

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF AGRICULTURAL SCIENCES

ISSN 2224-526X

Volume 6, Number 24 (2014), 70 – 73

SPECIAL FEATURES OF THE MULTIPLICATION OF BIRCH IN THE CULTURE IN VITRO

E. A. Shadenova, M. T. Sembekov, A. Mamirova, M. Burchaeva

Institute of General genetics and cytology, Almaty, Kazakhstan

Key words: Birch, micropropagation.

Abstract. In the article the basic stages of the clonal micro-multiplication of the birches of such are considered as: *Betula pendula* var. *Carelica.*, *Betula pendula*, *Betula daurica*, *Betula turcestanica*, *Betula papyrifera*, *Betula pubescens* characterizing by the high forestry, decorative, and also practical value.

УДК 575.17

ОСОБЕННОСТИ РАЗМНОЖЕНИЯ БЕРЕЗЫ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

Е. А. Шаденова, М. Т. Сембеков, А. Мамирова, М. Бурчаева

РГП "Институт общей генетики и цитологии" КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: береза, микроклональное размножение.

Аннотация. В статье рассматриваются основные этапы клонального микроразмножения берез, таких как: *Betula pendula* var. *Carelica.*, *Betula pendula*, *Betula daurica*, *Betula turcestanica*, *Betula papyrifera*, *Betula pubescens*, характеризующиеся высокой лесохозяйственной, декоративной, а также практической ценностью.

Введение. Изучение древесных пород в культуре тканей *in vitro* в настоящее время объединяет как фундаментальные, так и прикладные исследования в этой области. Наиболее приоритетным является исследование биологии развития культивируемой ткани древесных пород в культуре *in vitro*, а также особенности протекания процесса морфогенеза при гормональной и негормональной регуляции.

Одним из перспективных в мировой практике является метод асептических культур на искусственных питательных средах, получивший название клонального микроразмножения, успешно используемый в селекционной практике древесных и плодово-ягодных растений [1-8]. Размножение с помощью данного метода позволяет реализовать максимум генетического эффекта, получаемого в селекционных программах, и сократить время получения улучшенного посадочного материала в 2-3 раза.

Использование методов культуры тканей в селекции лесных древесных растений пока ограничено, так как для основных лесообразующих пород многие вопросы, связанные с индуцированием морфо- и эмбриогенеза, образованием жизнеспособных регенерантов, требуют дополнительного изучения. Тем не менее, для многих лесных древесных пород уже разработаны способы клонального микроразмножения, а полученные растения используются для создания плантаций [9-11].

Результаты исследований с березой, продуктивными триплоидными формами тополя белого и сереющего показали, что метод микроклонального размножения является эффективным не только для массового тиражирования ценных генотипов, но и для проявления в более раннем возрасте хозяйственно-ценных признаков – ускоренного прохождения отдельных этапов онтогенеза [6, 9, 15].

Материалы и методы исследования

Материалом служили побеги (со спящими почками) взрослых деревьев (20-30 летние) *Betula pendula* var. *Carelica.*, *Betula pendula*, *Betula daurica*, *Betula turcestanica*, *Betula papyrifera*, *Betula pubescens*, за исходную ткань для получения растений-регенеранта изолировали апикальные меристемы, размером 0,5-0,8 мм. Также в качестве эксплантов использовали зеленые побеги взрослых деревьев, и сегментированные части побегов, полученных путем проращивания семян в чашках-петри.

По данным Байбурина с соавторами [4], молодые, не одревесневшие побеги карельской березы хорошо освобождаются от инфекции, если их сначала поместить на 1 мин в 70% этанол, а затем на 3 мин в диацид. Для листьев березы повислой *Simola* использовали стерилизацию 70% этанолом в течение 1 мин и 3% гипохлоритом натрия 2 мин [15].

Разнообразие используемых антисептиков определило необходимость дополнительной отработки способа стерилизации растительного материала вводимого в культуру тканей. Мы провели многократное введение эксплантов берез, используя различные дезинфицирующие растворы, выбирая наиболее эффективный.

Исследованные питательные среды отличались концентрацией регуляторов роста, макроэлементов, углеводов. Превышение или понижение оптимальных концентраций этих элементов влечет за собой обратное действие, затормаживая процесс мультпликации и роста побегов, повышение процента угнетенных растений с последующей их гибелью.

Варианты опытов: 1) MS 2,2 мг/л 2,4 Д, +1,1 мг/л БАП; 2) WPM 1 мг/л БАП + 1,1 мг/л кинетин; 3) ? WPM ИМК 0,01 мг/л; 4) ? WPM ИМК 0,01 мг/л; 5) 1/2 WPM 0,01 мг/л БАП; 6) MS 0,5 мг/л БАП; 7) MS 0,2 мг/л 2,4 Д; 8) ? WPM 0,05 мг/л 2,4 Д + 2 мг/л БАП; 9) ? MS 0,05 мг/л 2,4 Д; 10) ? MS 2 мг/л БАП; 11) ? MS 1 мг/л БАП + 3 мг/л ИУК; 12) WPM б/г.

Ежедневно побеги пассировали на свежие среды из-за выделения растениями фенольных веществ. Через 2-3 недели выжившие микропобеги пересаживали на агаризованные среды MS для размножения.

Результаты исследования

После апробации всех дезинфицирующих растворов и подбора питательных сред установили, что наиболее эффективным для получения асептической культуры в качестве стерилизующего агента выбрали 1% раствор "Белизны" (1:1) – 15 минут, с последующим промыванием в трёх порциях стерильной дистиллированной воды, в асептических условиях междоузлия побегов разрезали на сегменты 1-1,2 см и переносили на питательную среду в стерильные контейнера для культивирования. Стерилизация тканей, вводимых в культуру, обеспечивает оздоровление растительного материала.

Наиболее подходящим способом культивирования было использование апикальных меристем на питательной среде с содержанием фитогормонов: 1/2 WPM + ВАР в концентрации 0,01 мг/л. Инкубирование проводили в светокультуральной комнате на стеллажах при 16-часовом фотопериоде, 3-4 клк освещенности и температурный режим выдерживают 21-23 °С.

Через 4 недели образуется морфогенный каллус с почками, на которых впоследствии образуется множество побегов. Для массового образования побегов каллус необходимо пересаживать на свежую исходную питательную среду.

Образовавшиеся побеги пересаживают на безгормональную среду WPM, где происходит ризогенез (образование корней происходит в течение 1-1,5 месяца). Последним и одним из важных этапов получения сеянцев методом микроклонального размножения является перевод растений-регенерантов (клонов) в нестерильные условия.

Каждое растений в природе, в комнате, офисе для своего существования требует определенных условий. Главнейшими из этих условия являются влага, элементы питания, воздух, свет тепло. Поскольку полученные в стерильных условиях растения-регенеранты испытывают значительный стресс, попадая в нестерильные условия среды.

Для этого растения с корешками длиной 1,5-2 см осторожно пинцетом извлекают из агаровой среды и высаживают в почвенный субстрат, покрывают агроспанвондом (нетканый материал) или полиэтиленовой пленкой для поддержания высокой влажности, необходимой для сохранения тургора.

В зависимости от приживаемости клонов через 1-2 недели убирают покрытие и переводят на дневное освещение лаборатории. Высадку в открытый грунт проводят весной. При выращивании в лабораторных условиях за 6 месяцев рост клонов в высоту составляет 1-1,5 метр.

Обсуждение результатов

Анализ литературных данных показывает, что разработка способа размножения для каждого конкретного объекта требует проведения дальнейших экспериментов и сложных манипуляций с исследуемым материалом, поскольку технология и тип размножения могут быть специфичными не только для отдельных видов, но и для отдельных генотипов лесных древесных пород [1-15].

Установлено, что для микроклонального размножения берез в качестве базовой можно использовать питательную среду WPM, ? WPM + ВАР в концентрации 0,01 мл/л – у эксплантов *B. pendula* var. *Carelica*, *B. daurica*, *B. turkestanica*, *B. papyrifera*, *B. pubescens* отмечен активный морфогенез, образование куста с многочисленными побегами. Самой оптимальной средой для ризогенеза и пригодной для всех шести исследуемых видов берез (*B. pendula* var. *Carelica*, *B. pendula*, *B. daurica*, *B. turkestanica*, *B. papyrifera*, *B. pubescens*) отмечена среда WPM б/г, которая обеспечивает образование корней (80-85%) с первого пассажа.

В связи с тем, что ежегодно проводится рубка древесины, использование в качестве строительного материала, топливного материала происходит обеднение лесного массива. С этой целью необходимо создавать коллекцию биоматериалов, сохраняя его генетическую структуру.

Для того, чтобы реализовать максимум генетического эффекта, получаемого в селекционных программах и сократить время получения улучшенного посадочного материала в 2-3 раза необходимо использовать метод микроклонального размножения.

С использованием метода микроклонального размножения была создана коллекция клонов *Betula L.*, характеризующаяся высокой лесохозяйственной, декоративной, а также практической ценностью – *Betula pendula* var. *carelica*, *Betula dahurica* Pall., *Betula pendula*, *Betula pubescens*, *Betula papyrifera*, *Betula turkestanica* Litw.

Изученные нами популяции Березы повислой позволили выделить модельные субпопуляции с хорошими параметрами роста и развития. Полученные *in vitro* клоны в основном представлены формами, имеющими нормальный фенотип и развитие, сохраняющие специфичные для исходных генотипов особенности роста и развития.

Методика длительного субкультивирования на безгормональной питательной среде (периодичность пересадки один раз в 4-6 месяцев) даст возможность для массового тиражирования ценного генетического материала в нужный момент вне зависимости от сезона. Культура тканей, клеточная селекция при наличии обученного персонала и соответствующей лабораторной базы и теплицы позволит тиражировать ценные генотипы лесных культур в короткое время.

Выводы. Разработанный нами метод клонального микроразмножения рекомендуется использовать в селекционно-генетическом улучшении и создании коллекции ценных клонов для формирования плантационных насаждений. Повышение лесистости территории Республики может быть решено только комплексно, в том числе за счет активного внедрения плантационного способа ведения лесного хозяйства.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Баранов О.Ю. Изучение уровня генетической изменчивости и дифференциации среди форм берез // Проблемы лесоведения и лесоводства: сб. науч. тр. Института леса НАН Беларуси. – Беларусь: Гомель, 2002. – Вып. 55. – С. 143-147.
- [2] А.с. 1597386 СССР. Способ микроклонального размножения карельской березы / Бутова Г.П., Табацкая Т.М., Скрябина Л.Л.; опубл. 7.10.90, Бюл. № 37, 2 с.
- [3] Машкина О.С. Табацкая Т.М., Стародубцева Л.М. Длительное микрочеренкование для массового клонального размножения карельской березы и тополя // Физиология растений. – 1999. – Т. 46. – С. 950-953.
- [4] Байбурина Р.К., Н.В.Катаева, Р.Г. Бутенко, Н.В. Старова. Клональное микроразмножение гетерозисных гибридов осины и тополя // Бюл. Гл. ботан. сада. – 1992. – № 163. – С. 83-86.

- [5] Исаков Ю.Н., Машкина О.С. Лесная генетика и селекция: некоторые проблемы и перспективы использования // Интеграция фундаментальной науки и высшего лесотехнического образования по проблемам ускоренного воспроизводства, использования и модификации древесины // Мат-лы межд. науч.-практ. конф. – Воронеж, 13-16 июля 2000. – Т. 1. – С. 207-214.
- [6] Геринг Х.К., Цоглауер Б., Гоффманн, Пинкер И. Влияние ауксина и красного света на корнеобразование у побегов березы *in vitro* // Культура клеток растений и биотехнология. – М., 1986. – С. 106-110.
- [7] Катаева Н.В., Аветисов В.А. Клональное размножение в культуре ткани. – М.: Наука, 1981. – 216 с.
- [8] Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
- [9] Бутова Г.П., Скробова Л.Л. Морфогенез и регенерация растений дуба черешчатого в культуре *in vitro* // Физиология растений. – 1988. – Т. 35, вып. 5. – С. 1023-1029.
- [10] Ветчинникова Л.В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula L.* – М.: Наука, 2005. – 269 с.
- [11] Dubova I. Berza. *Betula pendula atsevisku klonu pecnacezu pavairosana in vitro* // Mezzinatue. – 1994. – Vol. 37, N 4. – P. 28-34.
- [12] Murashige T., Skoog F. Arevised medium for rapid growth and biassay with tobacco tissue cultures // *Physiol. plant.* – 1962. – Vol. 15, N 13. – P. 473-497.
- [13] Cheema G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension and tissue cultures of mature Himalayan poplar (*Populus ciliata*) // *Plant Cell Rep.* – 1989. – Vol. 8. – P. 124-127.
- [14] Schulzke R. Die Anwendng on vitro kultutehniken bei Waldbanmen // *Osterr Fortzfg.* – 1988. – Vol. 99, N 3. – P. 66-67.
- [15] Simola L.K. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula f. purpurea* // *Sci. Horticul.* – 1985b. – Vol. 26, N 1. – P. 77-85.

REFERENCES

- [1] Baranov O.Ju. Izuchenie urovnja geneticheskoy izmenchivosti i differenciacii sredi form berez. *Problemy lesovedeniya i lesovodstva: sb. nauch. tr. Instituta lesa NAN Belarusi. Belarus: Gomel', 2002. Vyp. 55. S. 143-147.*
- [2] A.s. 1597386 SSSR. Sposob mikroklonal'nogo razmnnozheniya karel'skoj berezy. Butova G.P., Tabackaja T.M., Skrobova L.L.; opubl. 7.10.90, Bjul. № 37, 2 s.
- [3] Mashkina O.S. Tabackaja T.M., Starodubceva L.M. Dlitel'noe mikrocherenkovanie dlja massovogo klonal'nogo razmnnozheniya karel'skoj berezy i topolja. *Fiziologiya rastenij.* 1999. T. 46. S. 950-953.
- [4] Bajburina R.K., N.V.Kataeva, R.G. Butenko, N.V. Starova. Klonal'noe mikrorazmnnozhenie geterozisnyh gibridov osiny i topolja. *Bjul. Gl. botan. sada.* 1992. № 163. S. 83-86.
- [5] Isakov Ju.N., Mashkina O.S. Lesnaja genetika i selekcija: nekotorye problemy i perspektivy ispol'zovanija. *Integracija fundamental'noj nauki i vysshego lesotehnicheskogo obrazovanija po problemam uskoren'nogo vosproizvodstva, ispol'zovanija i modifikacii drevesiny.* Mat-ly mezhd. nauch.-prakt. konf. Voronezh, 13-16 ijulja 2000. T. 1. S. 207-214.
- [6] Gering H.K., Coglauer B. Goffmann, Pinker I. Vlijanie auksina i krasnogo sveta na korneobrazovanie u pobegov berezy *in vitro.* *Kul'tura kletok rastenij i biotehnologija.* M., 1986. S. 106-110.
- [7] Kataeva N.V., Avetisov V.A. Klonal'noe razmnnozhenie v kul'ture tkani. M.: Nauka, 1981. 216 s.
- [8] Butenko R.G. Biologija kletok vysshih rastenij *in vitro* i biotehnologii na ih osnove. M.: FBK-PRESS, 1999. 160 s.
- [9] Butova G.P., Skrobova L.L. Morfogenez i regeneracija rastenij duba chereschatogo v kul'ture *in vitro.* *Fiziologija rastenij.* 1988. T. 35, vyp. 5. S. 1023-1029.
- [10] Vetchinnikova L.V. Karel'skaja bereza i drugie redkie predstaviteli roda *Betula L.* M.: Nauka, 2005. 269 s.
- [11] Dubova I. Berza. *Betula pendula atsevisku klonu pecnacezu pavairosana in vitro.* *Mezzinatue.* 1994. Vol. 37, N 4. P. 28-34.
- [12] Murashige T., Skoog F. Arevised medium for rapid growth and biassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. plant.* 1962. Vol. 15, N 13. P. 473-497.
- [13] Cheema G. S. Somatic embryogenesis and plant regeneration from cell suspension and tissue cultures of mature Himalayan poplar (*Populus ciliata*). *Plant Cell Rep.* 1989. Vol. 8. P. 124-127.
- [14] Schulzke R. Die Anwendng on vitro kultutehniken bei Waldbanmen. *Osterr Fortzfg.* 1988. Vol. 99, N 3. P. 66-67.
- [15] Simola L.K. Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula f. purpurea.* *Sci. Horticul.* 1985b. Vol. 26, N 1. P. 77-85.

IN VITRO КУЛЬТУРАСЫНДА ҚАЙЫННЫҢ КӨБЕЮ ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

Е. А. Шаденова, М. Т. Сембеков, А. Мамирова, М. Бурчаева

Тірек сөздері: Қайын, микроклональдік көбету.

Аннотация. Мақалада орман шаруашылығында жоғары сапалы және тәжірибелік маңыздылыққа ие, сәндік қайынның *Betula pendula var. Carelica.*, *Betula pendula*, *Betula daurica*, *Betula turcestanica*, *Betula papyrifera*, *Betula pubescens* түрлерінің клональды көбею сатылары қарастырылады.

Поступила 20.11.2014