

**Национальная академия наук Беларуси
Центральный ботанический сад**

**Интродукция, сохранение и использование
биологического разнообразия мировой флоры**

Материалы Международной конференции,
посвященной 80-летию Центрального ботанического сада
Национальной академии наук Беларуси
(19–22 июня 2012 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях
Часть 2**

**Assessment, Conservation and Sustainable Use
of Plant Biological Diversity**

Proceedings of the International Conference
dedicated to 80th anniversary of the Central Botanical Garden
of the National Academy of Sciences of Belarus
(June 19–22, 2012, Minsk, Belarus)

**In two parts
Part 2**

Минск
2012

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

И73

Редакционная коллегия:

*Д-р биол. наук В.В. Титок (ответственный редактор);
д-р биол. наук, академик НАН Беларуси В.Н. Решетников;
д-р биол. наук, ч.-кор. НАН Беларуси Ж.А. Рупасова;
д-р биол. наук, чл.-кор. НАН Беларуси Е.А. Сидорович;
канд. биол. наук Ю.Б. Аношенко; канд. биол. наук А.В. Башилов;
канд. биол. наук А.А. Веевник; канд. биол. наук И.К. Володько;
канд. биол. наук И.М. Гаранович; канд. биол. наук Л.В. Гончарова;
канд. биол. наук А.А. Кузовкова; канд. биол. наук Л.В. Кухарева;
канд. биол. наук Н.М. Лунина; канд. биол. наук Е.В. Спиридович;
канд. биол. наук В.И. Торчик; канд. биол. наук О.В. Чижик;
канд. биол. наук А.Г. Шутова; канд. биол. наук А.П. Яковлев.*

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций

И 73 **Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры;** Материалы Международной конференции, посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси. (19–22 июня 2012, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 2 / Нац. акад. Наук Беларуси, Централ. ботан. сад; редкол.: В.В. Титок /и др./, Минск, 2012. – 492 с.

В сборнике представлены материалы Международной конференции «Интродукция, сохранение и использование биологического разнообразия мировой флоры», посвященной 80-летию Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси.

В 1-й части публикуются тезисы докладов секций «Теоретические основы и практические результаты интродукции растений» и «Современные направления ландшафтного дизайна и зеленого строительства»

Во 2-й части представлены тезисы докладов секций «Экологическая физиология и биохимия интродуцированных растений», «Генетические и молекулярно-биологические аспекты изучения и использования биоразнообразия растений» и «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира».

УДК 582:581.522.4(082)

ББК 28.5я43

Регенерация клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) в культуре ткани *in vitro*

Решетников В.Н., Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г., Малюш М.К.

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь,
e-mail: fomenko_ti@mail.ru

Резюме. Представлены результаты исследований морфогенного потенциала различных эксплантов клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). Показано преимущество использования эксплантов семядольных узлов и семядольных листьев для получения активного морфогенеза в культуре *in vitro*. Проведен скрининг сортов для выявления наибольшего регенерационного потенциала.

Summary. Investigation results on morphogenesis process of red clover (*Trifolium pratense* L.). different explants are presented. It was shown the advantage of cotyledonary nodes and leaf explants for active morphogenesis *in vitro* culture. Cultivar Vitebchanin has the most morphogenesis activity among investigated cultivars.

Введение. Разработка методов регенерации клевера лугового (*Trifolium pratense* L) в культуре ткани *in vitro* представляет интерес для современных биотехнологий, используемых в селекции. Наличие видовой и сортовой специфичности каллусо- и морфогенеза у бобовых, а также сложности процесса регенерации требуют подбора типа экспланта, гормонального состава среды и условий культивирования. [1–3]. Целью наших исследований являлась оценка морфогенного потенциала различных сортов клевера лугового для получения активной регенерации в культуре *in vitro*

Материалы и методы. При введении в культуру *in vitro* клевера лугового сортов «Витебчанин», «Кармин», «Vjursele», «Слуцкий», «Яскравы» использовали семена, стерилизацию которых проводили последовательной обработкой 0,01% раствором перманганата калия (3 мин.) и 0,1% раствором диоксида (8 мин.) с последующей пятикратной промывкой стерильной водой. Семена проращивали на среде МС при 24°C, освещенности – 3 клк и 16-часовом фотопериоде. Оценку развития морфогенных процессов проводили на гипокотылях, семядольных листьях и семядольных узлах 6–7-дневных проростков. Экспланты тканей культивировали на среде В5 с различным сочетанием гормонов для получения активной регенерации.

Результаты и обсуждение. Для разработки эффективных методов регенерации клевера лугового в культуре *in vitro* подбор оптимального типа экспланта и комбинаций фитогормонов, обеспечивающих наибольший выход растений-регенерантов, проводили на сорте «Витебчанин». Исследование условий культивирования показало преимущество сред, базовой основой которых являлась среда В5. При разработке гормонального состава сред для индукции морфогенеза учитывали литературные данные и ранее полученные нами результаты [4, 5].

Исследование морфогенного потенциала эксплантов гипокотилей показало, что при культивировании на средах, содержащих наряду с 0,1 мг/л а-НУК различные концентрации БАП (от 1 до 6 мг/л), наблюдалось образование адвентивных побегов почти на всех средах. Однако частота регенерации у сорта «Витебчанин» была невысокой и не превышала 14,5% на среде, содержащей 4 мг/л БАП. Установлено, что при культивировании гипокотилей большое значение имеет место взятия экспланта. На эксплантах, выделенных из верхней части гипокотилей, инициировалось образование побегов с более высокой частотой, чем на эксплантах из нижней части гипокотыля, на которых морфогенная активность либо отсутствовала, либо выражалась только ризогенезом. Последующее пассирование эксплантов на аналогичные среды приводило к усилению морфогенных процессов и инициировало множественное побегообразование (рис. 1).

Для сравнения морфогенной активности гипокотильных эксплантов сортов клевера лугового использовали среду В5, содержащую БАП в концентрации 4 мг/л и 0,1 мг/л α-НУК. На эксплантах наблюдалась инициация каллусогенеза, однако частота регенерации у исследованных сортов была сравнительно низкой и колебалась в пределах 2,3–14,5%. Выявлено, что наибольшей морфогенной активностью обладали экспланты гипокотыля сорта «Витебчанин» (табл. 1). Частота регенерации на эксплантах гипокотилей этого сорта была почти в 3 раза выше, чем у сортов «Vjursele», «Слуцкий» и «Мутант 23». Показана возможность повышения интенсивности морфогенеза гипокотильных эксплантов ряда сортов клевера лугового при одновременном использовании в среде культивирования двух цитокининов [1]. Однако в наших исследованиях добавление в среду культивирования кинетина в концентрации 1 и 2 мг/л не оказало положительного влияния на частоту регенерации (табл. 1).

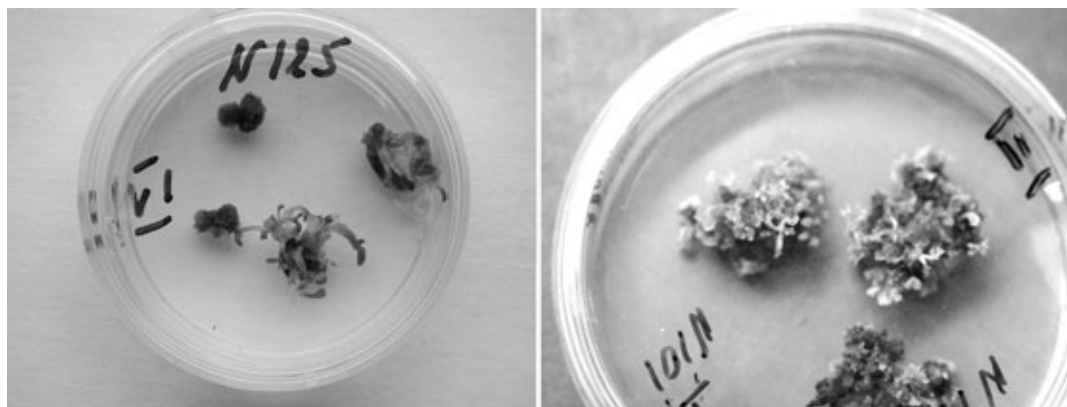


Рисунок 1. Инициация регенерации побегов (слева) и множественное побегообразование (справа) на эксплантах гипокотилей клевера лугового сорта «Витебчанин».

При культивировании гипокотилей сорта «Кармин» на морфогенной среде с добавлением 2 мг/л кинетина частота регенерации была в 3,6 раза ниже, чем на среде, не содержащей кинетина. У сортов «Vjursele», «Слуцкий» и «Яскравы» при добавлении в культуральную среду 2 мг/л кинетина морфогенную реакцию на гипокотилеях не наблюдали.

Проведено исследование морфогенного потенциала эксплантов семядольных листьев, у которых сохраняли черешок с пазушной меристемой у основания. Экспланты вычленили из 7-дневных проростков клевера сортов «Витебчанин», «Янтарный» и «Vjursele», выращенных на среде B5, не содержащей гормонов. Для индукции морфогенеза использовали среду B5, содержащую 0,1 мг/л α -НУК и БАП в концентрации 1, 2, 4, 6 мг/л. Отмечено, что во всех вариантах сред на эксплантах у основания черешка образовывалась каллусная ткань, из которой в дальнейшем наблюдалась инициация морфогенеза. Увеличение в среде культивирования концентрации БАП до 4 мг/л способствовало повышению морфогенной активности семядольных листьев исследованных сортов клевера (табл. 2).

При культивировании эксплантов на среде, содержащей 6 мг/л БАП, происходило небольшое понижение регенерационной активности по сравнению со средами, содержащими более низкие концентрации БАП. Показано, что оптимальной средой морфогенеза явилась среда, содержащая 4 мг/л БАП. Можно отметить, что наибольшую морфогенную активность на всех исследованных средах показал сорт «Vjursele» (рис. 2).

Наряду с эксплантами гипокотилей и семядольных листьев исследована морфогенная активность семядольных узлов. Ранее нами было показано, что использование высоких концентраций БАП (8 и 10 мг/л) хотя и инициирует активный морфогенез, но образовавшиеся побеги в основном отличаются пониженной жизнеспособностью при последующих пересадках [4]. Для оценки морфогенной активности использовали семядольные узлы проростков

Таблица 1. Влияние гормонального состава сред на морфогенную активность гипокотилей сортов клевера лугового

Сорт	Частота регенерации, %		
	I	II	III
«Vjursele»	5,8	3,8	0
«Витебчанин»	14,5	11,9	10,0
«Кармин»	8,0	7,8	2,3
«Мутант 23»	5,4	5,0	4,4
«Слуцкий»	4,8	2,6	0
«Яскравы»	2,3	0	0

Примечание: Гормональный состав сред: I – 4 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК; II – 4 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК, 1 мг/л кинетина; III – 4 мг/л БАП, 0,1 мг/л α -НУК, 2 мг/л кинетина.

Таблица 2. Влияние концентрации БАП на морфогенную активность семядольных листьев клевера лугового

Сорт	Концентрация БАП, мг/л	Частота регенерации, %
«Вјursele»	1	24,5
	2	36,0
	4	45,8
	6	43,4
«Витебчанин»	1	18,9
	2	19,5
	4	25,7
	6	22,1
«Янтарный»	1	31,0
	2	35,3
	4	38,9
	6	28,6

клевера лугового сортов «Витебчанин», «Вјursele», «Слуцкий» и «Янтарный». При культивировании на большинстве эксплантов инициировалось множественное побегообразование, которое зависело как от сорта, так и от гормонального состава среды культивирования. У всех сортов с увеличением в среде культивирования концентрации БАП возрастала частота множественного побегообразования (табл. 3). Для сортов «Витебчанин» и «Вјursele» на среде, содержащей 6 мг/л БАП, процесс регенерации шел в 3 раза активнее, чем на среде, содержащей 1 мг/л БАП. Число образовавшихся побегов на эксплантах колебалось от 2 до 7. У сортов «Слуцкий» и «Янтарный» на всех средах регенерация проходила менее активно. Отмечено, что частота множественного побегообразования в первом пассаже на семядольных узлах сорта «Витебчанин» на всех средах была выше, чем у остальных сортов.

Отмечено, что наряду с множественным побегообразованием у основания большинства семядольных узлов образовывался морфогенный каллус (компетентный к регенерации растений) с плотной крупнозернистой структурой. Образование морфогенного каллуса на семядольных узлах наблюдали на всех использованных средах, но с разной активностью процесса. На среде, содержащей 1 мг/л БАП, интенсивность каллусогенеза у всех сортов была низкой и не превышала 33,8% (сорт «Витебчанин»). Наибольшая каллусогенная активность для всех генотипов наблюдалась на среде, содержащей 4 мг/л БАП. Отмечено, что интенсивность этого процесса у сортов «Витебчанин», «Слуцкий» и «Янтарный» на этой среде была

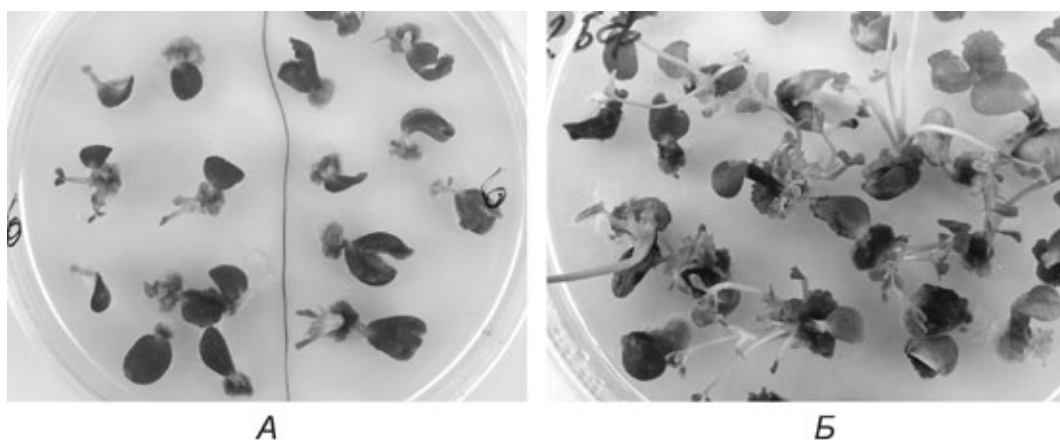


Рисунок 2. Морфогенез на эксплантах семядольных листьев клевера лугового сорта «Вјursele» на среде Б5, содержащей 4 мг/л БАП (А – первый пассаж, Б – второй пассаж).

Таблица 3. Множественное побегообразование на explантах семядольных узлов клевера лугового

Кон-ция БАП, мг/л	Частота множественного побегообразования, %							
	«Витебчанин»		«Vjursele»		«Слуцкий»		«Янтарный»	
	1 пассаж	2 пассаж	1 пассаж	2 пассаж	1 пассаж	2 пассаж	1 пассаж	2 пассаж
1	21,7	64,7	15,0	56,3	0	55,6	0	30,0
2	49,2	76,2	32,0	70,8	9,5	78,9	5,2	80,1
4	50,3	90,9	36,4	87,5	9,5	89,5	8,2	86,4
6	56,5	95,9	47,4	89,5	14,3	93,5	12,0	90,4

приблизительно одинаковой, а на explантах сорта «Vjursele» каллусогенез протекал менее активно.

Последующее пассирование семядольных узлов на среды с таким же гормональным составом повышало частоту регенерации побегов (табл. 3). Если в первом пассаже у сортов «Слуцкий» и «Янтарный» на среде, содержащей 1 мг/л БАП, не наблюдали множественное побегообразование, то во втором пассаже этот показатель составил 55,6 и 30,0%, соответственно. С увеличением в среде культивирования концентрации БАП увеличивалась и частота регенерации у всех исследуемых сортов. На средах, содержащих 4 и 6 мг/л БАП, наблюдали особенно активное побегообразование. У сортов «Витебчанин» и «Слуцкий» на среде, содержащей 6 мг/л БАП, частота множественного побегообразования была самой высокой (95,9 и 93,5%, соответственно).

Одновременно с увеличением частоты регенерации увеличивалось число побегов, образовавшихся на одном explанте. Среднее число регенерантов на explант варьировало от $1,5 \pm 0,8$ побегов у сорта «Янтарный» на среде, содержащей 1 мг/л БАП, до $11,3 \pm 8,8$ побегов у сорта «Слуцкий» на среде, содержащей 6 мг/л БАП. Хотя наибольшую индукцию побегов у всех исследуемых сортов наблюдали на этой среде, однако полученные регенеранты отличались мелким размером и низкой жизнеспособностью. Достоверные отличия между сортами по числу побегов, образовавшихся на одном explанте, не были установлены из-за большого разброса данных в выборке. Так, при культивировании семядольных узлов сорта «Слуцкий» на среде, содержащей 6 мг/л БАП, число побегов на explантах колебалось от 2 до 31 (рис. 3).

Проведенные исследования морфогенных процессов на explантах семядольного узла сортов клевера лугового показало их высокий морфогенный потенциал и активное побегообразование в результате развития прямого и непрямого морфогенеза. При концентрации БАП в среде культивирования 4 мг/л у всех исследованных сортов отмечен сравнительно высокий уровень как прямого (выше 80%), так и непрямого морфогенеза (выше 50%).

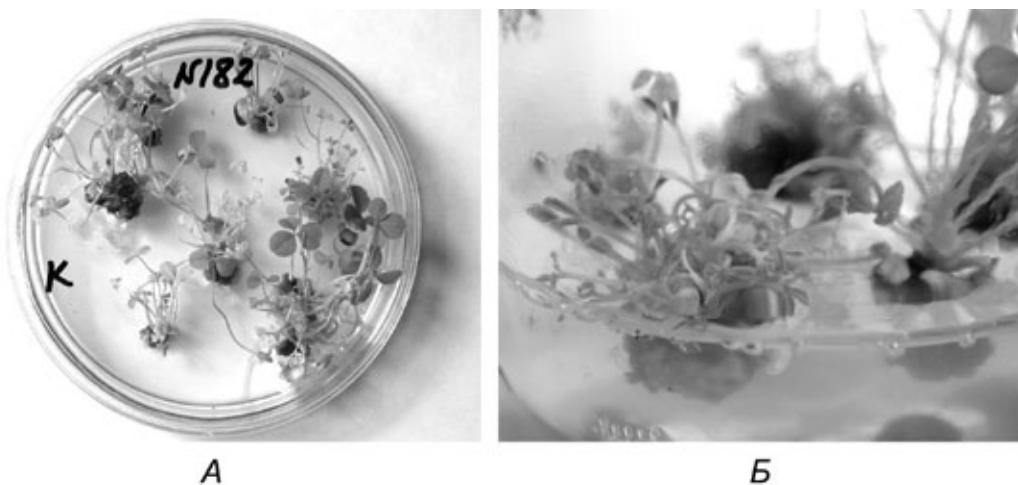


Рисунок 3. Множественное побегообразование на explантах семядольных узлов клевера лугового сорта «Слуцкий» на среде, содержащей 6 мг/л БАП (А – первый пассаж, Б – второй пассаж).

Заключение. Разработан метод активной регенерации побегов в культуре ткани клевера лугового. Показано преимущество использования семядольных узлов и семядольных листьев в качестве эксплантов. При культивировании на средах, содержащих различные концентрации БАП (1–6 мг/л), наблюдалась как прямая регенерация, так и регенерация из меристемных очагов каллуса, образовавшегося в основании экспланта. Подобран оптимальный состав сред для индукции активного морфогенеза исследованных сортов.

Список литературы:

1. Куренина Л.В. Солодка Л.А., Лапотькина Л.И., Мазин В.В. Разработка способа быстрой регенерации клевера лугового *Trifolium pratense* L. // Биотехнология. – 2001. – № 6, с. 19–24.
2. Стефанович А.М., Ревенкова Е.В., Ралдугина Г.Н. Получение трансгенных растений клевера (*Trifolium pratense*), устойчивых к гербициду фосфинотрицину (БАСТА). // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1994. – № 5, с. 37–41.
3. Rybczyński J.J. Plant regeneration in highly embryogenic callus, cell suspension and protoplast cultures of *Trifolium fragiferum* L. (*Leguminosae*). // Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 1997. – V. 51, p. 159–170.
4. Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И. Индуцированный морфогенез в культуре тканей клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). // Регуляция роста, развития продуктивности растений: материалы III Междунар. науч. конф. – Минск. – 2005, с. 29.
5. Фоменко Т.И., Бердичевец Л.Г., Малюш М.К. Разработка методов регенерации побегов клевера лугового в культуре ткани *in vitro*. // Земледелие и селекция в Беларуси: сб. науч. тр. / РУП «Науч.-практ. центр НАН Беларуси по земледелию». – 2007. – № 43, с. 394–407.

Биотехнологические аспекты изучения системной индуцированной устойчивости к вирусным болезням у растений семейства *Solanaceae* Juss.

Рожнова Н.А., Геращенко Г.А.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа, Россия,
e-mail: rozhnova@mail.rb.ru

Резюме. Обсуждаются механизмы защитного действия новых иммуностимуляторов и оценки их эффективности в индукции устойчивости к вирусным инфекциям у представителей семейства *Solanaceae* Juss. Приведены результаты комплексного исследования действия арахидоновой кислоты (АК), эместима, витамина Е, убихинона 50 и комбинации двух последних соединений в качестве индукторов защитных реакций на содержание фитогормонов и активность лектинов, компонентный состав белковых спектров растений и экспрессию генов протеинкиназ и просистемина.

Summary. Mechanisms of protective action of new immunostimulants and estimation of their efficiency at the induction of resistance to virus infections at plants of *Solanaceae* Juss family are discussed. Results of complex researches of action of arachidonic acids (AK), emestim, vitamin E, ubiquinone 50 and combinations of two last chemicals as индукторов protective reactions at the phytohormon contents and lectin activity, componental structure of protein spectra of plants and expression of proteinkinases and prosystemin genes are presented.

Огромный теоретический и практический интерес представляет изучение механизмов формирования системной индуцированной устойчивости (СИУ) при действии новых активаторов защитных реакций на моделях растений с разными типами иммунного ответа при вирусных инфекциях [1]. Классическими объектами при изучении индуцированной устойчивости являются виды семейства *Solanaceae* Juss.: табак сорта «Самсун NN», обладающий N-локусом некротозообразования и способный реагировать сверхчувствительно на ВТМ-инфекцию или действие индукторов, и картофель сорта «Невский», несущий ген R (резистентности). Цель данной работы состояла в изучении механизмов защитного действия новых иммуностимуляторов и оценки их эффективности в индукции устойчивости к вирусным инфекциям. Оценку динамики формирования и сохранения СИУ к фитовирусам у растений табака и картофеля проводили, как описано в работе [2]. Растения в ходе эволюции сформировали конститутивные и индуцибельные механизмы устойчивости, направленные на блокирование инфекции потенциальных патогенов, в том числе вирусных. Известно, что, помимо специфической устойчивости к патогенам, все растения могут проявлять неспецифическую индуцибельную «иммунность» – системную индуцированную устойчивость (СИУ) к последующей инфекции после первичной инокуляции патогенами или воздействия химическими или биогенными веществами. Использование индукторов устойчивости к комплексу болезней, в том числе и к вирусным патогенам, является одним из важнейших направлений в современной физио-