

УДК 631.147+631.526.3+631.527

Редакционная коллегия:

академик НАН Беларуси В.Н. Решетников (отв. редактор), д.б.н. В.В. Титок (отв. редактор), к.б.н. Е.В. Спиридович, к.б.н. Т.И. Фоменко, к.б.н. А.А. Кузовкова

Биотехнологические приемы в сохранении биоразнообразия и селекции растений: материалы международной научной конференции 18–20 августа 2014 г., Минск. — Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2014.—277 с.

В сборник вошли материалы Международной научной конференции, посвященной актуальным проблемам сохранения биоразнообразия, селекции растений с использованием биотехнологических приемов, представленные учеными Беларуси, России, Украины, Казахстана, Сербии, Литвы, Молдовы, Таджикистана и Узбекистана.

УДК 631.147+631.526.3+631.527

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси», 2014 г.

РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДЕПОНИРОВАНИЯ НАПЕРСТЯНКИ ПУРПУРНОЙ *DIGITALIS PURPUREA L.*

Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г.

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»,
Минск

e-mail: fomenko_ti@mail.ru

Ключевые слова: коллекция in vitro, культура ткани, наперстянка, депонирование

Введение. При решении проблемы сохранения генофонда растений успешно используются методы биотехнологии растений, включающие микрклональное размножение растений *in vitro*. В настоящее время в ботанических садах мира созданы банки культур растений *in vitro*, дающие возможность длительного хранения генофонда редких и полезных растений. Обычно сохраняются только определенные виды растений или отдельные их представители. Все это делает необходимым создание новых способов для сохранения разнообразия генофонда растительных и животных организмов, а также человека, например коллекции семян растений и сохранение генофонда в условиях *in vitro*. Данный приём подразумевает использование коллекций: каллусных культур растений, а также растений в пробирках и суспензионных культурах. Разработка методов культивирования клеток и тканей в условиях *in vitro* позволила использовать их для сохранения генофонда различных растительных объектов. Используются различные методические подходы для сохранения растений в условиях *in vitro*. В одних случаях хранение культур осуществляется без нарушения процесса роста, в других при замедлении (депонирование) или при полной остановке роста (криосохранение). Первый способ является достаточно трудоемким и значительно удорожает содержание коллекции, так как связан с частой пересадкой растительного материала. Криоконсервация – это еще более трудоемкий и дорогой метод, требующий специального дорогостоящего оборудования. В настоящее время разработаны методы так называемого «депонирования» коллекций, которые позволяют существенно удлинить период между пересадками культур. Это связано с тем, что периодическое субкультивирование клеточных культур растений трудоемко и требует значительных затрат, как на выполнение работ, так и на приготовление питательных сред для культивирования. В наших условиях для поддержания коллекции стерильных культур наиболее приемлемым является депонирование, т.е. возможность удлинения периода между пересадками объектов. Замедление роста культур в условиях *in vitro* можно достигнуть разными методами: культивированием растений при пониженных температурах; добавлением в культуральные среды гормональных и осмотических ингибиторов.

Культивирование растений при пониженных температурах (1-10⁰С) способствует замедленному росту растений и более продолжительным периодом между пересадками (до 6-24 месяцев). В зависимости от холодостойкости растений определяется температура культивирования. Способ хранения живых тканей при пониженных температурах не имеет негативных последствий для растений-регенерантов и даже способствует их более интенсивному росту после переноса в нормальные условия.

Результаты и обсуждение. При подборе условий депонирования наперстянки было изучено влияние пониженных температур на развитие *Digitalis purpurea L.* в условиях *in vitro*. Так как наперстянка относительно теплолюбивое растение, депонирование проводили при температуре +8-10⁰С и пониженной освещенности. Черенки наперстянки культивировались на среде для укоренения, основой которой является среда В5, содержащая 0,1 мл/л α- НУК. Контрольные растения выращивали в люминостате при 22-24⁰С, освещенности 3000 лк и 16-часовом фотопериоде. Уже на первых периодах культивирования четко прослеживались различия в развитии

растений. При пониженной температуре значительно замедлялось развитие черенков наперстянки. Если в контрольном варианте уже через неделю культивирования наблюдалась инициация корнеобразования, то в опыте образование корней начиналось на 2 недели позже и интенсивность ризогенеза была очень низкой. Параллельно пониженная температура тормозила развитие всего растения. Если после месяца культивирования у контрольных растений наблюдаются хорошо развитые листья и корневая система, то на черенках, культивируемых при пониженной температуре, едва заметны корешки и слабо развитые листья (рисунок 1). Отставание в развитии опытного варианта наблюдалось на протяжении всего периода культивирования (рисунок 2). После окончания эксперимента растения, культивируемые при пониженных температурах, были расчеренкованы и перенесены в нормальные условия культивирования. Отмечено, что длительное культивирование не оказало негативного влияния на наперстянку и все черенки развивались хорошо.



А

Б

Рисунок 1 — Рост растений наперстянки после месяца культивирования при различной температуре (А – при 22-24°C; Б – при 8-10°C)



Рисунок 2 — Рост *Digitalis purpurea* L. после 5 месяцев культивирования при различной температуре (А – при 22-24°C; Б – при 8-10°C)

Эксперимент показал, что при испытанных вариантах питательной среды хранение в условиях холодильной камеры возможно, однако необходимо проводить индивидуальный подбор состава питательных сред и соблюдать сроки хранения. Для

более успешного депонирования необходимо чередовать культивирование при пониженной температуре и обычное культивирование в условиях светокomнаты.

Часто для депонирования растений в коллекции *in vitro* используют ретарданты — вещества, способные тормозить удлинение стеблей растения. Процесс торможения роста основан на блокировании в организме растения синтеза гибберелловой кислоты, стимулирующей вытягивание стеблей. Одновременно не оказывается отрицательного влияния на другие физиологические процессы. Одним из лучших среди препаратов этого класса считается хлорхолинхлорид, который способен тормозить рост клеток в длину и усиливать их деление в поперечном направлении. В результате развивается укороченный стебель и замедляется рост растения.

При разработке методов депонирования *Digitalis purpurea L* было исследовано влияние хлорхолинхлорида на рост и развитие наперстянки в культуре *in vitro*. С этой целью черенки наперстянки культивировали на безгормональной среде В5 с добавлением хлорхолинхлорида в концентрации 70, 150 и 200 мг/л. Контролем служили растения, посаженные на среду В5 без добавления хлорхолинхлорида. Результаты эксперимента анализировали после 6-х месяцев культивирования растений в люминостате при освещенности 3,5 тыс. люкс, температуре 24 °С и 16-часовом фотопериоде. Уже при визуальной оценке полученных результатов можно отметить, что добавление в среду культивирования хлорхолинхлорида в концентрации 70, 150 мг/л не оказало существенного влияния на развитие *Digitalis purpurea L*. (рисунок 3). Только, при увеличении концентрации хлорхолинхлорида до 200 мг/л, было заметно замедление роста наперстянки. Возможно, при более высоких концентрациях хлорхолинхлорида этот процесс будет более ярко выражен.

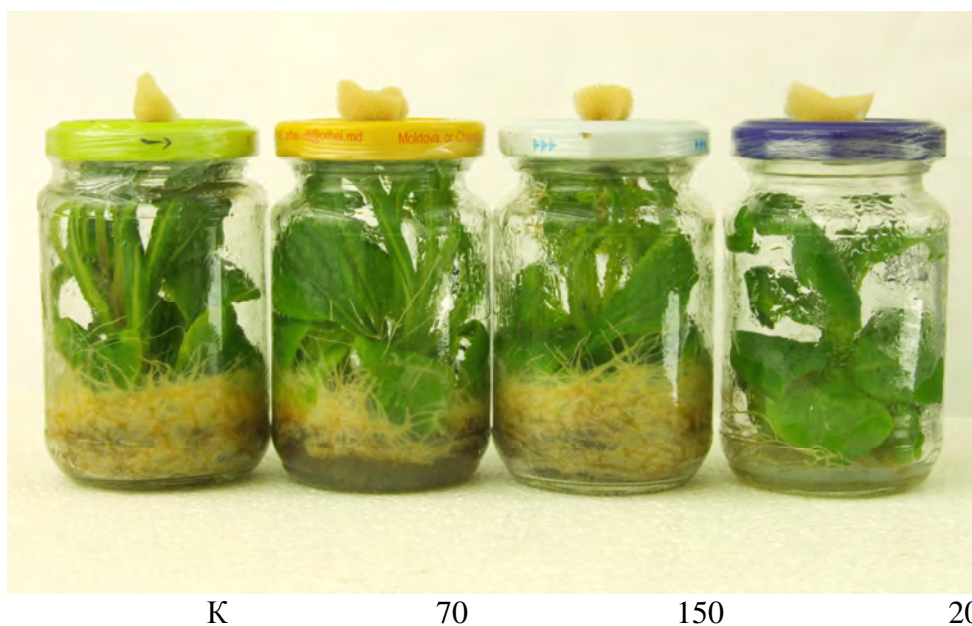


Рисунок 3 - Влияние различных концентраций хлорхолинхлорида на рост и развитие *Digitalis purpurea L*. после 6 месяцев культивирования

Более детальное изучение влияние хлорхолинхлорида на развитие *D. purpurea L* показало, что и при низких концентрациях этого ретарданта наблюдаются отличия от контрольного варианта. Как видно из данных представленных в диаграмме (рисунок 4), при измерении массы надземной части *D. purpurea L*, уже при концентрации хлорхолинхлорида 70 мг/л наблюдается замедление роста надземной части наперстянки. Увеличение концентрации хлорхолинхлорида в среде культивирования замедляло рост растений. При добавлении 200 мг/л хлорхолинхлорида масса надземной части была в 1, 6 раза меньше, чем у контрольных растений.

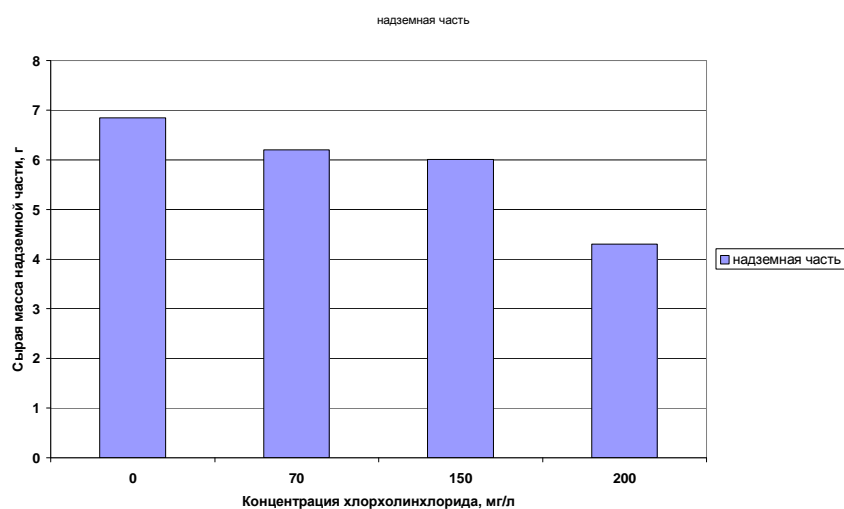


Рисунок 4 - Влияние хлорхолинхлорида на развитие *D. purpurea L*

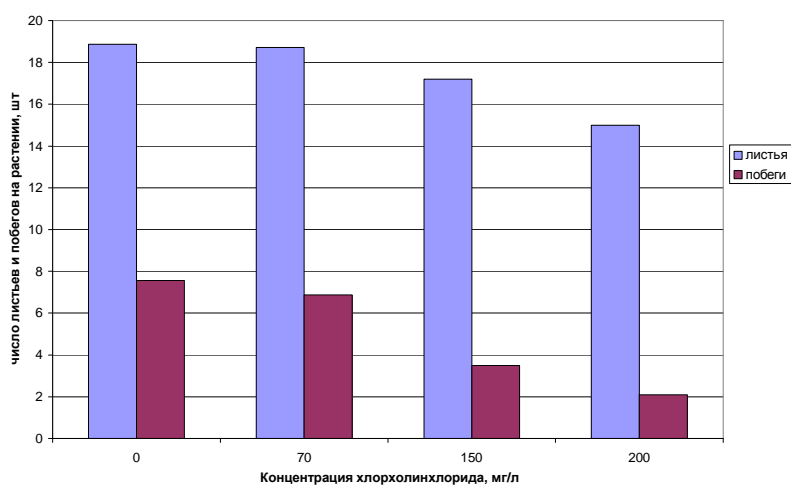


Рисунок 5 - Влияние различных концентраций хлорхолинхлорида на морфологические показатели *D. purpurea L*

Добавление хлорхолинхлорида оказывало влияние и на морфологические показатели *D. purpurea L* (рисунок 5). Подсчет числа листьев на растениях после 6 месяцев культивирования показал, что при культивировании черенков наперстянки на средах содержащих хлорхолинхлорида количество листьев, образовавшихся на растениях в культуре *in vitro* за этот период было в 1,3 раза меньше, чем на контрольных растениях. При добавлении более низких концентраций хлорхолинхлорида различия по этому признаку были незначительными. Добавление хлорхолинхлорида оказало влияние и на образование побегов из пазушных почек. Так при добавлении в среду культивирования 200 мг/л хлорхолинхлорида число образовавшихся боковых побегов уменьшилось в 3, 6 раза. Несколько ниже эта величина была при культивировании на среде с 150 мг/л хлорхолинхлорида (2,2 раза), а при 70 мг/л хлорхолинхлорида число образовавшихся побегов почти не отличалось от контрольного варианта.

Заключение. Опыт экспериментальной работы показал необходимость учета индивидуального реагирования на те или иные условия депонирования и выявления длительности пассирования или беспересадочной культуры при выводе генотипа в оптимальный режим культивирования без нарушения основных генетических и физиолого-биохимических показателей редепонированной культуры.