

ОСОБЕННОСТИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ *POPULUS × BEROLINENSIS*

В.В. Павличенко, М.В. Протопопова, В.К. Войников

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, vpavlichenko@gmail.com, marina.v.protopopova@gmail.com, vvk@sifibr.irk.ru

Аннотация. В работе представлены некоторые особенности микроклонального размножения тополя берлинского (*Populus ×berolinensis*). Приведен способ введения в стерильную культуру, описан состав питательной среды для культивирования в условиях *in vitro*, а также определены типы эксплантов и составы питательных сред для эффективного микроклонального размножения тополя берлинского.

Ключевые слова: микроклональное размножение растений, тополь берлинский, регуляторы роста, питательные среды, органогенез

DOI: 10.31255/978-5-94797-319-8-1330-1333

Микроклональное размножение является одним из подходов по изучению особенностей ответа растительного организма на факторы окружающей среды, а также позволяет быстро и эффективно увеличивать количество экспериментально материала [Jain, Haggman, 2007]. Размноженные в условиях *in vitro* растения позволяют более быстро и эффективно проводить эксперименты по оценке влияния негативных стрессовых воздействий по сравнению с натурными экспериментами, требующими как больших площадей, так и времени, затрачиваемого на выращивание растений в грунте. Кроме того, микроклональное размножение растений позволяет проводить эксперименты круглогодично, что особенно важно в климатических условиях Восточной Сибири, где вегетационный период длится от 30 дней на севере до 140 дней на юге.

Каждый вид растений имеет свои особенности микроклонального размножения. Для эффективного микроклонального размножения важен подбор оптимального состава питательных сред, концентраций фитогормонов и типа растительного экспланта, используемого для получения регенерантов. Известно, что образование регенерантов из различных типов эксплантов проходит с разной эффективностью. Подбор же оптимальных концентраций фитогормонов позволяет повышать эффективность микроклонального размножения, а также получать максимальное количество регенерантов из всех типов эксплантов.

Целью исследования было выявление особенностей микроклонального размножения тополя берлинского (*Populus ×berolinensis* Dippel).

В качестве объекта исследования был выбран тополь берлинский (*Populus ×berolinensis*). Представителей рода *Populus* часто используют в качестве модельных объектов для изучения процессов роста и развития древесных растений в виду их высокой способностью к регенерации.

В качестве субстрата для регенерации и культивирования растений тополя *in vitro* агаризованную (7 г/л) питательную среду на основе 1/2 MS 5524 [Murashige, Skoog, 1962] производства Sigma-Aldrich с добавлением хелата железа и микроэлементов до полной нормы от среды MS, тиамин (1 мг/л), пиридоксин (0,5 мг/л), никотиновой кислоты (0,5 мг/л), аденин сульфата (40 мг/л) и мезоинозита (50 мг/л), сахарозы (2%) и агара (7 г/л). Кислотность среды доводили до значения pH 5,7. В качестве регуляторов роста использовали кинетин (КИН), бензиладенин (БА), тидиазурон (ТДЗ) и индолилмасляную кислоту (ИМК) в различных концентрациях.

Для введения в стерильную культуру использовали молодые отрезки стеблей с пазушной почкой, срезанные с растений тополя берлинского на территории СИФИБР СО РАН. Свежесрезанные участки стебля стерилизовали в 2 этапа. Сначала погружали на 20 секунд в 70% спирт, а затем переносили в 10% раствор белизны с добавлением Tween-20, в котором промывали в течение 1 минуты. После завершения стерилизации экспланты несколько раз отмывали в стерильной воде и перемещали на твердую питательную среду, содержащую помимо основных элементов, перечисленных выше, 0,5 мг/л КИН. Побеги, проросшие из пазушных почек в течение первых 10 дней экспозиции, срезали и переносили на питательную среду для укоренения, содержащую ИМК в финальной концентрации 0,15 мг/л. Появление первых корней отмечали уже через 5 суток экспонирования. Для сохранения растений в стерильной культуре применяли метод последовательной пересадки срезанных верхних частей растения (3-4 листа) на питательную среду для укоренения через каждые 25-30 дней.

Для изучения особенностей прямого органогенеза, а также поиска оптимального состава питательной среды для эффективного микроклонально размножения проводили серию экспериментов. Готовили ряд отличающихся по составу ауксинов и цитокининов питательных сред (таблица). На поверхность твердой питательной среды помещали по 5 отрезков каждого типа эксплантов, взятых от одного растения: черешки листьев, отрезки стеблей без пазушных почек, кусочки листьев с раневой паренхимой и отрезки корней. Сосуды с эксплантами экспонировали в световой комнате, в условиях фотопериода 16/8 ч (день/ночь) при 24 °С в течение 20 суток. Через 20 суток все регенеранты, образовавшиеся на эксплантах, переносили на питательную среду для удлинения стеблей, содержащую кроме базовых компонентов КИН в концентрации 0,1 мг/л. Полученные через 20 дней регенеранты срезали и укореняли на питательной среде, содержащей 0,15 мг/л ИМК.

Результаты исследования показали, что наибольшее количество регенерантов из одного растения тополя берлинского можно получить на среде с добавлением БА и ИМК (0,1 мг/л) (таблица). Наибольшую эффективность при этом показали отрезки стеблей и корней. Питательная среда с добавлением КИН и ИМК оказалась наименее эффективна для микроклонального размножения тополя берлинского среди изученных комбинаций цитокининов и ауксина. На среде с добавлением ТДЗ и ИМК помимо регенерантов также отмечали образование органогенного каллуса из всех четырех типов эксплантов.

В нашей предыдущей работе [Павличенко и др., 2016] была произведена сравнительная оценка эффективности образования регенератов на питательных средах с добавлением только цитокининов в различных концентрациях. В качестве цитокининов использовали КИН, БА и ТДЗ производства Sigma-Aldrich с финальными концентрациями 0,1 мг/л, 0,25 мг/л, 0,5 мг/л и 1 мг/л. Использованные виды цитокининов приводили к образованию регенерантов у тополя берлинского с различной эффективностью. Так, при использовании БА в питательной среде получали регенеранты из всех типов эксплантов. Наибольшее количество регенерантов образовывалось при добавлении КИН. Добавление ТДЗ оказалось малоэффективным и может использоваться для микроклонального размножения тополя берлинского только из черешков листьев. Следует отметить, что на питательной среде, содержащей только КИН [Павличенко и др., 2016] удалось получить в 2 раза больше регенерантов из отрезков стеблей, чем при использовании той же среды с добавлением ИМК. Данный факт может быть объяснен тем, что соотношение внутриклеточной ИМК и экзогенного КИН является достаточным для эффективного органогенеза.

Питательная среда с БА (0,5 мг/л) в сочетании с ИМК (0,1 мг/л) позволила получить большее количество регенерантов, по сравнению со средой, содержащей

только БА [Павличенко и др., 2016]. Питательные среда с добавлением ТДЗ как в сочетании с ИМК, так и без добавления ауксинов [Павличенко и др., 2016] могут использоваться для получения органогенного каллуса, но не для эффективного микроклонального размножения тополя берлинского.

Таблица.

Количество регенерантов, полученных из разных типов эксплантов

Цитокинин, 0,5 мг/л	ИМК, мг/л	Тип растительного экспланта			
		Лист	Черешки листьев	Отрезки стеблей	Отрезки корней
КИН	0,5	-	-	-	7
	0,25	-	-	10	8
	0,1	-	-	1	16
	0,05	-	-	7	22
БА	0,5	1	5	15	15
	0,25	13	15	6	19
	0,1	16	14	20	18
	0,05	5	5	15	13
ТДЗ	0,5	8	-	7	5
	0,25	7	6	10	8
	0,1	7	14	18	6
	0,05	8	-	-	-

Полученные результаты показывают, что более простые по составу питательные среды могут использоваться для эффективного микроклонального размножения тополя берлинского, а применение БА позволяет получать регенеранты из всех типов эксплантов.

Результаты исследования показали, что наибольшее количество регенерантов тополя берлинского можно получить на среде с БА и ИМК (таблица). Наибольшую эффективность при этом показали отрезки стеблей и корней. Питательная среда с КИН и ИМК оказалась наименее эффективной. На среде с ТДЗ и ИМК помимо регенерантов отмечали образование каллуса из всех типов эксплантов. Таким образом, питательная среда с ТДЗ (0,5 мг/л) и ИМК (все концентрации) может быть использована для получения органогенного каллуса тополя берлинского.

Авторы благодарят ЦКП «Биоаналитика» СИФИБР СО РАН за предоставленный доступ к аналитическому оборудованию.

Литература

Павличенко В.В., Протопопова М.В., Золотовская Е.Д., Байрамова Э.М., Коновалов А.Д., Войников В.К. Изучение влияния различных цитокининов на эффективность образования регенерантов при микроклональном размножении тополя берлинского (*Populus ×berolinensis* Dipp.) // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2016. – Т. 6, № 4. – С. 164–168.

Jain S.M., Haggman H. Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Dordrecht, Springer, 2007. – 559 p.

Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia Plantarum. – 1962. – V. 15. – P. 473–497.

THE PECULIARITIES OF *POPULUS* × *BEROLINENSIS* MICROPROPAGATION

V.V. Pavlichenko, M.V. Protopopova, V.K. Voinikov

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, vpavlichenko@gmail.com, marina.v.protopopova@gmail.com, vvk@sifibr.irk.ru

Abstract. The study presents some peculiarities of Berlin poplar (*Populus* × *berolinensis*) micropropagation. A method for introducing into a sterile culture, the composition of the culture medium for *in vitro* culture, and the explant types and nutrient media compositions for the effective micropropagation of the Berlin poplar are described.

Keywords: *plants micropropagation, Berlin poplar, grow regulators, nutrient medium, organogenesis*