

УДК 674.031.623.22:58.083

Р.В. Сергеев, А.И. Шургин

Марийский государственный технический университет

Сергеев Роман Владимирович родился в 1984 г., окончил в 2006 г. Марийский государственный университет, аспирант, работает в Ботаническом саду Марийского государственного технического университета. Имеет 7 печатных работ в области биотехнологии, физиологии растений.
E-mail: sergeyev_rv@mail.ru



Шургин Алексей Иванович родился в 1972 г., окончил в 1995 г. Марийский государственный технический университет, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии, декан факультета лесного хозяйства и экологии МарГТУ. Имеет 42 печатные работы в области оценки биологических ресурсов.
E-mail: ashurgin@pochta.ru



РАЗМНОЖЕНИЕ IN VITRO ГЕНОТИПОВ ИВЫ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ДЛЯ ПЛАНТАЦИОННОГО ВЫРАЩИВАНИЯ НА САЛИЦИН

Выявлены сочетания и концентрации фитогормонов в среде культивирования, направленные на разработку технологии микрклонального размножения высокопродуктивных по салицину генотипов ивы для создания промышленных плантаций.

Ключевые слова: ива, микроразмножение, in vitro, 6-бензиламинопурин, α -нафтилуксусная кислота.

В листьях, коре или почках большинства видов ивы (сем. *Salicaceae*, р. *Salix*) содержатся салицилаты, использующиеся сотни лет в качестве обезболивающих, противовоспалительных и жаропонижающих средств. Наиболее распространенный из них салицин (β -D-глюкопиранозид салицилового спирта) был первым фенольным глюкозидом, выделенным из ивы и найденным в природе. Интерес к натуральным препаратам из ивы повышается, потому что они, в отличие от синтетического аспирина, не дают побочного эффекта (раздражение и повреждение желудка) [5].

Но большинство из источников ивы, в настоящее время доступных для получения лекарственных препаратов, содержат менее 1 % активных компонентов. Поэтому возникает необходимость в исследованиях, направленных на селекцию и культивирование видов с повышенным содержанием салицилатов [7].

В целях получения салицилатов иву следует разводить на промышленных плантациях интенсивного типа с короткой ротацией 1 год, используя в качестве посадочного материала высокопродуктивные (по выходу салицилатов) сорта-клоны, обладающие устойчивостью к неблагоприятным факторам среды, болезням и вредителям.

Одним из преимуществ клонального микроразмножения растений по сравнению с традиционными методами является значительно более высокий коэффициент размножения [1]. Кроме того, эту работу можно проводить круглогодично, что позволяет получить большое число уже сформированных растений к сезону посадки при создании плантаций.

В сравнении с другими видами древесных растений публикаций по микроклональному размножению ивы немного. Бергманом изучено влияние биологически активных препаратов на микроразмножение клонов *Salix*, а также разработана технология этого метода для некоторых видов альпийских ив (*S. caprea* L.), в том числе для гибридов *S. caprea* × *S. viminalis* L. (= *S.* × *smithiana*) [8]. Ряд авторов указывают на сложности, возникающие при микрочеренковании и укоренении растений рода *Salix*, что связано, по их мнению, с влиянием генотипа [10]. Однако для некоторых видов и клонов ив разработаны высокоэффективные методы микроразмножения [3].

Растительный материал был собран нами в начале февраля с выделенной ранее модельной популяции ивы S-2. Содержание общего салицина в экстракте из коры отобранного генотипа составляло $7,4 \pm 0,2$ %. Обязательным условием клонального микроразмножения является использование объектов, сохраняющих генетическую стабильность на всех этапах процесса – от эксплантата до растений в поле. Этому условию удовлетворяют апексы и почки органов стеблевого происхождения [1]. Исходными эксплантатами служили почки с однолетних побегов модельных деревьев. В культуру *in vitro* были введены сегменты однолетних побегов длиной 5...10 мм.

В ходе предварительных исследований нами были выбраны три стерилизующих агента: гипохлорит Са и гипохлорит Na в составе двух коммерческих отбеливателей «Domestos» и «Белизна». Концентрации гипохлорита Са – 0 (контроль), 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 %; гипохлорита Na в обоих случаях – 0 (контроль), 5, 10, 15 и 20 %. Для каждой концентрации взяты по три экспозиции – 5, 10 и 15 мин.

Эффект влияния комбинации БАП и НУК на мультипликацию побегов и процесс корнеобразования в культуре ткани ивы

Концентрация БАП, мг/л	Концентрация НУК, мг/л	Число побегов на эксплантат	Средняя длина побега, мм	Число корней на эксплантат	Средняя длина корня, мм
0	0	1,00	21,20	0,20	40,00
	0,01	1,20	19,60	0,20	45,00
	0,05	1,00	12,67	0,50	16,00
	0,1	1,33	27,50	3,00	36,89
	0,2	1,00	29,60	3,20	33,63
0,1	0	1,20	18,80	0	–
	0,01	1,50	19,50	0	–
	0,05	1,25	13,75	0	–
	0,1	1,14	17,86	0	–
	0,2	1,00	11,50	0	–
0,5	0	1,50	14,50	0	–
	0,01	1,40	14,60	0	–
	0,05	1,33	14,67	0	–

	0,1	1,00	13,80	0	–
	0,2	1,00	15,30	0	–
1,0	0	1,33	15,67	0,33	35,00
	0,01	1,80	10,80	0	–
	0,05	2,00	9,00	0	–
	0,1	1,80	16,00	0	–
	0,2	1,17	13,30	0	–
2,0	0	1,60	12,00	0	–
	0,01	1,20	13,40	0	–
	0,05	1,20	12,75	0	–
	0,1	1,33	11,67	0	–
	0,2	1,00	11,86	0	–

Отобранные побеги предварительно при помощи щетки промывали мыльным раствором и споласкивали дистиллированной водой, затем помещали на 30 с в 70 %-й этанол. Далее растительный материал переносили в стерилизующий раствор на 5, 10 и 15 мин в зависимости от варианта, отмывали три раза в стерильной дистиллированной воде, скальпелем удаляли концы с убитыми клетками и помещали на питательную среду MS [9]. Концентрация сахарозы в среде составляла 30, агар-агара – 6, активированного угля – 1 г/л. Образцы контроля помещали в стерильную дистиллированную воду на 5, 10 или 15 мин.

Растворы готовили непосредственно перед работой в условиях ламинар-бокса. Гипохлорит Na отмеряли мерным цилиндром и разводили стерильной дистиллированной водой, в ней же растворяли навески гипохлорита Ca (Acros Organics). Всего заложено 45 вариантов по 30 эксплантатов на каждый, повторность трехкратная.

На следующем этапе исследовали влияние различных концентраций бензиламинопурина (БАП) и нафтилуксусной кислоты (НУК) на рост и развитие эксплантатов S-2 (среда MS, сахароза – 30, агар-агар – 6 г/л). Культивирование проводили при 21 °С, освещенности 1800 лк, фотопериоде 16/8. Заложено по 10 эксплантатов на вариант, повторность трехкратная.

В ходе исследований получены следующие результаты.

Стерилизация побегов. Учет опыта проводили через 10 дн. Исследования показали, что при использовании Domestos процент стерильных эксплантатов составлял 67,78...100,00 стерильных морфогенных – 65,56...94,44 (максимальный в варианте 10 %, экспозиция 10 мин). При стерилизации белизной наблюдали 36,67...96,67 % стерильных эксплантатов ивы, 33,33...73,33 % стерильных морфогенных (максимум в варианте 10 %, экспозиция 15 мин). Обработка гипохлоритом Ca в концентрации 2 % в течение 10...15 мин позволила получить 94,44 % стерильных культур, однако их морфогенность снизилась до 28,89...21,11 %. Наилучшие результаты получены при концентрации раствора 1,5 %, экспозиции 10 и 15 мин (77,78 и 78,89 % соответственно).

Пролиферация побегов. На среде MS без регуляторов роста спустя 5 нед культивирования образовался только один побег средней дли-

ной 21,2 мм. Кроме того, у каждого пятого эксплантата появились корни средней длиной 40 мм. Добавление в среду 0,01 мг/л НУК стимулировало лишь интенсивность роста корней, но не увеличение их числа. При добавлении БАП возрастало число побегов на одном эксплантате, но с увеличением концентрации уменьшалась их средняя длина.

Для того чтобы индуцировать пролиферацию побегов из стерильных эксплантатов *in vitro*, был поставлен эксперимент, в котором протестированы по четыре концентрации БАП (0,1; 0,5; 1,0 и 2,0 мг/л) и НУК (0,01; 0,05; 0,1 и 0,2 мг/л) как по отдельности, так и в различных комбинациях. Общая схема эксперимента представлена в таблице. В среде без НУК оптимальная концентрация БАП составляла 2,0 мг/л. В то же время на трех вариантах сред культивирования, где сочетание регуляторов роста было 1,0 мг/л БАП + 0,01 мг/л НУК; 1,0 мг/л БАП + 0,05 мг/л НУК; 1,0 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК, наблюдалось более интенсивное побегообразование. Однако в последнем варианте длина побегов была значительно больше (16,0 мм), чем в двух предыдущих (10,8 и 9,0 мм).

Увеличение концентрации НУК в среде стимулировало образование корней. Так, при добавлении 0,1 и 0,2 мг/л НУК на эксплантатах образовывалось в среднем в 3 с лишним раза больше корней длиной 36,89 и 33,63 мм соответственно. Однако корнеобразование происходило не на всех вариантах сред, где присутствовала НУК, а лишь там, где не был добавлен БАП (кроме варианта БАП 1,0 мг/л без НУК). В варианте 0,2 мг/л НУК без БАП на главном корне образовалось много боковых корней, тогда как на других вариантах их практически не было.

Средняя длина побегов в эксперименте составила 15,65 мм. Но в вариантах, где концентрация БАП была равна нулю, а НУК 0,1 и 0,2 мг/л, она равнялась 27,5 и 29,6 мм соответственно.

На всех вариантах сред наблюдалось незначительное каллусирование базальных частей эксплантатов, за исключением сред 0,1 мг/л БАП без НУК; 0,1 мг/л БАП + 0,01 мг/л НУК и 0,2 мг/л НУК без БАП. Для микроклонального размножения растений нежелательны побеги, возникшие из каллусной ткани, так как в процессе длительного культивирования каллуса клетки в нем становятся генетически нестабильными [6].

Таким образом, споры микроорганизмов, находящиеся в состоянии покоя на поверхности эксплантата, устойчивы к большинству дезинфектантов. Наличие загрязнений свидетельствует о неэффективности применяемого метода поверхностной стерилизации. Выживание микроорганизмов зависит от типа используемого эксплантата, типа дезинфектанта и (или) времени обработки. В эксплантатах и полученных из них культурах могут проявляться инфекционные примеси, находившиеся внутри растения. В некоторых случаях бактерии могут не выявляться в течение нескольких пересадок. При этом значительно снижается частота делений клеток и другие параметры роста культуры [4].

На начальных этапах работы была выявлена высокая обсемененность растений различными микроорганизмами (бактерии и грибы).

В связи с этим возникла необходимость в подборе оптимального режима стерилизации эксплантатов на этапе введения в асептическую культуру ткани, а именно стерилизующего вещества, концентрации и экспозиции, при которых погибали бы патогенные микроорганизмы, а растения сохраняли морфогенную способность. Анализ стерилизации эксплантатов ивы S-2 показал, что наиболее эффективным веществом является коммерческий препарат Domestos (гипохлорит Na). При использовании его раствора в концентрации 10 % с экспозицией 10 мин число стерильных морфогенных эксплантатов достигает 94,44 %.

На каждом этапе развития того или иного органа (ткани) в нем должна поддерживаться определенная концентрация гормонов [2]. На этапе субкультивирования быстрое размножение эксплантата или трансплантата в течение длительного периода времени обеспечивается оптимальным соотношением и концентрацией внесенных в питательную среду стимуляторов роста. Наиболее интенсивное формирование новых побегов у ивы (S-2) наблюдалось на среде MS при добавлении 1,0 мг/л БАП в сочетании с НУК в концентрации 0,01 и 0,1 мг/л. Корнеобразование может быть стимулировано внесением НУК в концентрации 0,1 и 0,2 мг/л.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко, P.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнология на их основе [Текст] / P.Г. Бутенко. – М., 1999.
2. Кузнецов, В.В. Физиология растений [Текст] / В.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. – М., 2005.
3. Agrawal, D.C. Rapid micropropagation of hybrid willow (*Salix*) established by ovary culture [Text] / D.C. Agrawal, K. Gebhardt // *Plant Physiology*. – 1994. – Vol. 143. – P. 763–765.
4. Anderson, W.C. Proceedings of the Conference on Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture – Applications and Feasibility [Text] / ed. R.H. Zimmerman, USDA, SEA, AR. – Beltsville, 1980. – P. 1.
5. Chrubasik, S. Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study [Text] / S. Chrubasik, E. Eisenberg, E. Balan // *American Journ. of Medicine*. – 2000. – Vol. 109. – P. 9–14.
6. D'Amato, F. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants [Text] / F. D'Amato // *Frontiers of Plant of Plant Tissue Culture 1978* / ed. T.A. Thorpe. – Calgary: The International Association for Plant Tissue Culture, 1978. – P. 287 – 295.
7. Julkunen-Tiitto, R. Variation in growth and secondary phenolics among field cultivated clones of *Salix myrsinifolia* [Text] / R. Julkunen-Tiitto, B. Meier // *Planta Medica*. – 1992. – Vol. 258. – P. 77–80.
8. Liesebach, M. Approaches on vegetative propagation of difficult-to-root *Salix caprea* [Text] / M. Liesebach, G. Naujoks // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. – 2004. – N 79. – P. 239–247.
9. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures [Text] / T. Murashige, F. Skoog // *Physiol. Plant*. – 1962. – N 15. – P. 473–497.

10. Neuner, H. In vitro propagation of *Salix caprea* L. by single node explants [Text] / H. Neuner, R. Beiderbeck // *Silvae Genet.* – 1993. – Vol. 42. – P. 308–310.

Поступила 03.02.09

R.V. Sergeev, A.I. Shurgin
Mari State Technical University

Reproduction in Vitro of Willow Genotypes with High Content of Bioactive Substances for Plantation Growing on Salicin

The combinations and concentrations of phytohormones are revealed in the cultivating medium, directed towards the development of microclonal reproduction technology for in-salicin highly-productive willow genotypes to create industrial plantations.

Keywords: willow, microreproduction, in vitro, 6-benzylaminopyrine, α -naphthylacetic acid.
