

УДК 581.14

UDC 581.14

**ВЛИЯНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ИНДУКЦИЮ ОРГАНОГЕНЕЗА ТРИПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ *POPULUS TREMULA* В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*<sup>1</sup>**

**THE INFLUENCE OF HORMONAL CULTURE MEDIUM COMPOUND ON THE INDUCTION OF ORGANOGENESIS OF TRIPLOID *POPULUS TREMULA* PLANTS *IN VITRO***

Большакова Екатерина Евгеньевна  
магистрант

Bolshakova Ekaterina Evgenevna  
graduate student

Шургин Алексей Иванович  
к.с.-х.н., доцент

Shurgin Aleksey Ivanovich  
Cand.Agr.Sci., associate professor

Сергеев Роман Владимирович  
к.с.-х.н., ст. преподаватель

Sergeev Roman Vladimirovich  
Cand.Agr.Sci., senior lecturer

Новиков Петр Сергеевич  
аспирант  
*Поволжский государственный технологический университет, Йошкар-Ола, Россия*

Novikov Petr Sergeevich  
postgraduate student  
*Volga State University of Technology, Yoshkar-Ola, Russia*

Проведены исследования по оптимизации питательных сред, для культивирования уникальных генотипов *Populus tremula* L. *in vitro*. Установлено, что для индукции пролиферации побегов *Populus tremula* в культуре *in vitro* необходимо использовать питательную среду MS дополненную 0,1 мл/л ИМК и 0,1 или 0,5 мл/л БАП. Для стимуляции ризогенеза, необходимо использовать питательную среду MS, дополненную 0,3 мл/л ИМК

The researches have been conducted for the optimization of culture medium for unique genotypes of *Populus tremula* L. *in vitro*. It was found that for induction of proliferation of the arms of *Populus tremula* *in vitro* one should use MS culture medium with 0,1 ml / l IBA and 0,1 or 0,5 ml / l BAP. For stimulation of rhizogenesis MS culture medium with 0,3 ml / l IBA should be used

Ключевые слова: ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА, ГОРМОНАЛЬНЫЙ СОСТАВ, АУКСИН, ЦИТОКИНИН, РИЗОГЕНЕЗ, ПОБЕГООБРАЗОВАНИЕ, *POPULUS TREMULA*

Keywords: NUTRIENT SOLUTION, HORMONAL COMPOSITION, AUXIN, CYTOKININ, ROOT FORMATION, TILLERING, *POPULUS TREMULA*

**Введение.** Выращивание ценных генотипов *Populus tremula* L. – один из путей повышения продуктивности лесных насаждений. Во-первых, осина формирует высокопродуктивные древостои в 2 -2,5 раза быстрее деревьев хвойных пород. Во-вторых, качественная древесина *P. tremula* имеет большой спрос в различных отраслях деревообрабатывающей и деревоперерабатывающей промышленности [1].

<sup>1</sup> Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 - 2013 годы» при финансовой поддержке Минобрнауки России (Государственный контракт №14.518.11.7055 от 20.07.2012 г.) на базе Биотехнологического комплекса по воспроизводству высших растений в условиях «чистой комнаты».

Однако древостой осины отличаются низкой устойчивостью к болезням и вредителям. По причине, частого поражения деревьев ложным осиновым трутовиком - *Phellinus tremulae* (Bondartsev) Bondartsev & P.N. Borisov, древесину этого дерева рассматривают как малоценную. Следует отметить, что существуют формы триплоидной осины, устойчивые к болезням и вредителям. В Шарьинском районе создан генетический резерват триплоидной формы осины, обладающей устойчивостью к болезням. Кроме того, такие деревья характеризуются полнодревесностью стволов и высокой продуктивностью [2,3]. Триплоидная осина – полиплоид, в природе такие особи встречаются редко [4].

В связи с этим, выращивание триплоидной осины, является очень перспективным и необходимым направлением, особенно в свете все возрастающей потребности общества в качественной древесине [1].

Разработка и применение технологии размножения ценных клонов осины методом *in vitro* позволяет преодолеть трудности, возникающие при традиционных способах размножения. Высокая результативность процесса клонального размножения напрямую зависит от эффективности каждого этапа. Одним из важнейших параметров, обеспечивающих успех всей работы, является - грамотно подобранный, гормональный состав питательной среды. Присутствие в питательной среде гормонов, оказывает значительное влияние на культивируемые растения. Фитогормоны влияют на деление и рост клеток, состояние покоя, созревание, старение, формирование пола, устойчивость к стрессу, тропизмы, транспирацию; обеспечивают функциональную целостность растительного организма, закономерную последовательность фаз индивидуального развития. В культуре ткани фитогормоны, добавленные в различных пропорциях, регулируют синтез эндогенных гормонов растений, что проявляется в разнообразных морфогенетических реакциях клеток и тканей [5,6].

Процесс микроклонального размножения включает в себя 2 этапа:

1 – собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов;

2 - *in vitro* укоренение размноженных побегов.

Оба этих этапа требуют индивидуального сочетания регуляторов роста в питательной среде. Кроме того, каждый вид растений индивидуально реагирует на ту или иную концентрацию фитогормонов в среде, потому невозможно подобрать одного универсального сочетания регуляторов роста [5].

Цель работы - определить оптимальный состав и необходимую концентрацию фитогормонов в питательных средах для культивирования уникальных генотипов растений *Populus*, обладающих высокой скоростью прироста биомассы.

#### **Материалы, методы и объекты исследований.**

Наиболее объективным подходом к оптимизации питательных сред по гормональному составу, является выявление закономерностей активации процессов побего- и корнеобразования на питательных средах, содержащих экзогенные регуляторы роста в широком диапазоне концентраций.

В качестве экспериментального растительного материала использовали микропобеги *Populus tremula*, культивируемые *in vitro* специально для экспериментальных целей.

Культивирование проводили при 21-22°C, освещенности 1800 люкс, фотопериоде 16/8.

С целью оптимизации гормонального состава среды для культивирования триплоидной осины, осуществлялся подбор оптимальных концентраций ауксинов и цитокининов. Изучалось влияние регуляторов роста на динамику развития регенерантов, коэффициент размножения и ризогенез. Экспланты *P. tremula* культивировали на питательной среде MS, различающейся по содержанию регуляторов роста.

В эксперименте было заложено 48 вариантов сред с различным содержанием фитогормонов. Концентрация регуляторов роста в средах соответствовала матрице планирования эксперимента (таблица 1).

Таблица 1 - Матрица планирования эксперимента по оптимизации состава питательной среды для индукции побего- и корнеобразования эксплантов *Populus tremula*.

Цитокинины	Ауксины	Б/Г	ИМК			ИУК		
			0,03	0,1	0,3	0,03	0,1	0,3
Б/Г		0	7	14	21	28	35	42
БАП	0,1	1	8	15	22	29	36	43
	0,5	2	9	16	23	30	37	44
	1,0	3	10	17	24	31	38	45
Кинетин	0,1	4	11	18	25	32	39	46
	0,5	5	12	19	26	33	40	47
	1,0	6	13	20	27	34	41	48

Примечание: Значения 0,03; 0,1; 0,3 – концентрации гормонов в среде MS.  
Цифры 1,2,3,...48 – порядковые номера вариантов сред.

На каждый вариант было заложено по 10 растений на повторность, повторность 3х-кратная. Всего было заложено 1440 растений (рисунок 1).



Рисунок – 1 Пятинедельные растения *Populus tremula*, культивируемые на питательной среде MS, дополненной 0,1 мл/л ИМК + 0,5 мл/л БАП.

Через 5 недель культивирования была проведена оценка влияния индолилмасляной кислоты, индолилуксусной кислоты, 6-бензиламинопурина и кинетина на мультипликацию побегов и ризогенез в культуре ткани *Populus tremula* L. Оценку проводили по пяти критериям: общая длина побегов, количество побегов, количество междоузлий, общая длина корней и количество корней.

**Результаты и обсуждение.** Полученные экспериментальным путем данные, показали наличие положительного эффекта при совместном использовании ауксинов и цитокининов.

Наибольшее количество побегов – 2,7 шт., образовалось на питательной среде MS, дополненной 0,1 мл/л ИМК + 0,5 мл/л БАП (вариант 16). Наименьшее количество побегов - 0,6 шт., образовалось на питательной среде MS, дополненной 0,03 мл/л ИУК + 0,1 мл/л Кн (вариант 32) (таблица – 2)

Таблица 2 – Эффект влияния фитогормонов на количество побегов в культуре ткани *Populus tremula*.

Цитокинины	Ауксины	Б/Г	ИМК			ИУК		
			0,03	0,1	0,3	0,03	0,1	0,3
Б/Г		1,4	1,5	1,6	1,1	1,1	1,2	1,3
БАП	0,1	1,4	1,5	2,2	1,3	1,3	1,6	1,4
	0,5	1,5	1,7	2,7	1,8	0,8	1,6	1,9
	1,0	1,7	2,0	1,8	1,2	1,8	1,2	1,7
Кинетин	0,1	2,1	1,7	1,6	1,3	0,6	1,1	1,3
	0,5	2,1	2,0	1,7	1,9	0,7	1,3	1,5
	1,0	1,6	2,0	1,5	1,1	2,1	1,0	1,7

Примечание: В окрашенных ячейках, представлено среднее количество побегов, шт.

Наибольшую длину побегов (7,7 см) получили у растений, культивируемых на питательной среде MS, дополненной 0,1 мл/л ИМК + 0,5 мл/л БАП (вариант 16). Наименьшую длину побегов (1,6 см) получили у растений, культивируемых на питательной среде MS, дополненной 0,03 мл/л ИУК + 0,5 мл/л БАП (вариант 30) (таблица – 3).

Таблица 3 – Эффект влияния фитогормонов на общую длину побегов в культуре ткани *Populus tremula*.

Цитокинины	Ауксины	Б/Г	ИМК			ИУК		
			0,03	0,1	0,3	0,03	0,1	0,3
Б/Г		4,1	6,9	6,	5,5	3,0	3,0	5,0
БАП	0,1	4,4	5,1	7,3	4,0	3,4	4,3	5,3
	0,5	3,2	2,9	7,7	3,8	1,6	5,4	2,8
	1,0	3,0	2,6	3,7	2,2	3,7	1,8	2,8
Кинетин	0,1	6,4	6,0	6,2	5,4	2,9	4,0	4,1
	0,5	3,7	4,7	4,2	5,5	3,1	3,8	3,0
	1,0	3,3	5,4	4,4	2,7	4,8	2,6	2,8

Примечание: В окрашенных ячейках, представлены значения средней общей длины побегов, см.

Наибольшее количество междоузлий – 16,9 шт., образовалось на питательной среде MS, дополненной 0,1 мл/л ИМК + 0,1 мл/л БАП (вариант 15). Наименьшее количество междоузлий – 3,5 шт., образовалось на питательной среде MS, дополненной 0,03 мл/л ИМК + 1,0 мл/л Кн (вариант 27) (таблица 4)

Таблица 4 – Эффект влияния фитогормонов на количество междоузлий побегов в культуре ткани *Populus tremula*.

Цитокинины	Ауксины	Б/Г	ИМК			ИУК		
			0,03	0,1	0,3	0,03	0,1	0,3
Б/Г		8,8	12,7	13,9	11,3	3,5	5,0	8,3
БАП	0,1	9,0	11,2	16,9	9,4	4,6	8,1	9,5
	0,5	7,7	9,0	14,6	13,1	2,4	10,0	6,9
	1,0	7,9	12,3	7,3	7,0	5,7	4,2	5,9
Кинетин	0,1	12,8	13,0	11,1	9,0	3,4	7,3	7,2
	0,5	7,2	10,1	8,0	7,1	3,6	7,1	7,5
	1,0	6,7	12,0	7,9	3,5	6,2	5,8	6,2

Примечание: В окрашенных ячейках, представлено среднее количество междоузлий, шт.

Наибольшее количество корней (3,2 шт) образовалось на питательной среде MS, дополненной 0,3 мл/л ИМК (вариант 21). На средах, дополненных 0,3 мл/л ИУК + 0,1 мл/л БАП (вариант 45), 0,03 мл/л ИУК + 0,1 мл/л БАП (вариант 31) – образования корней не наблюдалось (таблица – 5).

Таблица 5 – Эффект влияния фитогормонов на количество корней в культуре ткани *Populus tremula*.

Цитокинины	Ауксины	Б/Г	ИМК			ИУК		
			0,03	0,1	0,3	0,03	0,1	0,3
Б/Г		1,3	0,1	1,6	3,2	0,8	0,5	2,4
БАП	0,1	1,4	2,1	1,1	1,1	0,6	1,0	2,5
	0,5	0,5	1,1	1,1	0,3	0,1	0,2	0,1
	1,0	0,3	0,5	0,4	0,1	0,0	0,1	0,0
Кинетин	0,1	0,9	0,2	1,3	1,2	0,7	1,6	2,4
	0,5	0,1	1,9	0,5	0,8	0,5	0,8	0,6
	1,0	1,4	0,8	0,5	0,2	0,4	0,4	0,2

Примечание: В окрашенных ячейках, представлено среднее количество корней, шт.

Корни наибольшей длины образовались на питательной среде MS, дополненной 0,3 мл/л ИМК (вариант 21) – средняя длина корней – 7,6 см (таблица 6).

Таблица 6 – Эффект влияния фитогормонов на длину корней в культуре ткани *Populus tremula*.

Цитокинины	Ауксины	Б/Г	ИМК			ИУК		
			0,03	0,1	0,3	0,03	0,1	0,3
Б/Г		3,4	4,2	3,7	7,6	1,9	2,0	4,8
БАП	0,1	3,8	2,9	3,1	3,1	0,5	2,2	4,3
	0,5	1,3	0,6	3,0	0,9	0,1	0,4	0,4
	1,0	0,6	0,6	1,2	0,4	0,1	0,1	0,0
Кинетин	0,1	2,5	5,1	4,6	3,6	1,8	3,6	5,0
	0,5	0,2	2,1	1,8	2,2	1,6	1,7	1,4
	1,0	0,4	2,4	1,3	0,5	0,9	1,0	0,2

Примечание: В окрашенных ячейках, представлено общая длина корней, см.

В вариантах сред - №№ 21, 39, 42, 43, 46, где концентрация ауксинов значительно превосходит концентрацию цитокининов, или цитокинины отсутствуют – наблюдается активное развитие корней. Интересно отметить, что в среде № 11, где концентрация ауксина ИМК - 0,03 мл/л, меньше концентрации кинетина - 0,1 мл/л, также наблюдается активный ризогенез.

В вариантах питательных сред под номерами – 4, 14, 15, 16, наблюдается активное побегообразование. В средах №№ 14, 15, 16 –

одинаковая концентрация ауксина ИМК - 0,1 мл/л. Различаются эти среды по содержанию БАП: среда № 15 содержит 0,1 мл/л БАП, среда № 16 - 0,5 мл/л БАП. А среда № 14 вообще не содержит цитокининов. В среду №4 был добавлен кинетин, в количестве 0,1 мл/л.

Обобщив полученные данные, можно сказать, что для интенсивной пролиферации побегов *Populus tremula* в культуре *in vitro* необходимо использовать питательную среду MS дополненную 0,1 мл/л ИМК и 0,1 или 0,5 мл/л БАП. Для интенсивного ризогенеза *Populus tremula* в культуре *in vitro* необходимо использовать питательную среду MS, дополненную 0,3 мл/л ИМК.

### **Выводы**

Соотношение фитогормонов в питательной среде, является ключевым фактором, определяющим активность ростовых процессов растительных клеток культивируемых *in vitro*. Ауксины и цитокинины – играют важнейшую роль в индукции побегообразования и ризогенеза. Так в питательных средах, где концентрация ауксинов превосходила концентрацию цитокининов или цитокинины отсутствуют, наблюдали активное развитие корней. Анализ полученных данных позволяет заключить, что оптимальным для индукции корнеобразования является двадцать первый вариант среды, в котором концентрация ИМК равна 0,3 мл/л, а цитокинины отсутствуют. Таким образом, 21 вариант среды может быть рекомендован для инициации ризогенеза в эксплантах ткани *Populus tremula*. Для интенсивной пролиферации побегов *Populus tremula* в культуре *in vitro* рекомендуем использовать 15 и 16 варианты питательных сред. Соотношение гормонов в которых - 0,1 мл/л ИМК и 0,1 или 0,5 мл/л БАП соответственно.



*Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 - 2013 годы» при финансовой поддержке Минобрнауки России (Государственный контракт №14.518.11.7055 от 20.07.2012 г.) на базе Биотехнологического комплекса по воспроизводству высших растений в условиях «чистой комнаты».*

#### Список литературы:

1. Газизуллин А.Х., Чернов В.И., Гарипов Н.Р., Исмагилов Р.И. Формы осины в лесах республики Татарстан // Аграрная Россия – М., 2009 – спец. выпуск – С. 19-20.
2. Петрова Г.А. Использование методов биотехнологии для получения здорового посадочного материала осины (*populus tremula l.*) в условиях республики Татарстан: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. - М., 2011. – 25 с.
3. Зонтиков Д.Н., Коренев И.А. Морфологический и анатомический анализ некоторых морфотипов *Populus tremula l.* в Костромской области // Материалы международной научно-практической конференции 22-23 марта 2011 г., Санкт-Петербург, ФГУ «СПбНИИЛХ» - С. 41-43.
4. Darlington, C.D., and Wylie, A.P. 1956. Chromosome atlas of flowering plants. MacMillan Co., New York.
5. Сергеев Р.В. Селекция и технология микроклонального размножения ивы остролистной (*Salix acutifolia* Willd.): Дис. канд.с.-х. наук. – Йошкар – Ола, 2011. – 105 с.
6. Аубакирова Л.С., Калашникова Е.А. Интенсификация выращивания лесопосадочного материала // Биотехнология. Теория и практика – Астана, 2011 – Вып. №2 – С. 19-24.

#### References

1. Gazizullin A.H., Chernov V.I., Garipov N.R., Ismagilov R.I. Formy osiny v lesah respubliky Tatarstan // Agrarnaja Rossija – M., 2009 – spec. vypusk – S. 19-20.
2. Petrova G.A. Ispol'zovanie metodov biotehnologii dlja poluchenija zdorovogo posadochnogo materiala osiny (*populus tremula l.*) v uslovijah respubliky Tatarstan: Avtoref. dis. ... kand. s.-h. nauk. - M., 2011. – 25 s.

3. Zontikov D.N., Korenev I.A. Morfologicheskij i anatomicheskij analiz nekotoryh morfortipov Populus tremula l. v Kostromskoj oblasti // Materialy mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii 22-23 marta 2011 g., Sankt-Peterburg, FGU «SPbNIILH» - S. 41-43.

4. Darlington, C.D., and Wylie, A.P. 1956. Chromosome atlas of flowering plants. MacMillan Co., New York.

5. Sergeev R.V. Selekcija i tehnologija mikroklonal'nogo razmnozhenija ivy ostrolistnoj (*Salix acutifolia* Willd.): Dis. kand.s.-h. nauk. – Joshkar – Ola, 2011. – 105 s.

6. Aubakirova L.S, Kalashnikova E.A. Intensifikacija vyrashhivaniya lesoposadochnogo materiala // Biotehnologija. Teorija i praktika – Astana, 2011 – Vyp. №2 – S. 19-24.