

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
Центральный ботанический сад
Научно-практический центр по биоресурсам
Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф. Купревича
Институт леса



Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов

Материалы III Международной конференции,
посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского
(7–9 октября 2015 г., Минск, Беларусь)

**В двух частях
Часть 1**

**Секция 1. Ресурсы и биоразнообразие растительного мира:
современное состояние, воспроизводство, охрана
и устойчивое использование**

**Секция 2. Современные направления изучения
ботанических коллекций для сохранения
и рационального использования
биоразнообразия растительного мира**

Минск
«Конфидо»
2015

УДК 502.174:574.1(082)

ББК 20.18я43

П78

Редакционная коллегия:

д.б.н., чл.-кор. НАН Беларуси В.В. Титок (ответственный редактор),

д.б.н. Е.И. Анисимова,

к.б.н. Б.Ю. Аношенко,

к.б.н. Д.Б. Беломесецева,

к.б.н. П.Н. Белый,

д.б.н. Е.И. Бычкова,

к.б.н. Т.В. Волкова,

к.б.н. Л.В. Гончарова,

д.б.н. С.А. Дмитриева,

к.б.н. Е.Я. Куликова,

к.б.н. А.В. Пугачевский,

д.б.н., чл.-кор. НАН Беларуси В.П. Семенченко,

к.б.н. В.А. Цинкевич

Материалы печатаются в авторской редакции.

Иллюстрации предоставлены авторами публикаций.

П78 **Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов:** материалы III Международной научно-практической конференции, посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского. (7–9 октября 2015, Минск, Беларусь). В 2 ч. Ч. 1 / Нац. акад. наук Беларуси [и др.]; редкол.: В.В. Титок [и др.]. – Минск: Конфидо, 2015. – 514 с.

ISBN 978-985-6777-74-8.

В сборнике представлены материалы III Международной научно-практической конференции «Проблемы сохранения биологического разнообразия и использования биологических ресурсов», посвященной 110-летию со дня рождения академика Н.В. Смольского. Часть 1: секция 1 «Ресурсы и биоразнообразие растительного мира: современное состояние, воспроизводство, охрана и устойчивое использование» и секция 2 «Современные направления изучения ботанических коллекций для сохранения и рационального использования биоразнообразия растительного мира».

УДК 502.174:574.1(082)

ББК 20.18я43

ISBN 978-985-6777-74-8

© ГНУ «Центральный ботанический сад
Национальной академии наук Беларуси», 2015
© Оформление. ЗАО «Конфидо», 2015

Депонирование каллусной культуры *Vinca minor* (L.) в условиях однокомпонентного и сочетанного действия гипотермии и D-маннита

Филиппова С.Н., Юрин В.М.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, svetlan_rom@mail.ru

Резюме. Понижение температуры до 10 °С и включение D-маннита в среду инкубации приводят практически к полной остановке ростовых процессов каллусных клеток *Vinca minor*. Однако дегидрогеназная активность ферментов при этом сохраняется на относительно высоком уровне. В этой связи можно заключить, что сочетанное действие D-маннита и температуры инкубации 10 °С является оптимальным и перспективным методом депонирования каллусной культуры *Vinca minor*.

Summary. Filippova S.N., Yurin V.M. **Preservation of *Vinca minor* (L.) callus cultures under the one component and combined effects of hypothermia and D-mannitol.** The preservation *Vinca minor* callus cultures at low temperature (10 °C) and D-mannitol supplementation significantly decrease callus growth and increase the dehydrogenase activity in *Vinca minor* callus cultures cells. The combined effect of D-mannitol and the 10 °C temperature is optimal and promising method of *Vinca minor* callus culture preservation.

В настоящее время проблема сохранения генофонда ценных лекарственных и сельскохозяйственных растений приобретает особую актуальность. Создание национальных парков, заповедников, ботанических садов и банков семян является традиционным способом сохранения биоразнообразия. Однако сбережение коллекций в условиях естественного произрастания – не всегда самый оптимальный вариант сохранения уникальных генотипов благодаря накоплению мутаций в популяциях и линиях и, соответственно, потере ценных свойств и признаков. Коллекции семян растений также не лишены недостатков, поскольку семена многих видов не выдерживают длительного хранения.

Кроме сбережения коллекций в условиях сохранения нормальных процессов роста, более эффективным и целесообразным приемом является замедление, либо полная остановка ростовых процессов [1]. При этом ценные генотипы остаются неизменными в течение длительного времени. Среди таких методов выделяют криосохранение биоматериала при температуре жидкого азота (минус 196 °С) и депонирование клеток и тканей вегета-

тивных органов. Однако в отличие от животных клеток, растительные представляют собой более трудный объект для криоконсервации благодаря наличию крупных размеров клетки, прочной целлюлозной стенки и системы вакуолей, что существенно усложняет процесс обезвоживания.

Среди вышеперечисленных методов наиболее перспективным приемом для сохранения генофонда растительных объектов является создание банка культур клеток и тканей *in vitro* путем депонирования в условиях лимитирования ростовых процессов [2]. Создание гипотермии при низких положительных температурах и (или) высокой осмотической концентрации растворов сред культивирования – один из наиболее простых и эффективных приемов, приводящих к замедлению процессов метаболизма в культурах *in vitro*. К осмолитам относятся: сахароза, фруктоза, пролин, глицерин, маннит и т. д. Причем присутствие данных соединений в среде инкубации может повышать устойчивость клеток к воздействию неблагоприятных факторов среды, таких, например, как пониженные температуры.

Однако в условиях замедления метаболической активности жизнеспособность клеток может существенно снижаться. Поэтому сохранение регенеративной способности культур клеток и тканей после периода культивирования их в условиях гипотермии и повышенной осмотической концентрации раствора инкубации является одной из основных проблем депонирования ценных видов растений.

Среди ценных лекарственных растений можно выделить барвинок малый (*Vinca minor* L.). В его состав входят фармакологически активные терпеновые индольные алкалоиды, основной из которых – винкамин [3]. Препараты винкамина – это активаторы церебрального метаболизма, поскольку они улучшают мозговое и коронарное кровообращение. Благодаря этому их используют при лечении атеросклеротических явлений, состояний после ишемического инсульта и т. д. [4].

Таким образом, представлялось актуальным изучить влияние таких факторов, как гипотермия при 10 °С и повышение осмотической концентрации растворов сред культивирования путем включения D-маннита в среду культивирования, лимитирующих ростовые процессы в течение 65 суток, на рост и жизнеспособность каллусных клеток *Vinca minor*. Объект исследования – гетеротрофная каллусная культура *Vinca minor*. Культивирование проводили на среде Мурасиге и Скуга (MS), содержащей фитогормоны в концентрациях 0,1 мг/л НУК и 1 мг/л кинетин при 10 и 25 °С в термостате в темноте. D-маннит использовали в концентрации 5 %. Все измерения проводили на 30-е, 45-е и 65-е сутки инкубации каллусных культур. Определение индекса роста выполняли согласно общепринятой методике [5]. Жизнеспособность каллусных клеток определяли с помощью тетразолиевого метода [6].

В результате проведенных экспериментов установлено, что максимальный индекс роста ($14,08 \pm 1,83$ отн. ед.) наблюдался для каллусной культуры *Vinca minor*, культивируемой при 25 °С на 45-е сутки инкубации (рис. 1). Однокомпонентное и сочетанное действие D-маннита и пониженной температуры приводило к существенному снижению индекса роста каллусов. Минимальная ростовая активность каллусных клеток *Vinca minor* была показана при сочетанном действии пониженной температуры и осмотического агента D-маннита и однокомпонентном воздействии пониженной температуры на 30-е, 45-е и 65-е сутки инкубации. В то время как при однокомпонентном воздействии D-маннита в условиях

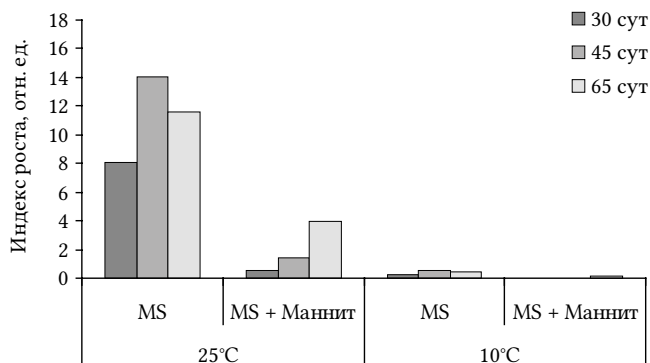


Рис. 1. Влияние аммоний-церий (IV) сульфата на удельную скорость роста каллусной ткани *Catharanthus roseus*

стандартной температуры инкубации ростовая активность каллусных клеток сохранялась на довольно высоком уровне на протяжении всего периода культивирования.

Анализ жизнеспособности клеток каллусной культуры *Vinca minor* показал, что максимальная дегидрогеназная активность отмечается в клетках на 30-е сутки инкубации в контрольном варианте (рис. 2). В течение последующих 35 суток культивирования происходило существенное снижение дегидрогеназной активности. При однокомпонентном воздействии D-маннита на 30-е сутки культивирования каллусных клеток дегидрогеназная активность была ниже, чем в контрольном варианте. Однако на 65-е сутки инкубации клеток каллусной культуры в присутствии D-маннита в среде культивирования дегидрогеназная активность была в 70 раз выше, чем в контрольном варианте. При однокомпонентном воздействии пониженной температуры и сочетанном с D-маннитом была также выявлена существенная стимуляция дегидрогеназной активности на 65-е сутки культивирования в 40 и 60 раз соответственно, по сравнению с контролем. Причинами высокой дыхательной активности клеток каллусной ткани *Vinca minor* в условиях пониженной температуры могут быть экологически обусловленные генетические механизмы. Так, поскольку для данного растения характерен европейско-средиземноморский тип ареала, культивирование каллусной ткани при пониженных температурах не приводит к существенному ингибированию дыхательных ферментов.

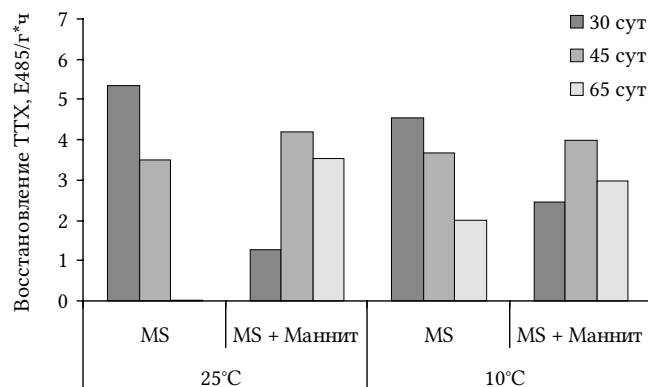


Рис. 2. Влияние аммоний-церий (IV) сульфата на содержание белка в каллусной культуре *Catharanthus roseus*

minor является сочетанное действие D-маннита и температуры инкубации 10 °С.

В результате проведенных экспериментов можно заключить, что понижение температуры до 10 °С и включение D-маннита в среду инкубации каллусных клеток *Vinca minor* приводят практически к полной остановке ростовых процессов, однако при этом активность дегидрогеназных ферментов в клетках каллусных тканей сохраняется на относительно высоком уровне. Таким образом, среди исследуемых вариантов, наиболее оптимальным и перспективным методом депонирования каллусной культуры *Vinca*

Список литературы

- Endress, R. Plant Cell Biotechnology / R. Endreb. – Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1994. – 353 p.
- Bhojwani, S.S. Plant Tissue Culture: Theory and Practice / S.S. Bhojwani, M.K. Razdan. – Amsterdam : Elsevier, 1996. – 766 p.
- Boyadzhiev, L. Extraction of vincamine from Periwinkle (*Vinca minor* L.): obtaining of total extract. Comptes rendus de L'Academie bulgare des Sciences. – 2002. – Vol. 55 (12). – P. 49–52.
- Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России; справочник; редкол.: Ф.Ю. Исаков [и др.]. – М.: АстраФармСервис, 2001. – 1536 с.
- Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наук. думка, 1980. – 480 с.
- Towill, L.E. Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. Canadian Journal of Botany. – 1974. – Vol. 53. – P. 1097–1102.