

УДК 674.031.681.81:57.086.833.4

Р. В. Сергеев, А. И. Шургин

## ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МИНЕРАЛЬНОГО И ГОРМОНАЛЬНОГО СОСТАВА СРЕДЫ НА РАЗМНОЖЕНИЕ *IN VITRO* ГЕНОТИПОВ ИВЫ С ПОВЫШЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Разработана технология микроклонального размножения высокопродуктивных по салицину генотипов ивы с целью создания промышленных плантаций. Содержание общего салицина в экстракте коры отобранных генотипов составляло  $7,4 \pm 0,2$  %. В ходе исследования было изучено влияние сред DKW, GD, WPM, MS на морфогенез растений *Salix* в культуре *in vitro*. Экспериментально установлено, что кинетин является более эффективным при микроклональном размножении *Salix acutifolia* Willd. чем 2iP и BAP.

**Ключевые слова:** *Salix*, микроразмножение, *in vitro*, 6-бензиламинопурин (BAP), 2-изопентениладенин (2iP), кинетин (Kn), α-нафтилуксусная кислота (NAA).

**Введение.** В последние десятилетия интерес к лекарственным средствам растительного происхождения увеличивается, что объясняется ростом аллергических реакций на прием лекарственных препаратов с искусственно созданной структурой. В связи с увеличением спроса на лекарственные препараты биологического происхождения возникает необходимость создания промышленных плантаций высокопродуктивных растений. Большинство видов ивы (*Salicaceae*, *Salix*) содержат в листьях, коре или почках производные салицилового спирта, салицилаты. Лекарственные препараты, получаемые из растений *Salix*, содержат салицин (2-гидроксиметил-фенил-β-D-глюкопиранозид) и его производные: фрагилин, саликортин, 2'-о-ацетилсаликортин, тремулацин, салирепозид и др. [1]. Салицилаты используются сотни лет в качестве обезболивающих, противовоспалительных и жаропонижающих средств. Интерес к натуральным препаратам из ивы как альтернативе аспирина, синтетического аналога, повышается, потому что салицилаты ивы не обладают побочным эффектом (раздражение и повреждение желудка), характерным для аспирина [2]. Но большинство из источников ивы, в настоящее время доступных для получения лекарственных препаратов, содержат менее 1 % активных компонентов. Поэтому представляют большой интерес исследования, селекция и культивирование видов ивы с повышенным содержанием салицилатов [3].

В связи с этим возникает необходимость разведения ивы с целью получения салицилатов путем создания промышленных плантаций интенсивного типа с короткой ротацией один год при использовании в качестве посадочного материала высокопродуктивных (по выходу салицилатов) сортов-клонов, обладающих устойчивостью к

неблагоприятным факторам среды, болезням и вредителям.

В сравнении с работами по другим видам древесных растений, по микроклональному размножению растений рода *Salix* опубликованных исследований немного. Л. Бергманом изучено влияние ВАР на микроразмножение клонов *Salix*, а также разработана технология микроклонального размножения для некоторых видов альпийских ив (*S. caprea* L.), в том числе для гибридов *S. caprea* × *S. viminalis* L. (= *S. × smithiana*) [4]. Ряд авторов указывает на сложности, возникающие при микрочеренковании и укоренении растений *Salix*, что связано, по их мнению, с влиянием генотипа [5, 6]. Однако для некоторых видов и клонов ив разработаны высокоэффективные методы микроразмножения [7].

**Целью** данного исследования являлась разработка этапов микроклонального размножения *S. acutifolia* как источника ценных биологически активных веществ (БАВ). В **задачи** работы входила оценка влияния факторов минерального и гормонального состава питательных сред на стадиях пролиферации и укоренения побегов *Salix*.

**Объекты, материалы и методы.** В качестве объекта исследований использовали растительный материал ивы, отобранный с деревьев модельных популяций (Нижегородская, Кировская области, Республика Марий Эл). Эксперименты проводились с использованием апикальных и пазушных почек *in vitro*. В культуру *in vitro* вводился материал с однолетних побегов полевых растений. Последующий анализ накопления БАВ осуществлялся на полученных растениях-регенерантах. Растительный материал был собран в начале февраля с отобранной ранее по содержанию салицина модельной популяции ивы (Нижегородская, Кировская области, Республика Марий Эл). Содержание общего салицина в экстракте из коры отобранного генотипа составляло  $7,4 \pm 0,2$  %. В качестве первичных эксплантов были выбраны почки с однолетних побегов модельных деревьев. Введение *S. acutifolia* в культуру *in vitro* проводили путем стерилизации молодых пазушных и апикальных почек. Нарезанные черенки длиной 15–20 см, у которых предварительно были удалены листья, помещали в пластиковые пакеты. Число почек на каждом черенке варьировало от 8 до 14. Пакеты тщательно запечатывали во избежание потери влажности. До проведения опыта пакеты хранились в темноте при температуре + 4 °С. Отобранные побеги предварительно промывали мыльным раствором с щёткой и споласкивали дистиллированной водой. Черенки нарезали скальпелем на небольшие сегменты (5–10 мм) с почками, затем очищали от наружных почечных чешуй. После этого черенки замачивали в водном растворе моющего средства Fairy и помещали на магнитную мешалку на 15–20 минут. На следующем этапе сегменты растения промывали под проточной водой в течение 30–40 минут.

Все дальнейшие манипуляции с образцами проводили в ламинар-боксе. Далее эти сегменты помещали на 30–40 секунд в 70 % этанол, после чего переносили в стерилизующий раствор гипохлорита Na, в составе 10 % коммерческого отбеливателя Domestos, на 10 минут. После этого экспланты отмывали три раза в стерильной дистиллированной воде, удаляли концы, где клетки убиты, стерильным скальпелем и помещали на питательную среду MS (Murashige and Skoog's medium) [8]. Концентрация сахара в среде составляла 30 г/л, агар-агара 6 г/л.

В ходе исследования было изучено влияние 25 различных сочетаний концентраций бензиламинопурина (ВАР 0,0;0,1;0,5;1,0;2,0 мг/л) и нафтилуксусной кислоты (NAA 0,0;0,01;0,05;0,1;0,2 мг/л) на рост и развитие эксплантов *S. acutifolia* (среда MS, сахара 30 г/л, агар-агар 6 г/л). Культивирование проводили при 21 °С, освещенности 1800 Люкс, фотопериоде 16/8. Было заложено по 10 эксплантов на вариант, повторность трёхкратная. Исследование показало, что наиболее интенсивное формирование новых

побегов у изучаемого генотипа ивы происходило на среде MS при добавлении 1,0 мг/л ВАР в сочетании с NAA в концентрации 0,01 и 0,1 мг/л, а процесс образования корней на среде MS, дополненной 0,1 и 0,2 мг/л NAA в концентрации [9]. Стимулирующий эффект низких концентраций бензиладенина ( $5 \cdot 10^{-7}$  М,  $10^{-6}$  М) на удлинение побегов из пазушных почек был показан в работе L. Bergman [4], однако образования адвентивных почек авторы не наблюдали. DC. Agrawal [7] при культивировании гибридной ивы (*S. fragilis* × *S. lispoclados*) на среде с добавлением 0,2 мг/л бензиладенина получили коэффициент размножения на уровне 5–8 после третьего субкультивирования.

Для изучения влияния минерального состава основных сред на морфогенез *S. acutifolia* в культуре *in vitro* были протестированы среды DKW [10], GD [11], MS [8], WPM [12]. В ходе проведённого исследования микрочеренки длиной 1,2–1,5 см по десять штук были высажены в культуральные сосуды с четырьмя исследуемыми средами. Каждая среда была дополнена 1,0 мг/л ВАР, 0,1 мг/л NAA и содержала 3 % сахарозы, агар-агар в концентрации 6 г/л. Повторность трёхкратная. Культивирование проводили при 21 °С, освещённости 1800 Люкс, фотопериоде 16/8. Статистический анализ проводили методами дисперсионного анализа.

Для изучения влияния цитокининов на морфогенетическую способность эксплантов *S. acutifolia* было проведено сравнение гомогенеза на средах, дополненных Кп, ВАР и 2iP. В качестве основной использовали MS-среду, содержащую 0,1 мг/л NAA, 3 % сахарозы и 0,6 % агар-агара. Сегменты побегов длиной 1,2–1,5 см помещали в культуральные сосуды по 21 экспланту на вариант, повторность трёхкратная.

Оценка влияния минерального состава среды на ризогенез эксплантов *S. acutifolia* *in vitro* проводилась на четырёх исследуемых средах DKW, GD, WPM, MS. В культуральные сосуды сажали по 10 эксплантов. Каждая среда содержала 3 % сахарозы, 0,6 % агар-агара и 0,2 мг/л NAA. В качестве контроля была выбрана среда MS, дополненная 0,2 мг/л NAA. Повторность трёхкратная. Культивирование проводили при 21 °С, освещённости 1800 Люкс, фотопериоде 16/8.

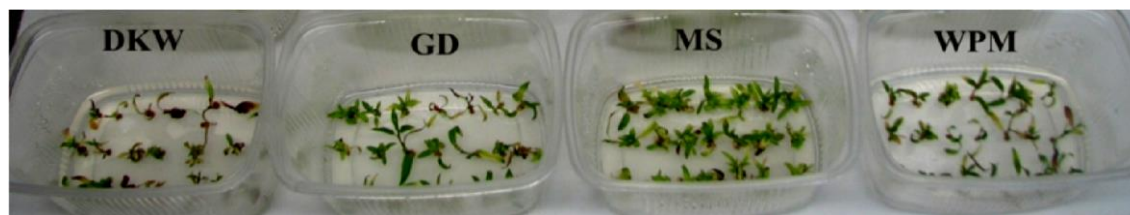
### Результаты.

**Стерилизация эксплантов.** Предварительные исследования показали, что при использовании в качестве стерилизующего агента 0,5 % раствора гипохлорита Na (Domestos) в

Таблица 1

Влияние минеральных солей на количественное формирование побегов

	∑ квадратов SS	N степеней свободы df	Средний квадрат mS	F фактический	F табличный при уровне значимости		
					0,05	0,01	0,001
SS0=	2,198	11					
SS1=	1,41	3	0,47	4,76	3,8	7	14,4
SS2=	0,79	8	0,098				

Рис. 1. Морфогенез *S. acutifolia* на средах разного минерального состава

течение 10 минут достигается максимальное число стерильных морфогенных эксплантов *S. acutifolia* 94,44 %.

*Микроразмножение.*

*Основная среда.* В ходе эксперимента по изучению влияния минеральных солей на морфогенез *in vitro* эксплантов *S. acutifolia* было отмечено, что исследуемые варианты питательных сред имеют существенное отличие по своей регенерационной активности на гомогенез (табл. 1, рис. 1).

Наибольшее число образовавшихся побегов и почек на эксплант (2,9 и 2,8) наблюдалось на средах MS и DKW соответственно, в то же время на среде WPM этот показатель составил лишь два побега на эксплант. Таким образом, формирование новых почек происходило на среде MS на 43 % более эффективно, чем на WPM, а на средах DKW и GD на 39 и 19 % соответственно.

Таблица 2

Влияние минеральных солей на рост побегов *S. Acutifolia*

	∑ квадратов SS	N степеней свободы df	Средний квадрат mS	F фактический	F табличный при уровне значимости		
					0,05	0,01	0,001
SS0=	185,98	11,00					
SS1=	139,48	3,00	46,49	8,00	3,80	7,00	14,40
SS2=	46,49	8,00	5,81				



Рис.2. Образование адвентивных почек эксплантами *S. acutifolia*

Проведённый эксперимент показал, что исследуемые среды существенно отличаются друг от друга по влиянию на рост побегов *S. acutifolia* в культуре *in vitro* (табл. 2). При оценке параметров роста эксплантов лучшие результаты наблюдали на среде MS, длина побегов на этом варианте была больше, чем на среде GD на 46 %. Среда DKW и WPM по данному показателю практически не отличались (меньше чем на WPM на 26,8 и 24,7 % соответственно). На среде GD происходило формирование укороченных побегов.

*Цитокинины.* На 14–16 сутки культивирования на базальной части эксплантов образовывались утолщения в виде разросшихся тканей, на которых впоследствии формировались адвентивные почки (рис. 2).

В ходе исследования было выявлено существенное различие исследуемых вариантов питательных сред, дополненных цитокининами Кп, BAP, 2iP, по интенсивности гомогенеза *S. acutifolia* в культуре *in vitro* (табл. 3).

Таблица 3

Дисперсионный анализ интенсивности гомогенеза на средах с исследуемыми цитокининами

	∑ квадратов SS	N степеней свободы df	Средний квадрат mS	F фактический	F табличный при уровне значимости		
					0,05	0,01	0,001
SS0=	4280,2	8,0					
SS1=	4203,6	2,0	2101,8	164,5	5,1	10,9	27,0
SS2=	76,7	6,0	12,8				

Наибольшее число вновь образованных почек (в среднем 4,2 шт./эксплант) было зафиксировано на среде с Кп, что в свою очередь на 50 % эффективнее контроля. Одноадвентивных почек эксплан- временно с этим вновь образованные побеги были более сформированными, чем на двух других исследуемых средах. На среде с 2iP новых почек образовывалось на 10 % меньше, чем в контроле (1,9 шт./эксплант) (рис. 3).

В то же время Sant S. Bhojwani в своей статье [13] отмечает, что в культуре *in vitro* гибридной *Salix* ВАР индуцирует три морфологических процесса, а именно каллусирование базальной части, супрессирование корнеобразования и пролиферацию побегов. Кп вызывает каллусирование экспланта (в диапазоне концентраций 0,1 – 1,0 мг/л), но только высокие концентрации гормона ингибируют ризогенез и индуцируют гемогенез.

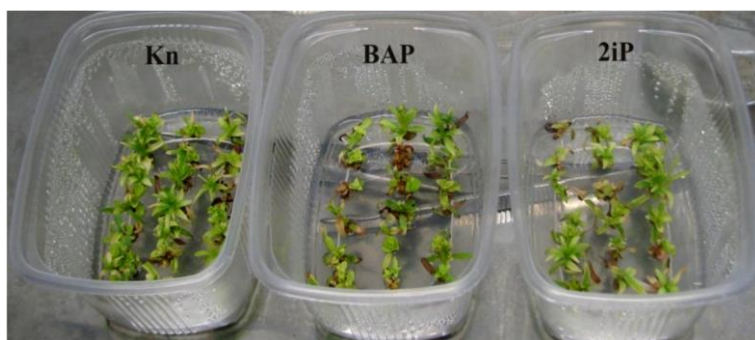


Рис.3. Морфогенез растений *Salix* на средах с цитокининами Кп, ВАР, 2iP

**Ризогенез.** После восьми недель культивирования на средах DKW, GD, WPM, MS интенсивность ризогенеза оценивали по следующим критериям: среднее число укоренившихся побегов (табл. 4), среднее число корней на один эксплант (табл. 5), средняя длина одного корня (табл. 6).

Таблица 4

Среднее значение укоренившихся растений *Salix acutifolia*

Время, неделя	Среда			
	DKW	GD	MS	WPM
2	34,8	32,8	26,5	57,4
3	45,2	45	41	54,1
5	67,2	49,7	55	75,6
8	65,3	76,7	96,7	92,6
2	34,8	32,8	26,5	57,4

Таблица 5

Среднее число корней на один эксплант (в шт.)

Время, неделя	Среда			
	DKW	GD	MS	WPM
2	0,7	0,7	0,3	1,1
3	0,9	1,1	0,5	1,1
5	1,4	1,3	1,9	2,4
8	1,3	1,6	2,3	2,9
2	0,7	0,7	0,3	1,1

На величину среднего значения укоренившихся растений влияние среды начинает сказываться с восьмой недели культивирования. Так, на 2, 3 и 5 неделях культивирования фактическое значение критерия Фишера, рассчитанное методом дисперсионного анализа, варьирует от 0,37 до 2,3 при табличном значении 4,2, что свидетельствует об отсутствии влияния среды на укоренение при 5 % уровне значимости. На восьмой неделе эксперимента влияние среды на процент укоренившихся растений достоверно на 1 % уровне значимости ( $F_{\text{факт.}} = 8,5$  при  $F_{\text{табл.},0,01} = 7,85$ ).

Лучший результат укоренения эксплантов *S. acutifolia* был получен на среде MS – 96,7 %, несколько меньше укоренившихся растений на среде WPM – 92,6 %, в то время

Таблица 6

Среднее значение укоренившихся растений *Salix acutifolia*

Время, неделя	Среда			
	DKW	GD	MS	WPM
2	4,7	5,3	7,3	5,3
3	8,2	7,1	10,1	12,1
5	11,5	10,5	15,8	18,2
8	12,4	12,1	17,4	18,7
2	4,7	5,3	7,3	5,3

корней на эксплант при 5% уровне значимости. Однако на восьмой неделе эксперимента влияние среды достоверно на 1 % уровне значимости ( $F_{\text{факт.}} = 6,1$ ,  $F_{\text{табл.}0,01} = 7,85$ ).

Рис. 4. Ризогенез *S. acutifolia* в культуре *in vitro*

среде MS, на 26 %.

После трёх недель культивирования средняя длина корней на исследуемых средах не имела достоверного отличия. Через восемь недель культивирования минимальная средняя длина корней наблюдалась на среде GD (12,1 шт./эксплант), что меньше, чем в контроле, на 30,5 %. Также неудовлетворительные результаты были получены на среде DKW (12,4 шт./эксплант), средняя длина корней была на 28,7 % меньше, чем на MS. Максимальная средняя длина корней в эксперименте составила 18,7 мм на среде WPM, превысив контроль на 7,5 % (см. табл. 6).

Рис. 5. Растение *S. acutifolia* через 10 недель после высадки в субстрат

В результате исследования было установлено достоверное отличие сред DKW, GD, MS и WPM по средней длине корня (рис. 4).

После того как растения *S. acutifolia* образовали корни, в условиях *in vitro* их вынимали из культуральных сосудов и адаптировали в почвенный субстрат. В качестве субстрата использовали торфяные таблетки «Jiffy-7» диаметром 37 мм. Неделю спустя из субстрата начали появляться корни, а еще через две недели полученные растения были высажены в горшки с почвосмесью. Дальнейшее доращивание проводили в условиях открытого грунта.

**Выводы.** Исследования показали, что изучаемые среды существенно отличаются друг от друга по изучаемым характеристикам. При оценке параметров роста и развития побегов лучшие результаты были достигнуты на среде MS.

В ходе исследования было выявлено существенное различие

как на средах DKW и GD укорененных побегов было получено на 20 % меньше (табл.4).

При оценке среднего количества корней, образовавшихся на одном экспланте, также было отмечено, что влияние среды начинает сказываться с восьмой недели культивирования. На 2, 3 и 5 неделях культивирования фактическое значение критерия Фишера, рассчитанное методом дисперсионного анализа, варьирует от 0,92 до 2,9 при табличном значении 4,2, что свидетельствует об отсутствии влияния фактора среды на значение среднего числа

Экспланты на среде DKW образовывали корней на 43,5 % меньше, чем на среде MS (2,3 шт./эксплант – контроль), в то же время на среде GD среднее число корней на один эксплант составило 1,6, что также меньше, чем в контроле, на 30,4 % (табл. 5). Лучшие результаты были получены на среде WPM – 2,9 шт./эксплант, что больше, чем на

исследуемых вариантов питательных сред, дополненных цитокининами Кн, ВАР, 2iP, по интенсивности гомогениза *S. acutifolia* в культуре *in vitro*. Исследование показало, что использование Кн для мультипликации побегов *S. acutifolia* более эффективно, чем ВАР или 2iP.

На основании полученных результатов совокупности исследуемых параметров укоренения *in vitro* экплантов *S. acutifolia* было установлено достоверное отличие влияния минеральных солей среды культивирования на процессы ризогенеза, начиная с восьмой недели культивирования. Экспериментально установлено, что результаты, полученные на среде WPM, как правило, на 10–20 % лучше результатов, достигнутых на других исследованных средах.

#### Список литературы

1. Wagner, H. Plant drug analysis / H. Wagner, S. Bladt. – New York: Springer, 2001. – 384 p.
2. Chrubasik, S. Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized doubleblind study / S. Chrubasik, E. Eisenberg, E. Balan // American Journal of Medicine. – 2000. – V. 109. – P. 9–14.
3. Julkunen-Tiitto, R. Variation in growth and secondary phenolics among field cultivated clones of *Salix myrsinifolia* / R. Julkunen-Tiitto, B. Meier // Planta Medica. – 1992. – V. 258. – P. 77–80.
4. Bergman, L. Effects of N6-benzyladenine on shoots of five willow clones (*Salix* spp.) cultured *in vitro* / L. Bergman, S. von Arnold, T. Eriksson // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 1985. – V. 4. – P. 135–144.
5. Liesebach, M. Approaches on vegetative propagation of difficult-to-root *Salix caprea* / M. Liesebach, G. Naujoks // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. – 2004. – N 79. – P. 239–247.
6. Neuner, H. *In vitro* propagation of *Salix caprea* L. by single node explants / H. Neuner, R. Beiderbeck // Silvae Genet. – 1993. – V. 42. – P. 308–310.
7. Agrawal, DC. Rapid micropropagation of hybrid willow (*Salix*) established by ovary culture / DC. Agrawal, K. Gebhardt // Plant Physiology. – 1994. – V. 143. – P. 763–765.
8. Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiologia Plantarum. – 1962. – N. 15. – P. 473–497.
9. Сергеев, П. В. Размножение *in vitro* генотипов ивы с повышенным содержанием биологически активных веществ для плантационного выращивания на салицин / П. В. Сергеев, А. И. Шургин // Лесной журнал. – 2009. – № 6. – С. 40–45.
10. Driver, J. A. *In vitro* propagation of paradox walnut rootstock / J. A. Driver, A. H. Kuniyuki // Hortscience. – 1984. – V. 19. – P. 507–509.
11. Gresshoff, P. M. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato) / P. M. Gresshoff, C. H. Doy // Planta. – 1972. – V. 107. – P. 161–170.
12. Lloyd, G. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia* by use of shoot tip culture / G. Lloyd, B. H. McCown // Proceeding of the International Plant Propagators Society. – 1980. – V. 30. – P. 421–427.
13. Bhojwani Sant, S. Micropropagation method for a hybrid willow (*Salix matsudana x alba* NZ-1002) / Sant S. Bhojwani // New Zealand Journal of Botany. – 1980. – Vol. 18. – P. 209–214.

Статья поступила в редакцию 10.06.10.

R. V. Sergeev, A. I. Shurgin

#### STUDY OF MINERAL AND HORMONAL MEDIUM COMPOSITION INFLUENCE TO PROPAGATION IN VITRO WILLOW GENOTYPES WITH HIGH CONCENTRATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

*Technology of microclonal propagation of highly productive in salicin willow genotypes with a view to create industrial plantations is developed. A total amount of salicin contained in the bark extract of selected genotypes was  $7,4 \pm 0,2$  %. As a part of study DKW, GD, WPM, MS mediums influence on morphogenesis of the plants *Salix* in the culture *in vitro* was tested. It was experimentally found out that kinetin is more effective when a microclonal propagation *Salix acutifolia* Willd., than 2iP and BAP.*

**Key words:** *Salix, micropropagation, in vitro, 6-benzylaminopurine, isopenteliladenin 2iP, kinetin (Kn),  $\alpha$ -naphthylacetic acid.*

---

СЕРГЕЕВ Роман Владимирович – аспирант кафедры лесных культур и механизации лесохозяйственных работ МарГТУ. Область научных интересов: биотехнология, культура растительной ткани, физиология растений. Автор 17 публикаций. E-mail: rsergeev@yahoo.com

ШУРГИН Алексей Иванович – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесной селекции, недревесных ресурсов и биотехнологии МарГТУ. Область научных интересов – биологические ресурсы. Автор 45 публикаций. E-mail: ashurgin@pochta.ru