

УДК: 631.461:631.445.24:633.15
AGRIS: F30

ЭФФЕКТ АБСЦИЗОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ ДЕПОНИРОВАНИИ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO

©Концевая И. И., канд. биол. наук,
Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины,
г. Гомель, Беларусь, ikantsavaya@mail.ru

EFFECT OF ABSCISIC ACID ON DEPOSITING OF THE KARELIAN BIRCH IN VITRO

©Kontsevaya I., Ph.D., F. Skorina Gomel State University,
Gomel, Belarus, ikantsavaya@mail.ru

Аннотация. В работе исследуется возможность длительного беспересадочного культивирования in vitro эксплантов карельской березы на средах, дополненных абсцизовой кислотой, в том числе на фоне включения повышенного содержания сахарозы, активированного угля, 6-БАП.

Методы исследования: культура in vitro, статистический анализ.

При депонировании в культуре in vitro карельской березы необходим периодический визуальный контроль за состоянием микрорастений и, по мере необходимости, пересадка растений на свежую питательную среду без гормонов. Отсутствует негативное влияние абсцизовой кислоты, в том числе при включении в состав инкубационной питательной среды повышенной концентрации сахарозы, активированного угля, 6-БАП, на рост и развитие эксплантов березы, субкультивированных после разных сроков хранения на свежие среды.

Abstract. The possibility of prolonged continuous cultivation in vitro of explants of Karelian birch on media supplemented with abscisic acid (including those with a high content of sucrose, activated carbon, 6-BAP) is discussed in the paper.

Methods: culture in vitro; statistical analysis.

Periodic visual monitoring of the condition of micro-plants and (on occasion) transplanting plants to a fresh nutrient medium without hormones are necessary during depositing the Karelian birch in vitro. There is no negative effect of abscisic acid on the growth and development of birch explants sub-cultured on fresh media after different storage times (including cases with additional high contents of sucrose, activated carbon and 6-BAP to the nutrient medium).

Ключевые слова: абсцизовая кислота, регенерационная способность, культура in vitro, береза, депонирование.

Keywords: abscisic acid, regenerative capacity, culture in vitro, birch, depositing.

К числу современных подходов сохранения *ex situ* представителей ценного генофонда древесных растений относится хранение образцов в виде живой коллекции с помощью различных методов культивирования *in vitro*. Живые коллекции могут поддерживаться: 1) в

виде пересадочных коллекций; 2) при депонировании в условиях пониженных положительных температур; добавлении консервантов; снижении атмосферного давления в культуральных сосудах; создании гипоксии; 3) хранением в течение многих лет при сверхнизких температурах. При этом каждый способ имеет свои преимущества и недостатки. Так, криосохранение — дорогостоящий и трудоемкий метод; к тому же протоколы криосохранения для большинства древесных пород находятся на стадии поисковых исследований [1]. Все это ограничивает применение данного способа депонирования.

Остальные вышеперечисленные методы длительного сохранения растений в культуре *in vitro* применяются редко, поскольку слабо изучен их эффект замедления ростовых процессов в культуре тканей и практически отсутствуют данные об их возможном дестабилизирующем влиянии на генотип растений [2]. Публикации по данному вопросу немногочисленны. Поиск веществ, способных одновременно замедлять рост растений и при этом содействовать сохранению их жизнеспособности длительный период времени, отработка способов их применения, всегда будут востребованы.

Одним из наиболее активных эндогенных ингибиторов ростовых процессов является абсцизовая кислота (АБК). Вследствие накопления АБК происходит изменение белкового метаболизма и повышение устойчивости к стрессовому фактору [3]. Установлено, что добавление в питательную среду АБК тормозит рост культуры *in vitro* [4, 5].

Целью настоящей работы явилось изучение возможности длительного беспересадочного культивирования *in vitro* эксплантов карельской березы на средах, дополненных АБК, в том числе на фоне включения повышенного содержания сахарозы, активированного угля, 6-бензиламинопурина.

Материал и методика

В работе использовали микропобеги клона 76 карельской березы (*Betula pendula* var. *carelica* Merckl.). Культуры росли на модифицированной агаризованной среде WPM, без гормонов [6], при оптимальных условиях роста. После 1 месяца культивирования в асептических условиях побеги разрезали на 1-узловые сегменты. Экспланты помещали с соблюдением вертикальной ориентации на агаризованные модифицированные питательные среды. Состав пяти опытных сред представлен в Таблице 1.

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

Объем использованных сосудов составлял 200 мл, в каждом из них содержалось 50 мл среды. В культуральный сосуд помещали по 18–20 эксплантов и инкубировали при оптимальных условиях роста. Состояние эксплантов в процессе хранения визуально оценивали через 1, 3, 6, 9, 12 месяцев культивирования по следующим параметрам: процент эксплантов с признаками некроза, хлороза, усыхания.

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 пассирования материала подсчитывали число эксплантов, полученных из одного культурального сосуда. В течение 1 месяца узловые сегменты побегов инкубировали при оптимальных условиях роста, после чего проводили оценку материала. Контролем служили экспланты, которые росли при стандартных условиях в течение 1 месяца. Определяли морфологические параметры сформировавшихся растений (высоту побегов, число листьев и корней, степень их развитости, длину корней).

Обработку экспериментальных данных осуществляли по стандартным статистическим программам Microsoft Excel и «Statsoft (USA) Statistica v.7.0». Для сравнения изучаемых показателей между опытными и контрольными группами использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В течение первых трех месяцев культивирования эксплантов наблюдали формирование из них полноценных растений на большинстве апробированных опытных средах. Затем рост основных побегов минимизировался, хотя ростовые процессы продолжались вплоть до 9 месяца культивирования. Независимо от состава питательной среды, самые развитые микрорастения спустя 9 месяцев культивирования достигали в высоту 8–14 см.

Установлено, что цитокинин 6-БАП практически не подавлял апикальное доминирование. Ризогенез наблюдали у 100% побегов на всех опытных средах. Обычно к 12 месяцам инкубирования формировались сильные, мощные корни. Следует отметить, что у микрорастений, культивированных на среде 3, содержащей 2,0 мг/л БАП, в основании побегов формировалась каллусная ткань, с различной интенсивностью роста у разных растений.

В результате длительного культивирования, одновременно с ростом и развитием эксплантов, наблюдали деструктивные изменения (Таблица 2).

Уже в течение трех месяцев хранения отмечали до 5–60% микрорастений с незначительными признаками некроза. Изменение зеленой окраски начиналось постепенно, распространяясь по листу, независимо от положения на растении. Иногда листочки приобретали коричневую окраску, некоторые из них опадали. С удлинением периода хранения микроклональных растений, описанные выше деструктивные процессы становились у них более выраженными.

Полностью засохшие или некротизированные растения обычно наблюдали спустя 6 месяцев независимо от состава питательных сред. К 9–12 месяцам беспересадочного инкубирования почти все растения карельской березы полностью или частично подверглись процессу старения (Таблица 2).

Способность культуры к росту и пролиферации после различных периодов хранения была оценена после того, как 1-узловые сегменты побегов перенесли на свежую среду и инкубировали при стандартных условиях в течение 1 месяца. На данном этапе подсчитывали число полученных эксплантов из 1 сосуда. Отмечали тенденцию уменьшения суммарного числа полученных эксплантов от удлинения периода хранения (Таблица 2).

В процессе культивирования при стандартных условиях сегменты побегов формировали полноценные растения. Выявлено, что растения после длительного культивирования на опытных средах, содержащих АБК, во втором пассаже имеют более низкие значения по высоте и числу корней по сравнению с контролем. В вариантах 3–5 отмечали существенное уменьшение показателя «средняя высота растений». Несомненно, на

данный результат оказало влияние наличие в питательной среде первого пассажа 6-БАП и/или сахарозы в концентрации 40,0 мг/л (Таблица 2).

Таблица 2.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ
НА ДЕСТРУКТИВНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПЛАНТОВ,
РОСТ И РАЗВИТИЕ МИКРОРАСТЕНИЙ ПОСЛЕ СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Вариант (среда– длительность хранения, мес)	Экспланты с признаками некроза, хлороза / усыхания, %	Число эксплантов из одного сосуда, шт.	Средняя высота растений, см	Среднее число корней на растении, шт.
Контроль–1	0/0	80	4,5±0,3	3,5±0,4
1–6	10/5	45	5,0±0,4	4,5±0,5
1–9	70/10	40	3,5±0,3	3,1±0,3
1–12	80/10	20	3,4±0,3	3,5±0,6
2–6	60/0	18	3,6±0,2	4,2±0,4
2–9	95/0	25	3,7±0,3	2,1±0,3*
2–12	95/0	10	3,9±0,4	3,3±0,5
3–6	80/10	15	3,0±0,4	4,4±0,5
3–9	80/10	5	1,6±0,5*	1,3±0,4*
3–12	85/10	8	2,9±0,3*	1,6±0,3*
4–6	10/30	50	2,7±0,2*	2,2±0,4
4–9	40/40	45	2,5±0,2*	2,1±0,4*
4–12	90/5	5	2,9±0,4*	1,6±0,7*
5–6	20/20	62	2,3±0,2*	2,5±0,4
5–9	80/20	26	2,1±0,2*	2,2±0,4
5–12	80/20	19	2,5±0,2*	2,2±0,4

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

Приведенные в настоящей работе результаты свидетельствуют о влиянии апробированных составов питательных сред на состояние эксплантов карельской березы при разной длительности периода хранения. Выявлены симптомы некроза, хлороза, усыхания. Сходные симптомы были отмечены исследователями на других растениях при депонировании на модифицированных по составу средах [2, 5, 7–8].

На различных культурах показано позитивное влияние АБК в концентрации 10–20 мг/л на сохранение жизнеспособности и регенерационную активность культуры тканей [4–5]. Имеются сведения об ингибирующем влиянии АБК, применяемой в инкубационных средах, на рост и развитие микрорастений дуба после второго периода субкультивирования [2]. Аналогичные результаты получены в текущем эксперименте на клоне 76 карельской березы.

Заключение

Таким образом, при депонировании карельской березы необходим периодический визуальный контроль за состоянием микрорастений и, по мере необходимости, пересадка растений на свежую питательную среду без гормонов. Отсутствует негативное влияние изученных веществ на рост и развитие эксплантов, субкультивированных после разных сроков хранения на свежие среды. Показана возможность депонирования культуры карельской березы в условиях *in vitro* в течение 12 месяцев при использовании питательных сред, дополненных АБК, в том числе при включении в состав инкубационных сред повышенной концентрации сахарозы, активированного угля, 6-БАП.

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

Список литературы:

1. Reed B. M. Cryopreservation of in vitro tissue of deciduous forest trees // Plant Cryopreservation: A Practical Guide. New York: Springer, 2007. P. 365-386.
2. Коваль С. Ф., Коваль В. С., Тымчук С. М. и др. Генетические коллекции: проблемы формирования, сохранения и использования // Цитология и генетика. 2003. Т. 37. №4. С. 46-53.
3. Четверикова Е. П. Роль абсцизовой кислоты в морозоустойчивости растений и криоконсервации культур in vitro // Физиология растений. 1999. Т. 46. №5. С. 823-929.
4. Jarret R. L., Gawel N. Absciscic acid-induced growth inhibition of sweet Potato (*Ipomoea batatas* L.) in vitro // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004. V. 24. №1. P. 13-18.
5. Сидорович Е. А., Кутас Е. Н. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений. Минск: Навука і тэхніка, 1996. 249 с.
6. Lloyd G. et al. Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture // Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. 1980. V. 30. P. 421-427.
7. Белокурова В. Б., Листван Е. В., Майстров П. Д. и др. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры // Цитология и генетика. 2005. №1. С. 41-51.
8. Машкина О. С., Табацкая Т. М. Рекомендации по сохранению и воспроизводству методами биотехнологии ценных генотипов карельской березы, осины, тополя белого и сереющего. Воронеж: ВГУ, 2005. 29 с.

References:

1. Reed, B. M. (2007). Cryopreservation of in vitro tissue of deciduous forest trees // Plant Cryopreservation: A Practical Guide. New York, Springer. 365-386.
2. Koval, S. F., Koval, V. S., Tymchuk, S. M., & Boguslavsky, R. L. (2003). Genetic collections: problems of formation, preservation and use. *Cytology and Genetics*, 37(4), 46-53.
3. Chetverikova, E. P. (1999). The role of abscisic acid in the frost resistance of plants and cryopreservation of cultures in vitro. *Plant physiology*, 46(6), 823-829.
4. Jarret, R. L., & Gawel, N. (1991). Absciscic acid-induced growth inhibition of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) in vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 24(1), 13-18.
5. Sidorovich, E. A., & Kutas, E. N. (1996). Clonal micropropagation of new fruit and berry plants. Minsk, Navuka i tehnika, 249.
6. Lloyd, G., & McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture*. 30, 421-427.
7. Belokurova, V. B., Listvyan, E. V., Listvyan, E. V., Sikura, J. J., Gleb, Yu. Yu., & Kuchuk, N. V. (2005). Use of plant biotechnology methods to preserve and study the biodiversity of the world's flora. *Cytology and Genetics*, (1), 41-51.
8. Mashkina, O. S., & Tabatskaya, T. M. (2005). Recommendations for the preservation and reproduction by methods of biotechnology of valuable genotypes of Karelian birch, aspen, white and gray poplar. 29.

*Работа поступила
в редакцию 31.05.2018 г.*

*Принята к публикации
04.06.2018 г.*

Ссылка для цитирования:

Концевая И. И. Эффект абсцизовой кислоты при депонировании карельской березы в культуре *in vitro* // Бюллетень науки и практики. 2018. Т. 4. №7. С. 11-16. Режим доступа: <http://www.bulletennauki.com/kontsevaya-irina> (дата обращения 15.07.2018).

Cite as (APA):

Kontsevaya, I. (2018). Effect of abscisic acid on depositing of the Karelian birch *in vitro*. *Bulletin of Science and Practice*, 4(7), 11-16.