

И.И. Концевая, Т.А. Толкачева, А.А. Чиркин

Действие гидрофильных компонентов куколок дубового шелкопряда на культивируемые ткани березы и осины

С каждым годом все более возрастает проблема воспроизводства, эффективного использования и сохранения древесных ресурсов леса. Для эффективного сохранения и массового воспроизводства ценных форм осины, различных видов берез, прежде всего карельской, необходимо развивать и внедрять в производство метод микроклонального размножения. Для древесных растений этапами этой технологии являются: 1) стерилизация и отбор чистого растительного материала, 2) омоложение культуры тканей, 3) мультипликация микропобегов, 4) элонгация микропобегов и их укоренение, 5) перенос растений из стерильных условий в условия *in vivo* для адаптации. При работе с культурами тканей растений существует проблема постоянного инфицирования пассируемого клонального материала микроорганизмами. Контаминация клеточных культур возникает либо из внутренних тканей первичного экспланта, либо является обычно атрибутом недостаточной стерилизации материала или неправильных приемов работы, либо вводится случайным образом во время манипуляций в лаборатории [1]. В практике микроклонального размножения для подавления внутренней инфекции, вызванной наличием спор грибов или бактерий во внутренних полостях тканей, часто в питательную среду вводят различные антибиотики [2]. Однако присутствие антибиотиков может стимулировать либо, наоборот, ингибировать рост и развитие микрорастений в результате токсичного действия [3]. В последние годы показано, что экстракт куколок китайского дубового шелкопряда благодаря антиоксидантному и иммуномодулирующему эффектам может потенцировать действие антибиотиков [4]. Поэтому целью работы было изучение возможности введения водного экстракта куколок дубового шелкопряда (ВЭКШ) в состав питательной среды для микроклонального размножения осины и некоторых видов березы.

Материал и методы. В качестве объектов исследования использовали клоны березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.), березы повислой (*B. pendula* Roth.), березы чернокорой (*B. obscura* Kotula ex Fiek), березы карельской (*B. pendula* Roth. var. *carelica* Merckl.), осины (*Populus tremula* L.). Возраст культивируемого материала составлял не менее 3-х лет, с периодическим субкультивированием на свежие безгормональные питательные среды 1–12 раз в год. Эксплантами служили 1-почечные сегменты побегов, длиной 0,5–1,0 см, листья микрорастений, сегменты междоузлий, каллусная культура.

В асептических условиях у 30-дневных микрорастений нарезали экспланты, которые помещали на питательную среду WPM, безгормональную либо дополненную цитокинином 6-бензиламинопурином (БАП) в концентрации 2,0 мг/л (в зависимости от условий эксперимента). В опытных вариантах в стерильных условиях в проавтоклавированную агаризованную среду добавляли ВЭКШ, с расчетом 0,001; 0,01; 0,1; 1,0; 10; 15; 20 мл на 100 мл питательной среды. В опыте по изучению совместного действия экстракта и антибиотика цефотаксима последний в концентрации 500 мг/л в стерильных условиях

добавляли в проавтоклавированную питательную среду. Во всех экспериментах основным контролем служила среда без гормонов. Основу питательной среды составляла смесь неорганических солей WPM [5]. Витамины, микроэлементы добавляли по прописи Мурасиге и Скуга [6]. pH среды перед стерилизацией доводили до 5,6–5,8. Автоклавировали среды при 1,1 атм в течение 20 мин. Культивирование материала проводили при температуре 25°C, круглосуточном освещении 2,5–3,5 тыс. лк. Число повторностей в каждом варианте составило 40. Состояние материала оценивали спустя 30 дней. При использовании в качестве эксплантов листьев и междоузлий для усиления процесса дифференциации органогенных структур применяли дополнительное культивирование на безгормональной среде в течение 30 дней. Отмечали степень бактериальной инфицированности материала либо ее отсутствие, процент неразвитых эксплантов с признаками хлороза и некроза. Оценка морфологических параметров микрорастений проводили по следующим признакам: высота растений, число листьев, число корней, степень развития основных частей растений, средняя масса 1 микрорастения. Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием программы Excel.

Результаты и их обсуждение. Экспериментальный материал был получен из микрорастений клона ч1 березы чернокорой, культивированных в беспересадочной культуре в течение 12 месяцев на безгормональной среде, включающей в своем составе, помимо сахарозы, 0,3% сорбита. Для накопления необходимого количества эксплантов провели одноразовое пассирование культуры на безгормональную среду. В качестве эксплантов в опыте использовали 1-почечные сегменты побегов. В вертикальной ориентации их помещали на среду, в 100 мл которой содержалось 0,1; 1,0 либо 10,0 мл ВЭКШ. Для контроля были выбраны результаты, полученные при культивировании эксплантов на безгормональной среде. Установлено, что при инкубировании эксплантов на среде, содержащей в 100 мл объема 10 мл ВЭКШ, отмечали нормальный рост узловых сегментов побегов и развитие полноценных сильных растений. В данном варианте опыта ризогенез составлял 100%. У каждого растения наблюдали интенсивное корнеобразование, когда формировались длинные (до 5–7 см) разветвленные корни. Средняя высота побегов составила 5,8 см. В этом эксперименте установлено бактериостатическое действие ВЭКШ в концентрации 0,1–10 мл на 100 мл питательной среды.

Затем в качестве опытного материала использовали микрорастения осины и различных видов березы, культивированных в течение 12 месяцев на безгормональной среде, без периодического пассирования. Для получения необходимого в эксперименте количества эксплантов выполнили однократное субкультивирование на питательную среду аналогичного состава. Эксплантами послужили 1-почечные сегменты побегов различных клонов березы и осины, которые помещали на среду, дополненную ВЭКШ в концентрации 0,1; 1,0; 10,0; 15,0; 20,0 мл экстракта на 100 мл среды. Для контроля использовали результаты, полученные при культивировании эксплантов на безгормональной среде. Показано, что использование питательной среды с концентрацией ВЭКШ 10–20 мл/100 мл питательной среды у всех изученных клонов способствовало получению визуально чистой растительной культуры, без признаков инфицированности питательной среды, при отсутствии симптомов некроза и старения материала. Это можно расценить как бактериостатический эффект экстракта. Однако были получены неоднозначные эффекты такой концентрации экстракта на морфологические параметры изученных генотипов микрорастений.

В последующих экспериментах было изучено действие ВЭКШ и антибиотика цефотаксима на регенерационную способность березы и осины. Сегменты побегов различных клонов березы и осины помещали на среды, содержащие в опытных вариантах ВЭКШ либо ВЭКШ и цефотаксим. Концентрации веществ и комбинации их применения указаны в табл.

Наличие бактериальной инфекции в слабой и средней степени отмечали у всех изученных клонов, экспланты которых культивировали на безгормональной среде. В остальных вариантах опыта присутствие инфекции не констатировали. Инфицированность материала повлияла на развитие микрорастений у клона Тр березы карельской и клона Рт осины, на что указывают низкие значения морфологических параметров при сравнении вариантов с использованием безгормональных сред, в отсутствии цефотаксима и при его наличии (табл.).

В данном эксперименте на рост и развитие эксплантов также повлияли состав питательной среды и генотип тестируемых растений. Наличие в составе среды ВЭКШ, независимо от его концентрации, стимулировало более интенсивный рост и развитие эксплантов у клона Тр березы карельской и клона Рт осины по сравнению с контролем. В то же время для клона 76 березы карельской и клона ч1 березы чернокорой не отмечали стимулирующего воздействия экстракта на рост и развитие эксплантов (табл.).

Для всех изученных генотипов отмечали, что добавление в среду с ВЭКШ антибиотика цефотаксима существенно стимулировало процесс роста побегов и корнеобразование. При этом такие показатели, как «средняя высота побегов» и «средняя масса 1 микрорастения», в 1,5–2,0 раза возросли либо оставались на уровне значений соответствующего варианта с ВЭКШ (табл.). Таким образом, в процессе исследования была установлена эффективность совместного использования ВЭКШ в концентрации 0,1–10 мл на 100 мл среды и антибиотика цефотаксима в концентрации 500 мг/л для индукции активного роста и развития узловых сегментов побегов тестируемых клонов березы и осины.

Для изучения регенерации на вычлененных листьях делали скальпелем насечки и помещали абаксильной (нижней) стороной на регенерационные среды, содержащие в контрольном варианте 2,0 мг/л БАП, а в опытных вариантах дополненные экстрактом и антибиотиком цефотаксимом в разных комбинациях. Спустя 30 дней культивирования первичные экспланты с новообразованиями для усиления процесса дифференциации переносили на безгормональную среду, на которой культивировали дополнительно 20 дней, после чего проводили оценку. Отмечены межклоновые различия по органогенной способности между клонами 76 и Тр березы карельской. Регенерационная активность клона 76 в опыте была выше, чем у клона Тр. На основании выполненных исследований установлена неоднозначная реакция листовых эксплантов тестируемых генотипов по регенерационным параметрам на присутствие в составе питательной среды ВЭКШ. У клона Рт осины отмечено повышение побегообразующей способности листьев при увеличении концентрации ВЭКШ в составе 100 мл среды с 0,1 до 1,0 и далее до 10 мл. У клона ч1 березы чернокорой и клона Тр березы карельской не установлено между изучаемыми параметрами такой четкой зависимости, как у осины. У клона ч1 березы чернокорой наблюдали во всех вариантах опыта однозначный морфогенный ответ листовых эксплантов на присутствие в составе среды ВЭКШ, независимо от его количественного содержания.

Таблица

**Влияние ВЭКШ и антибиотика цефотаксима на рост и развитие
1-почечных сегментов побегов**

Номер вари- анта опыта	Антибиотик, мг/л, наличие ВЭКШ в 100 мл среды, мл	Некроз, %	Ризогенез		Средняя высота побегов ($\bar{x} \pm S_x$), см	Средняя масса 1 растения, $г \times 10^{-3}$	Нали- чие инфек- ции, в баллах
			%	сте- пень разви- тия			
клон 76 березы карельской							
WPM, б/г (контроль)		0	100	1	2,2±0,2	21,5	1, 2
1	цм, 500	0	100	1	2,6±0,4	28,0	0
2	Э, 0,1	0	100	1	1,5±0,2**	15,4	0
3	Э, 0,1 + цм, 500	0	100	2, 3	5,8±0,6***	55,8	0
4	Э, 1,0	0	100	1	2,5±0,4	27,8	0
5	Э, 1,0 + цм, 500	0	100	2	4,2±0,5***	50,4	0
6	Э, 10	10,0	100	1	1,3±0,2***	10,5	0
7	Э, 10 + цм, 500	0	100	1, 2	3,2±0,5***	31,5	0
клон Тр березы карельской							
WPM, б/г (контроль)		100	0	—	0,8±0,1	8,0	1
1	цм, 500	0	100	1	4,5±0,6***	40,4	0
2	Э, 0,1	0	100	2, 1	3,6±0,5***	33,8	0
3	Э, 0,1 + цм, 500	0	100	2	6,0±0,8***	67,5	0
4	Э, 1,0	0	100	2, 1	3,8±0,5***	33,4	0
5	Э, 1,0 + цм, 500	0	100	1	5,5±0,7***	66,8	0
6	Э, 10	0	100	2	3,0±0,4***	26,7	0
7	Э, 10 + цм, 500	0	100	2	6,2±0,8***	53,0	0
клон ч1 березы чернокорой							
WPM, б/г (контроль)		0	100	1	4,0±0,5	22,0	1
1	цм, 500	0	100	2	4,2±0,5	25,0	0
2	Э, 0,1	0	100	1	1,9±0,2***	20,5	0
3	Э, 0,1 + цм, 500	0	100	1	3,5±0,5	41,0	0
4	Э, 1,0	0	100	1	1,6±0,2***	20,0	0
5	Э, 1,0 + цм, 500	0	100	1	3,2±0,4	30,6	0
6	Э, 10	0	0	—	1,1±0,1***	12,4	0
7	Э, 10 + цм, 500	0	100	1	2,0±0,3***	24,6	0
клон Рт осины							
WPM, б/г (контроль)		10,0	0	—	1,0±0,1	10,0	2
1	цм, 500	0	100	2	3,2±0,4***	40,5	0
2	Э, 0,1	0	100	1	1,5±0,1**	16,0	0
3	Э, 0,1 + цм, 500	0	100	2, 3	2,8±0,3***	27,8	0
4	Э, 1,0	0	100	2, 3	4,0±0,5***	46,3	0
5	Э, 1,0 + цм, 500	0	100	3	4,3±0,5***	50,1	0
6	Э, 10	0	100	1	1,8±0,2**	15,0	0
7	Э, 10 + цм, 500	0	100	2	4,3±0,5***	34,5	0

Примечание. цм – антибиотик цефотаксим, Э – ВЭКШ. Наличие инфекции в баллах: 0 – отсутствует, 1 – слабая, 2 – средняя, 3 – сильная. Степень развития корней: 0 – нет, 1 – слабая, 2 – средняя, 3 – сильная. *, **, *** – $P < 0,05; 0,01; 0,001$.

При исследовании действия ВЭКШ на процесс дифференциации органо-генных структур в культуре тканей березы в качестве эксплантов использовали сегменты междоузлий и листья. На вычлененных листьях делали скальпелем насечки и помещали абаксильной стороной на регенерационную среду, содержащую 2,0 мг/л БАП. Спустя 30 дней инкубирования первичные экспланты с новообразованиями для усиления процесса дифференциации переносили на безгормональную среду либо среды, дополненные 0,01 и 0,001 мл ВЭКШ на 100 мл среды, на которых культивировали дополнительно 20 дней. Установлено, что на сегментах междоузлий клона березы чернокорой одинаково хорошо и стабильно формируется каллусная ткань и регенерируют ад-

вентивные почки и побеги, независимо от концентрации ВЭКШ в среде, используемой для дифференциации. У обоих тестируемых генотипов березы наблюдали увеличение показателя «среднее число почек на экспланте» у листьев, культивированных во втором пассаже на среде, дополненной ВЭКШ в количестве 0,01 мл на 100 мл среды. Уменьшение значения исследуемого показателя отмечали в варианте опыта, когда 100 мл питательной среды содержали 0,001 мл ВЭКШ.

Закключение. Установлено, что применение питательной среды, в 100 мл которой содержится 10 мл ВЭКШ, способствует нормальному росту и развитию 1-почечных сегментов побегов березы и осины, характеризующихся исходной бактериальной контаминацией тканей. При использовании концентрации 15–20 мл ВЭКШ/100 мл среды отмечали, несмотря на отсутствие каких-либо негативных симптомов в развитии органов, снижение параметров роста побегов и формирования корней. Установлено бактериостатическое действие ВЭКШ в концентрации 10–20 мл на 100 мл среды. Выявлена эффективность совместного использования ВЭКШ в концентрации 0,1–10 мл на 100 мл среды и антибиотика цефотаксима в концентрации 500 мг/л для индукции активного роста и развития узловых сегментов побегов тестируемых клонов березы и осины.

Работа поддержана БрФФИ № Б09-154 от 15 апреля 2009 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Leifert, C.** Ecology of microbial saprophytes and pathogens in tissue culture and field-grown plants: reasons for contamination problems in vitro / C. Leifert [et al.] // Crit. Rev. Plant Sci. – 1994. – Vol. 13. – P. 139–182.
2. **Hennig, Frank.** Untersuchungen zur in vitro-Verklonung von systematisch bakteriell verseuchtem Pflanzenmaterial / Frank Hennig, Klaus Thomas Hänsch // Akad. Landwirtschaftswiss. DDR. – 1989. – № 281. – P. 153–159.
3. **Gilbert, J.E.** The use of antibiotics to eliminate latent bacterial contamination in potato tissue cultures / J.E. Gilbert [et al.] // Annals of Applied Biology. – 1991. – Vol. 119, № 1. – P. 113–120.
4. **Чиркин, А.А.** Антиоксидантная активность куколок китайского дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.) / А.А. Чиркин [и др.] // Ученые записки УО «ВГУ им. П.М. Машерова». – 2007. – Т. 6. – С. 248–265.
5. **Lloyd, G.** Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot-tip culture / G. Lloyd, B. McCown // Proc. Intl. Plant Prop. Soc. – 1980. – № 30. – P. 421–427.
6. **Murashige, T.** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol. Plant. – 1962. – Vol. 15, № 13. – P. 473–497.

S U M M A R Y

In experiments on tissue cultures of birch and aspen bacteriostatic effect of extract of oak silkworm pupae in a concentration of 10–20 ml per 100 ml medium is found. The effectiveness of sharing of the extract in a concentration 0,1–10 ml per 100 ml medium and tsefotaksim antibiotic at concentrations of 500 mg/ml for induction, growth and development of nodal segments of shoots tested clones of birch and aspen are revealed.

Поступила в редакцию 3.02.2009