона в среде.

Методы исследования: культура клеток in vitro, статистический анализ.

Полученные результаты на березе пушистой (клон 3ф1) свидетельствуют о высокой регенерационной активности изученного генотипа. Отмечена высокая побегообразующая способность тидиазурона в концентрации 0,1–0,5 мг/л. Показано, что ориентация листовой пластинки на среде может оказывать значительное влияние на число адвентивных почек и побегов на листе, и частоту регенерации в зависимости от концентрации тидиазурона.

Корнеобразование отмечали у 100% эксплантов, культивированных на среде без гормонов, при помещении листа адаксильной поверхностью на среду. Процент ризогенеза на листовых эксплантах, культивированных на средах, содержащих тидиазурон, варьировал от 17 до 57. На листьях насчитывали от 1 до 7 корней разной длины. Дифференциация адвентивных почек и побегов из каллусной ткани, образовавшейся по всей поверхности экспланта, и развитие индуцированных в первом пассаже адвентивных почек происходило у 76,7–100% эксплантов почти во всех опытных вариантах. Выявлена тенденция: большая часть адвентивных почек и побегов образуется на той стороне листовой пластинки, которая соприкасается со средой. Число адвентивных почек и побегов на экспланте колебалось от 1 до 50, в зависимости от концентрации тидиазурона в первом пассаже.

Abstract. In the work, the dependence of the morphogenic and regenerative activity of leaf explants of *Betula pubescens* on their way of orientation on the nutrient medium and on the presence of thidiazuron in the medium is studied.

Methods: cell culture in vitro; statistical analysis.

The results obtained on the *Betula pubescens* (clone 3f1) indicate a high regenerative activity of the studied genotype. High growth-producing ability of thidiazuron in a concentration of 0,1–0,5 mg/l was noticed. It is shown that the orientation of the leaf blade on the medium can have a significant effect on the number of adventitious buds and shoots on the leaf and the frequency of regeneration, depending on the concentration of thidiazuron.

Root formation was noticed in the 100% of explants cultured on a medium without hormones, when the leaf was adaxially placed on the medium. The percentage of rhizogenesis on leaf explants cultivated on media containing thidiazuron ranged from 17 to 57. There were from 1 to 7 roots of different length on the leaves. Differentiation of adventitious buds and shoots from callus tissue formed over the entire surface of the explant, and the development of adventitious kidneys induced in the first passage occurred in 76,7–100 % of explants in almost all experimental variants. A tendency has been revealed: most of the adventitious buds and shoots are formed on the side of the leaf blade that contacts the medium. The number of adventitious buds and shoots on the explants ranged from 1 to 50, depending on the concentration of thidiazuron in the first passage.

Ключевые слова: морфогенез in vitro, регенерационная активность, культура in vitro, листовые экспланты, тидиазурон, береза пушистая.

Keywords: morphogenesis in vitro, regenerative activity, culture in vitro, leaf explants, thidiazuron, *Betula pubescens*.

Культура in vitro различных видов рода *Betula* L. вызывает у исследователей большой интерес и находит значительное практическое применение, поскольку позволяет размножить элитные и уникальные деревья, отбирать ценные мутантные формы, сохранять гибридные генотипы. Без совершенствования данного метода нельзя представить развитие генетической инженерии. В результате различных манипуляций создают трансгенные растения, которые могут обладать важными и полезными признаками. Чаще всего в протоколе трансформации в качестве эксплантов используют листья. Морфогенетические процессы в культуре листьев изучены у различных видов растений. Они зависят, в частности, от таких факторов, как генотип источника экспериментального материала, возраст листьев, способ их нарезания, ориентация листа на среде, солевой состав питательной среды, количественный и качественный состав экзогенных регуляторов роста растений.

В последние десятилетия в работах по агробактериальной трансформации березы повислой стали использовать в качестве цитокинина тидиазурон (1-фенол-3-(1,2,3-тиадиазол-5-YL) UREA) (TDZ, дропп) [1]. Тидиазурон нельзя безоговорочно относить к цитокининам. Это производное фенилмочевины было синтезировано в качестве дефолианта хлопчатника. Более 20 лет назад было высказано предположение о цитокининовой природе тидиазурана и возможности получения в результате его использования позитивных результатов в культуре тканей древесных лесных пород [2].

Несмотря на интенсивные исследования по получению трансгенных растений рода *Betula* L., данные о морфогенетической активности листовых эксплантов немногочисленны [3–6]. А для *B. pubescens* они единичны, хотя как тетраплоидный вид, он должен вызывать особое внимание у биотехнологов ввиду высокой пролиферирующей активности культуры тканей [7]. Являясь во многих странах 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 [8].

На сегодняшний день исследования по оптимизации регенерационной способности для разных видов берез остаются актуальными. Поэтому целью наших исследований явилось

изучение зависимости морфогенной и регенерационной активности листовых эксплантов *B. pubescens* от способа их ориентации на питательной среде и от наличия тидиазурона в среде.

Методика исследований

Объектом исследования явился клон 3ф1 березы пушистой (*B. pubescens* Ehrh.). Тестирование тидиазурона выполняли в асептических условиях с использованием общепринятых методов работы с культурой клеток, тканей и органов растений [9]. В качестве эксплантов использовали поврежденные скальпелем листья, вычлененные у 1-месячных микроклональных растений. Затем листья помещали на агаризованную среду: либо абаксильной либо адаксильной стороной. В качестве контроля и основы питательной среды применяли смесь солей для древесных WPM [10]. Испытывали концентрации тидиазурона (мг/л): 0,1, и 0,5.

Листовые экспланты культивировали в оптимальных условиях. Каждые 10 дней материал просматривали под микроскопом МБС-10, отмечая появление недифференцированной ткани и различных органогенных структур. Учитывали способность эксплантов к каллусообразованию, органогенезу, 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 переносили 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 Microsoft Excel и “Statistica v.7.0”.

Результаты исследований

В первом пассаже следует отметить морфогенетическую активность листовых эксплантов в вариантах опыта. Образование недифференцированной ткани выявлено на черешке всех листьев, помещенных адаксильной стороной на среду без гормонов (контроль). Каллусогенез также отмечали у 100% эксплантов, культивированных на средах с тидиазуроном, независимо от их ориентации на среде.

Формирование каллуса наблюдали на черешке и в местах повреждения листовой пластинки, с двух ее сторон. Во всех вариантах опыта каллусная ткань характеризовалась как плотная, неоднородная по окраске – зеленого, коричневого цвета, гранулированная, блестящая. 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 была очень хорошей, и несколько выше при помещении листьев абаксильной стороной на среду.

Следует отметить, что каллус, сформировавшийся на средах с добавлением тидиазурона, являлся высоко органогенным, о чем свидетельствуют интенсивные процессы корнеобразования и побегообразования, имеющие место при переносе эксплантов с новообразованиями на свежую среду без гормонов (Таблица). Чаще всего формирование корней установлено напрямую из тканей листьев, в то время как регенерацию побегов наблюдали из каллуса. Аналогичные процессы выявлены другими исследователями на березе повислой [5–6].

У 100% эксплантов корнеобразование отмечали на среде без гормонов при помещении листа адаксильной поверхностью на среду. Процент ризогенеза в остальных опытных вариантах варьировал от 17 до 57. На листьях насчитывали от 1 до 7 корней, с длиной менее 1 см. Единичные корни достигали 3–7 см.

Дифференциация адвентивных почек и побегов из каллусной ткани, образовавшейся по всей поверхности экспланта, и развитие индуцированных в первом пассаже адвентивных

почек происходило у 76,7–100% эксплантов почти во всех опытных вариантах. Выявлена тенденция: большая часть адвентивных почек и побегов образуется на той стороне листовой пластинки, которая соприкасается со средой. Число адвентивных почек и побегов на экспланте колебалось от 1 до 50, в зависимости от концентрации тидиазурона в первом пассаже.

Таблица.

ОРГАНОГЕНЕЗ НА ЛИСТОВЫХ ЭКСПЛАНТАХ В ЗАВИСИМОСТИ
 ОТ ИХ ОРИЕНТАЦИИ И СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Тидиазурон, мг/л	Число эксплантов, %		Среднее число почек на экспланте ($x \pm Sx$), шт.	Min-max число на экспланте, шт.		Min-max длина корней, см
	с корнями	с почками		почек	корней	
поверхность соприкосновения экспланта со средой – адаксильная						
б/г (контроль)	100	0	–	0	1–5	0,5–9,5
0,1	33,3	76,7	11,8 ± 2,44*	1–40	3–6	0,5–3,0
0,5	56,7	100	19,8 ± 1,94*	5–40	1–7	0,2–3,0
поверхность соприкосновения экспланта со средой – абаксильная						
б/г (контроль)	0	0	–	0	0	–
0,1	50,0	98,0	20,8 ± 2,23*	5–50	3–7	0,1–0,3
0,5	16,7	90,0	5,8 ± 0,72*	3–15	3–5	0,1–0,5

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

Влияние ориентации листа на среде и его целостности на морфогенетический потенциал показано на многих древесных культурах [11]. В текущем эксперименте выявлено, что в опытных вариантах ориентация листа на поверхности среды не оказывала существенного воздействия на параметры каллусогенеза и ризогенеза в отличие от побегообразования (Таблица).

Регенерация адвентивных почек на листьях *B. pendula* получена другими исследователями на средах Мурасига и Скуга или WPM только в присутствии зеатина в качестве цитокинина и ИУК в качестве ауксина [5–6]. На этом же виде березы нами ранее показано, что побегообразование эффективно осуществляется на средах, содержащих в качестве цитокининов БАП или 2ip [3–4]. При концентрации БАП, равной 1–5 мг/л, доля эксплантов с почками превышает 60 % и число почек на экспланте составляет 10–20 штук.

Заключение

Полученные в эксперименте результаты на березе пушистой (клон 3ф1) свидетельствуют о высокой регенерационной активности изученного генотипа. Отмечена высокая побегообразующая способность тидиазурона в концентрации 0,1–0,5 мг/л. Показано, что ориентация листовой пластинки на среде может оказывать значительное влияние на число адвентивных почек и побегов на листе, и частоту регенерации в зависимости от концентрации тидиазурона.

Список литературы:

1. Lontander K., Pasonen H.-L., Aalto M. K., Palva T., Pappinen A., Rikkinen J. Phylogeny of chitinases and its implications for estimating horizontal gene transfer from chitinase-transgenic silver birch (*Betula pendula*) // Environ. Biosafety Res. 2008. V. 20. P. 227-239.
2. Huetteman C. A., Preece J. E. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture // Plant cell Tissue Organ. 1993. V. 33. P. 105-119.
3. Концевая И. И., Яцына А. А. Каллусообразование и органогенез на листовых эксплантах березы // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. / под ред. В. А. Ипатьева. Гомель: Изд-во Института леса НАН Беларуси, 2000. Вып. 51. С. 193-201.

4. Яцына А. А., Концевая И. И. Регенерация побегов на листьях березы // Селекция, генетические ресурсы и сохранение генофонда лесных древесных растений: сб. науч. тр. / под ред. В. А. Ипатьева. Гомель: Изд-во Института леса НАН Беларуси, 2003. Вып. 59. С. 258-262.
5. Srivastava P. S., Steinhauer A., Glock H. Plantlet differentiation in leaf and root cultures of birch (*Betula pendula* Roth.) // *Plant Sci.* 1985. V. 42. P. 209-214.
6. Valobra C., Piagnani P., James D. J. In vitro shoot regeneration from leaf disks of *Betula pendula* "Dalecarlica" EM 85 // *Plant cell, Tissue and Organ Cult.* 1990. V. 21. №1. P. 51-54.
7. Perez C., Postigo P. Micropropagation of *Betula celtiberica* // *Annals of Botane.* 1989. V. 64. P. 67-69.
8. Данченко А. М. Популяционная изменчивость березы. Новосибирск: Наука, 1990. 205 с.
9. Калашникова Е. А., Кочиева Е. З., Миронова О. Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. М.: КолосС, 2006. 227 с.
10. 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.
11. Wojuechowicz M. R., Mol R. Formation of adventitious buds on the leaves of *Aesculus hippocastanum* L. cultured in vitro // *Plant cell, Tissue and Organ Cult.* 1994. V. 37. №3. P. 256-269.

References:

1. Lontander, K., Pasonen, H.-L., Aalto, M. K., Palva, T., Pappinen, A., & Rikkinen, J. (2008). Phylogeny of chitinases and its implications for estimating horizontal gene transfer from chitinase-transgenic silver birch (*Betula pendula*). *Environ. Biosafety Res.*, 20, 227-239
2. Huetteman, C. A., & Preece, J. E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant cell Tissue Organ*, 33, 105-119
3. Kontsevaya, I. I., & Yatsyna, A. A. (2000). Kallusoobrazovanie i organogenez na listovykh eksplantakh berezy. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: Sb. nauch. trudov. Gomel*, 51, 193-201
4. Yatsyna, A. A., & Kontsevaya, I. I. (2003). Regeneratsiya pobegov na listiyakh berezy. *Selektsiya, geneticheskie resursy i sokhranenie genofonda lesnykh drevesnykh rastenii: Sb. nauch. trudov. Gomel*, 59, 258-262
5. Srivastava, P. S., Steinhauer, A., & Glock, H. (1985). Plantlet differentiation in leaf and root cultures of birch (*Betula pendula* Roth.). *Plant Sci.*, 42, 209-214
6. Valobra, C., Piagnani, P., & James, D. J. (1990). In vitro shoot regeneration from leaf disks of *Betula pendula* "Dalecarlica" EM 85. *Plant cell, Tissue and Organ Cult.*, 21, (1), 51-54
7. Perez, C., & Postigo, P. (1989). Micropropagation of *Betula celtiberica*. *Annals of Botane*, 64, 67-69
8. Danchenko, A. M. (1990). Populyatsionnaya izmenchivost berezy. *Novosibirsk, Nauka*, 205
9. Kalashnikova, E. A., Kochieva, E. Z., & Mironova, O. Yu. (2006). Praktikum po selskokhozyaistvennoi biotekhnologii. *Moscow, KolosS*, 227
10. Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture. *Proc. Intl. Plant Prop. Soc.*, (30), 421-427
11. Wojuechowicz, M. R., & Mol, R. (1994). Formation of adventitious buds on the leaves of *Aesculus hippocastanum* L. cultured in vitro. *Plant cell, Tissue and Organ Cult.*, 37, (3), 256-269

Работа поступила
в редакцию 06.06.2017 г.

Принята к публикации
09.06.2017 г.

Ссылка для цитирования:

Концевая И. И., Жадько С. В. Влияние тидиазулона на морфогенез листовых эксплантов *Betula pubescens* Ehrh. в культуре in vitro // Бюллетень науки и практики. Электрон. журн. 2017. №7 (20). С. 22-27. Режим доступа: <http://www.bulletennauki.com/kontsevaya> (дата обращения 15.07.2017).

Cite as (APA):

Kontsevaya, I., & Zhadko, S. (2017). Influence of thidiazuron on morphogenesis of leaf explants of *Betula pubescens* Ehrh. in culture in vitro. *Bulletin of Science and Practice*, (7), 22-27