

СОХРАНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ *IN VITRO* И ЕГО РАЦИОНАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Ботанические сады являются центрами по сохранению биоразнообразия растений. Сохранение генофонда в культуре *in vitro* – важное достижение биотехнологии [1]. Этот подход позволяет уберечь и поддержать неограниченно долго генетические коллекции растений без изменения их наследственной основы. Особый интерес методы культуры *in vitro* представляют для поддержания уникальных генотипов культурных растений (трансгенных растений, линий с цитоплазматической мужской стерильностью, маркированных изогенных линий и др.), а также растений из Красной книги [2].

В отделе биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси создана и постоянно расширяется коллекция асептических культур редких и ценных растений. В настоящее время коллекция представлена 152 видами различных семейств: Orchidaceae Juss., Ericaceae Juss., Oleaceae Hoffmanns., Nyacinthaceae Batsch ex Borkh., Hostaceae B. Mathew., Fabaceae Lindl., Asteraceae Bercht. & J. Presl, Solanaceae Juss., Cactaceae Juss., Scrophulariaceae Juss., Polemoniaceae Juss., Lamiaceae Martinov, Boraginaceae Juss., Iridaceae Juss., Rutaceae Juss. и др. Хранение *in vitro* ценных форм растений – высокоэффективный прием поддержания коллекций. Приоритетны для длительного хранения редкие и исчезающие виды. Разработка методов культивирования *in vitro* различных видов растений создает предпосылки для применения принципиально новых подходов их размножения. В настоящее время разработаны технологии микроклонального размножения, которые особенно актуальны для культур, размножаемых преимущественно вегетативно. Основные приемы сохранения генофонда *in vitro* могут быть применены только к тем видам, для которых разработаны легко воспроизводимые методы размножения [3, 4].

14.1. Декоративные культуры в коллекции растений *in vitro*

Сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.) – одно из самых популярных декоративных древесных растений. Наиболее репрезентативные коллекции этой культуры сосредоточены преимущественно в ботанических садах и интродукционных центрах, где, как правило, представлены малым числом экземпляров. В отделе биохимии ЦБС разработаны методики инициации и размножения в асептических условиях культуры побегов 34 сортов сирени обыкновенной. Установлено, что у эксплантов сирени в культуре *in vitro*

происходит реализация органогенного потенциала первичных меристем пазушных почек. Побеги развиваются посредством прямого органогенеза, минуя стадию каллусообразования. При культивировании эксплантов сирени на разных питательных средах (B5, WPM, SC, MS и их модификациях) показано, что клонирование всех исследуемых сортов наиболее эффективно происходит на модифицированной среде Мурасиге–Скуга (MS) с повышенным содержанием макросолей. Среди трех регуляторов роста с цитокининовой активностью (кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), 2-изопентиладенин (2иП), действие которых было проанализировано, только 6-БАП и 2иП оказали эффективное влияние на развитие побегов сирени на этапе размножения (табл. 14.1) [5, 6].

Таблица 14.1. Влияние различных типов и концентраций цитокининов на эффективность размножения сирени обыкновенной

Сорт	Тип цитокинина	Концентрация цитокинина, мг/л	Коэффициент размножения, шт.	Длина побегов, мм
Флора	6-БАП	3	5,1 ± 0,2	66,4 ± 0,6
		5	5,7 ± 0,2	55,2 ± 9,4
	2иП	1	5,5 ± 0,2	61,5 ± 4,1
		5	6,5 ± 0,9	56,6 ± 4,1
Красавица Москвы	6-БАП	3	6,5 ± 0,1	47,9 ± 5,5
		5	6,0 ± 0,2	75,1 ± 1,7
	2иП	1	6,8 ± 0,6	27,3 ± 1,9
		5	6,3 ± 0,3	55,9 ± 1,9
Нестерка	6-БАП	1	4,6 ± 0,1	22,2 ± 3,8
		3	5,3 ± 0,4	60,6 ± 1,8
	2иП	1	5,0 ± 0,3	36,0 ± 3,4
		5	6,3 ± 0,3	55,9 ± 1,9
Лунный Свет	6-БАП	1	4,3 ± 0,5	52,6 ± 4,3
		3	5,1 ± 0,2	54,8 ± 2,3
		5	5,9 ± 0,5	66,9 ± 5,9
	2иП	1	5,2 ± 0,3	60,8 ± 3,1
		5	5,3 ± 0,3	61,1 ± 4,6

Выявлена зависимость морфогенетической реакции на экзогенный цитокинин от генотипа экспланта, которая выражалась в специфической потребности сортов либо в 6-БАП, либо в 2иП. Это согласуется с результатами работ по культивированию сирени *in vitro* других исследователей [7, 8]. Также заметное влияние на рост и развитие побегов оказывали условия освещения и температура. Процесс адаптации растений сирени к нестерильным условиям не только является очень важным технологическим этапом, но и служит оценкой качества всей предлагаемой технологии. Разработаны условия укоренения побегов сирени *in vitro* и *ex vitro*, а также их адаптации в условиях оранжереи.

Высокий процент адаптированных растений (95–100%) достигнут при укоренении клонированных побегов сирени *ex vitro* на агроперлите, пропитанном раствором индолилмасляной (ИМК) или индолилуксусной кислоты (ИУК) в концентрации 1 мг/л. Длительность периода укоренения и адаптации соста-

вила около 1,5 мес. Укорененные саженцы пикировали в отдельные емкости. Почвенным субстратом служила смесь нейтрализованного торфа и речного песка или перлита в соотношении 3:1. Через 1–1,5 мес. после пикировки были получены растения, готовые к высадке в открытый грунт.

Род *Rhododendron L.* – крупнейший в семействе вересковых (Ericaceae Juss.). Рододендроны относятся к плохо укореняемым растениям, поэтому вегетативное размножение при помощи черенков или отводков малоэффективно и значительно ограничивается сезонным ростом. Эффективная технология микроклонального размножения рододендронов может обеспечить необходимое количество здорового, свободного от патогенов растительного материала [9]. С целью оптимизации основных этапов микроклонального размножения изучены особенности морфогенеза *in vitro* 17 сортов *Rhododendron × hybridum hort.* Основными характеристиками для отбора сортов служили декоративность и зимостойкость.

При инициации стерильных культур сортов рододендрона гибридного в качестве эксплантов использовали черенки с двумя-тремя пазушными почками, которые помещали на модифицированную среду WPM, содержащую 15 мг/л 2иП и 4 мг/л ИУК (вечнозеленые формы) или 3 мг/л зеатина (листопадные формы) [10]. Время первого субкультивирования в зависимости от сорта составило 6–12 недель. Способность к регенерации у различных сортов определяли прямым органогенезом из апикальных и аксиллярных почек, а также интенсивностью пролиферации (коэффициент размножения). Результаты экспериментов выборочно представлены в табл. 14.2 и на рис. 14.1 (см. цв. вклейку).

Таблица 14.2. Коэффициент размножения различных сортов *Rhododendron × hybridum hort.* в зависимости от концентрации фитогормонов и их соотношения

Сорт	Концентрация регуляторов роста		
	15 мг/л 2иП, 4 мг/л ИУК	10 мг/л 2иП, 2 мг/л ИУК	5 мг/л 2иП, 1 мг/л ИУК
PJM Elite	26,4 ± 2,1	19,4 ± 1,1	17,1 ± 1,2
Blutopia	17,3 ± 1,4	12,9 ± 0,9	10,8 ± 0,8
Klondyke	21,3 ± 1,6	18,4 ± 0,6	15,6 ± 0,9
Silver Slipper	16,1 ± 1,2	12,3 ± 0,7	10,4 ± 1,1
Fireball	29,5 ± 1,1	21,7 ± 1,6	14,1 ± 1,7
Naaga	27,4 ± 1,9	19,5 ± 0,9	16,7 ± 0,7
Hellikki	29,5 ± 1,1	21,7 ± 1,6	14,1 ± 1,7
Helsinki University	31,3 ± 2,3	24,3 ± 1,2	16,8 ± 0,9
Peter Tigerstedt	23,8 ± 1,6	16,1 ± 1,5	12,9 ± 1,4

Оптимизированы условия укоренения *in vitro* исследуемых сортов рододендрона гибридного. Наиболее интенсивно процессы адвентивного корнеобразования протекали у листопадных форм – на среде, содержащей 1,0 мг/л ИУК, у вечнозеленых – на среде с добавлением 1 мг/л ИМК. В результате проведенных исследований разработана эффективная технология микроклонального размножения интродуцированных сортов *Rhododendron × hybridum hort.*

Gerbera jamesonii Adlam – одна из наиболее активно используемых в срезке декоративных культур закрытого грунта. В мировой практике при производстве посадочного материала герберы широко применяются методы размножения *in vitro* [11, 12]. Растения, полученные таким способом, отличаются более мощным ростом и обильным цветением, высокой урожайностью среза цветов, свободны от инфекции. Исходными эксплантами служили меристемные ткани молодых цветочных бутонов и семена. Для массового развития побегов экспланты культивировали на питательной среде, содержащей 2–3 мг/л 6-БАП (рис. 14.2, см. цв. вклейку). Растения герберы укоренялись и имели максимальное число корней при использовании питательной среды с ИМК, ИУК в концентрациях 0,3 мг/л.

В лаборатории клеточной биотехнологии разработана технология адаптации пассированного материала, а точнее – получения из него рассады, пригодной для выращивания в оранжерее [13, 14]. Наилучшие результаты по всем показателям развития и жизнеспособности были получены на ионитном субстрате Биона 112, приживаемость в котором составила 96%. Полностью адаптированные в оранжерее растения зацветали в следующем сезоне.

Гладиолус (*Gladiolus × hybridus hort.*) – один из основных представителей луковичных орнаментальных растений. Традиционно гладиолусы размножают посевом клубнелуковичек, делением клубнелуковиц и семенами. Техника клонирования *in vitro* сокращает продолжительность жизненного цикла гладиолуса в несколько раз по сравнению с развитием в естественных условиях, при этом коэффициент размножения повышается на порядок. В стерильную культуры были введены части клубнелуковиц, содержащие латеральную меристему, и клубнелуковички гладиолусов российской селекции сортов Диво Дивное, Большое искушение и Московитянин [15]. Рассмотрены способы микроклонального размножения, основанные на подборе типа экспланта и оптимального состава питательной среды, через каллусную культуру, а также пролиферацию первичных и адвентивных меристем (табл. 14.3).

Таблица 14.3. Количество регенерирующих побегов в культуре ткани латеральной меристемы клубнелуковицы и клубнелуковички в зависимости от концентрации 6-БАП в среде культивирования

Концентрация 6-БАП в среде MS, мг/л	Число побегов на эксплант гладиолуса сорта Диво Дивное, шт.		Число побегов на эксплант гладиолуса сорта Большое искушение, шт.	
	латеральная меристема клубнелуковицы	меристема клубнелуковички	латеральная меристема клубнелуковицы	меристема клубнелуковички
0,5	6,3 ± 0,4	3,2 ± 0,3	7,6 ± 0,8	4,1 ± 0,3
1,0	8,2 ± 0,8	10,5 ± 1,4	10,3 ± 1,1	8,5 ± 0,8
1,5	12,6 ± 1,7	15,4 ± 1,8	11,2 ± 1,7	10,7 ± 2,4
2,0	10,4 ± 1,8	14,2 ± 0,7	14,6 ± 1,9	15,2 ± 1,9
2,5	7,2 ± 0,6	10,1 ± 0,8	8,3 ± 0,9	11,2 ± 1,8

При индукции побегообразования из латеральной меристемы клубнелуковицы и меристемы клубнепочки наиболее эффективны концентрации 6-БАП 1–2 мг/л, позволяющие получать от 10 до 16 побегов. Получена также регенерация побегов и растений из меристемы клубнепочки. Полученные результаты по микрклональному размножению гладиолусов возможно использовать в производственных масштабах, что позволит сократить расходы за счет увеличения коэффициента размножения, а так же сократить сроки получения посадочного материала ценных сортов.

14.2. Редкие и исчезающие виды в коллекции растений *in vitro*

Orchidaceae Juss. Коллекция орхидных *in vitro* – часть коллекционного фонда асептических культур отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси. Работы по формированию коллекции были инициированы в 1997 г., однако активное пополнение коллекционных фондов происходило в течение последних пяти лет. В настоящее время *in vitro* коллекция орхидных насчитывает более 60 таксонов, 84% составляют виды и гибриды орхидных из зон тропического и субтропического климата. Доля природных видов среди них составляет 33%. Остальная часть представлена хозяйственно ценными гибридами.

При получении асептических культур видов и гибридов первого поколения использовали посев семян. С помощью этого метода получены *in vitro* культуры следующих видов: *Bletilla striata* [Thumb.] Rchb., *Cattleya bowringiana* Veitch, *Cymbidium finlaysonianum* Lindl., *C. lowianum* Rchb., *Stanhopea tigrina* var. *nigroviolacea* Morren и др. В качестве основной среды культивирования использовали среду MS без регуляторов роста [16]. При получении *in vitro* культур хозяйственно ценных гибридов и сортов орхидных использовали вегетативные органы, содержащие меристематические ткани: апикальные и пазушные почки побегов, спящие почки цветоносов. Основной средой для культивирования была среда MS в различных модификациях. Для преодоления отрицательного воздействия фенольных эксудатов в среды добавляли активированный уголь в концентрации 1 г/л или поливинилпирролидон в концентрации 150 мг/л. Адаптацию размноженных *in vitro* культур проводили в микропарничках в условиях оранжереи. В качестве основного субстрата для первого этапа адаптации использовали сфагновый мох. При адаптации *Phalaenopsis* hybr. × *hybridum* hort. к условиям *ex vitro* возможна замена чистого сфагнома на смесь сфагнум: торф 1:1 [17].

Нами были отработаны приемы введения в культуру *in vitro* и адаптации *ex vitro* орхидных из зон умеренного климата, произрастающих на территории Республики Беларусь и сопредельных государств. Полученные асептические культуры включены в состав коллекции отдела. Из видов, включенных в Красную книгу Республики Беларусь, в коллекции представлены: *D. majalis* Rchb., *Malaxis monophyllos* Sw., *Cypripedium calceolus* L. Введение в культуру *in vitro* осуществляли с помощью посева зрелых и незрелых семян. При ини-

циации асептических культур орхидных умеренного климата использовали среды Fast [18] для *Dactylorhiza*, *Platanthera*, *Malaxis* и ВМ [19] для *Cypripedium*. После того как в апикальной части протокорма начинал развиваться побег, их разделяли и пикировали на среды для дорастивания. Культивирование посевов проводили по общеизвестным методикам [20].

Помимо орхидных на сегодняшний момент получены асептические культуры ряда других охраняемых растений, включенных в Красную книгу Республики Беларусь.

***Adenophora liliifolia* (L.) A. DC. (Бубенчик лилиелистный)** – многолетнее травянистое растение сем Campanulaceae Juss. В Беларуси этот вид находится за северной границей ареала. Внесен в Приложение II к Директиве Европейского союза о местах обитания. Для получения асептических культур *A. liliifolia* использовали посев предварительно отстерилизованных семян. В качестве основной среды культивирования была использована среда MS. Существенное влияние на всхожесть *A. liliifolia* оказывало культивирование посевов на свету. В целом показатель всхожести был выше в условиях постоянной освещенности по сравнению с культивированием в темноте. Предварительная обработка гиббереллинами также существенно повышает всхожесть семян *A. liliifolia*. Причем оптимальным является использование ГК₃ в концентрации 50 мг/л и выше. Полученные проростки переносят в колбы на среду MS с добавлением 0,2 мг/л 6-БАП и 0,02 мг/л ИУК для последующего размножения. Культивирование побегов осуществляют при стандартных условиях.

В семействе **Ирисовых (*Iridaceae* Juss.)** более 70 родов дикорастущих и декоративных видов. Ирис сибирский (*Iris sibirica* L.) включен в Красную книгу Республики Беларусь. Изучены особенности регенерационных процессов в культуре ткани ириса сибирского и разработаны методики микроклонального размножения. Установлено, что оптимальная концентрация 6-БАП на этапе клонирования ириса сибирского – 1 мг/л [21]. На этапе укоренения *in vitro* использовали нафтилуксусную кислоту (НУК), ИМК, ИУК в концентрациях 0,1; 0,3; 0,6; 1,0 мг/л, наиболее эффективны были ауксины в концентрации 0,3 мг/л. Адаптированные растения высаживали в открытый грунт на участок коллекционных декоративных растений. На зиму растения первого года укрывали с целью защиты от вымерзания. В следующем сезоне растения зацвели.

14.3. Лекарственные растения в коллекции культур *in vitro*

Растительное сырье служит источником более трети всех лекарственных средств. В лаборатории клеточной биотехнологии разработаны условия культивирования в составе коллекции *in vitro* руты душистой (*Ruta graveolens* L.), многоколосника морщинистого (*Agactache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze), шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi), шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), кадила сарматского (*Melitis sarmatica* Klokov), воровейника лекарственного (*Lithospermum officinale* L.), трех видов наперстянки

рода *Digitalis* L., стевии (*Stevia rebaudiana* Bertoni), зверобоя кустарникового (*Hipericum* Hidcote), полыни белойлочной (*Artemisia hololeuca* Bieb. ex Bess).

Использование клеточных биотехнологий позволяет создать научно-теоретическую базу для разработки современных приемов повышения содержания ценных метаболитов в растениях, используемых в фармацевтической, пищевой промышленности и сельском хозяйстве [22].

Многоколосник морщинистый *Agastache rugosa* (Fisch. et Mey.) Kuntze – многолетнее травянистое растение, которое относится к роду *Agastache* Clayt. Ex Gronow семейства *Lamiaceae* Martinov. Это растение входит в десятку наиболее используемых трав восточной медицины, обладая иммуномодулирующим, бактерицидным, антиоксидантным свойствами [23, 24]. Введение в культуру *in vitro* многоколосника осуществляли семенами. Разработаны методики культивирования *A. rugosa* на среде MS (табл. 14.4).

Таблица 14.4. Развитие представителей семейства *Lamiaceae* в культуре *in vitro* в зависимости от типа и концентрации цитокинина

Вид	Цитокинин, мг/л	Число побегов на эксплант, шт.	Длина побега, см	Образование корней, %
<i>Agastache rugosa</i>	Контроль	1,0 ± 0,1	5,6 ± 0,3	56,3
	6-БАП			
	0,5	3,2 ± 0,6	2,7 ± 0,9	0
	1,5	3,7 ± 0,9	1,8 ± 0,3	0
	2,0	8,1 ± 1,4	0,9 ± 0,4	0
	Кинетин			
	0,5	1,1 ± 0,1	4,9 ± 0,9	66,0
	1,5	1,6 ± 0,8	4,4 ± 0,5	33,3
	2,0	2,6 ± 1,2	4,3 ± 1,4	16,6
	<i>Melittis sarmatica</i>	Контроль	1,0 ± 0,2	6,4 ± 1,5
6-БАП				
0,5		1,8 ± 0,3	4,7 ± 1,0	32,0
1,5		2,4 ± 0,3	3,5 ± 1,1	12,0
2,0		3,5 ± 0,7	3,8 ± 1,2	0
Кинетин				
0,5		1,0 ± 0,2	4,1 ± 0,5	34,0
1,5		1,2 ± 0,3	3,2 ± 0,8	40,0
2,0		1,3 ± 0,1	3,8 ± 0,3	37,0
<i>Salvia officinalis</i>		Контроль	1,0 ± 0,1	2,9 ± 0,4
	6-БАП			
	0,5	1,8 ± 0,4	1,4 ± 0,4	0
	1,5	4,3 ± 0,9	2,1 ± 0,6	0
	2,0	3,4 ± 0,8	1,5 ± 0,7	0

Для изучения морфогенетической активности многоколосника морщинистого и получения растений-регенерантов использовали листовые и стеблевые экспланты, которые в виде сегментов одинакового размера высаживали на питательную среду MS, дополненную цитокининами и ауксинами (рис. 14.3) [25].

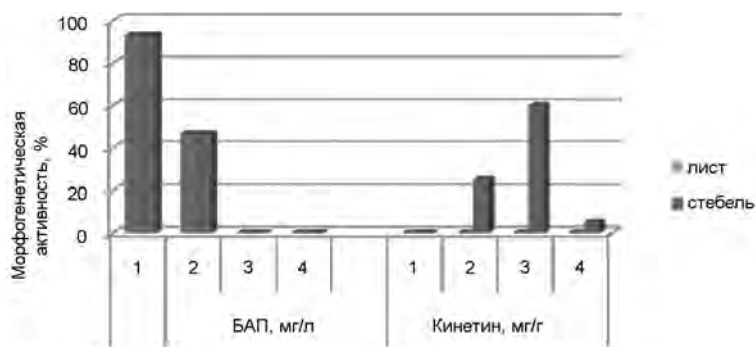


Рис. 14.3. Морфогенетическая активность листовых и стеблевых эксплантов многоколосника морщинистого в культуре *in vitro* на средах с добавлением 6-БАП и кинетина

В результате проведенных исследований получены растения-регенеранты. Биохимический анализ регенерантов показал отличия по содержанию суммы фенольных соединений, флавонолов, дубильных веществ и акацетина (рис. 14.4). Получены соматоклоны, превосходящие исходную форму по количеству вторичных метаболитов [26].

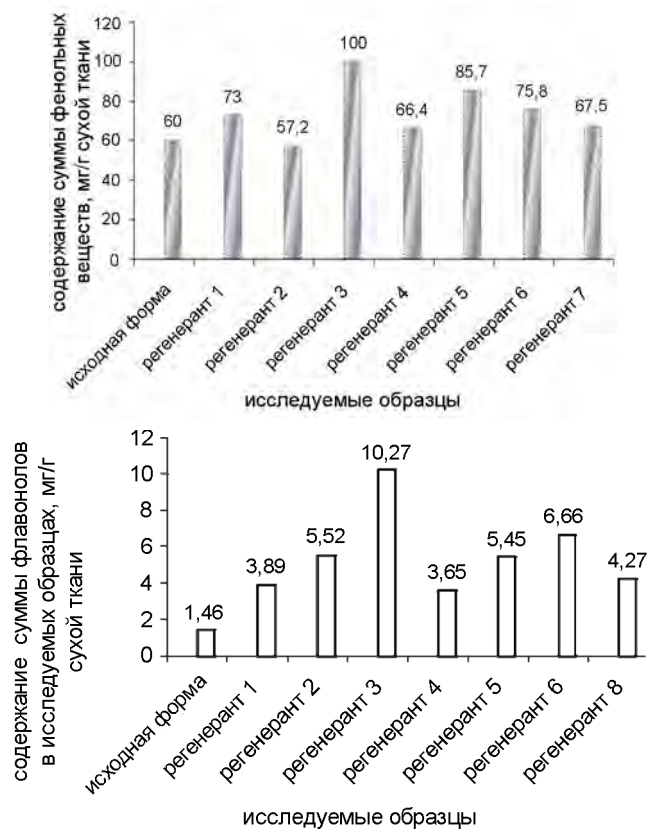


Рис. 14.4. Содержание вторичных метаболитов в соматоклонах многоколосника морщинистого

Шлемник байкальский (*Scutellaria baicalensis* Georgi) – одно из древнейших растений традиционной медицины восточных стран, включен в региональные Красные книги. Главные действующие вещества шлемника – флавоноиды, в составе которых производные апигенина, лютеолина, скутелляреина, изоскутелляреина, картемидина и изокартемидина [27]. Установлено, что препараты флавоноидов шлемника байкальского проявляют противовоспалительное, антитромбическое и антибактериальное действие [28, 29].

Разработаны методики культивирования *S. baicalensis*. Получена каллусная культура шлемника байкальского из листовых и стеблевых эксплантов на модифицированных питательных средах. **Максимальная интенсивность каллусообразования** наблюдается при применении сред с концентрациями 2,4-Д 0,3 мг/л, и 0,5 мг/л [30]. Культивирование каллусной ткани *Scutellaria baicalensis* производилось на питательной среде со следующим сочетанием фитогормонов: 0,1 мг/л 6-БАП+ 0,5 мг/л 2,4-Д.

Кадило сарматское (*Melittis sarmatica* Klokov). В сырье содержатся эфирное масло, кумарины, флавоноиды. Учитывая ограниченные природные запасы растения и сложность его размножения семенами, проведены исследования по введению кадила сарматского в культуру *in vitro* с разработкой методов его микрклонального размножения (см. табл. 14.4). Коэффициент размножения для *M. sarmatica* составлял от 1,8 до 3,5. Присутствие 6-БАП в среде культивирования также привело к увеличению высоты побегов почти в 2 раза по сравнению с контрольными вариантами.

Воробейник лекарственный (*Lithospermum officinale* L.). Надземные части растения содержат органические и фенольные кислоты, флавоноиды, нафтохиноны. Для введения в культуру *in vitro* воробейника лекарственного использовали семена. Для поддержания активно растущей культуры *in vitro* воробейника лекарственного использовали черенки полученной стерильной культуры путем пересадки на питательные среды с различным содержанием гормонов (рис. 14.5, см. цв. вклейку).

Шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.) характеризуется высоким содержанием эфирных масел (0,5–2,5%), фенольных соединений, дубильных веществ, флавоноидов, растительного антибиотика сальвинона и витамина Р. Культивирование на среде MS с содержанием цитокининов позволило значительно повысить коэффициент размножения (см. табл. 14.4). Определены факторы, которые влияют на морфогенетический потенциал и сохранение стабильности генотипа полученных микропобегов. Установлено, что на характер развития растений *in vitro* оказывает влияние гормональный состав среды и тип экспланта. Для стимуляции ризогенеза в среду культивирования добавляли ауксины – ИУК и ИМК. Методы культивирования шалфея лекарственного в культуре *in vitro* позволяют разработать технологию получения каллусных и суспензионных культур с высоким выходом биомассы и синтеза биологически активных веществ (БАВ).

Рута душистая (*Ruta graveolens* L.) – многолетнее травянистое растение, богатое БАВ. В ней содержатся фурукумарины, алкалоиды, флавоноиды и 0,3–0,4% сложного по химическому составу эфирного масла. Для получения активно растущей культуры *in vitro* руты душистой стерильные черенки высаживали на питательные среды с различным содержанием гормонов (табл. 14.5). Добавление в питательную среду ауксинов в разных концентрациях эффективно повлияло на процессы корнеобразования. На средах с добавлением ИМК и 1,5 и 2,0 мг/л ИУК наблюдали 100%-е укоренение черенков [31, 32].

Таблица 14.5. Влияние ауксинов (ИУК и ИМК) на процесс укоренения черенков *Ruta graveolens*

Концентрация ауксина, мг/л	Укоренившиеся растения, %	Количество корней на побег, шт	Средняя длина корней, см	Каллус в основании побега, +/-
Контроль	56,8	8,3 ± 0,8	1,5 ± 0,2	–
ИМК				
0,5	100	10 ± 0,8	13,8 ± 0,8	–
1,0	100	8,2 ± 0,4	8,9 ± 0,7	+
2,0	100	7,1 ± 0,3	7,2 ± 0,6	+
ИУК				
0,5	85,7	2,6 ± 0,5	2,2 ± 0,7	–
1,0	100	4,7 ± 0,8	1,8 ± 0,5	–
2,0	100	4,5 ± 0,6	2,5 ± 0,1	–

При введении в культуру *in vitro* **наперстянки (*Digitalis* L.)**, являющейся природным источником стероидных соединений карденолидов, обладающих кардиотонической активностью, были использованы семена трех видов рода *Digitalis* L.: наперстянка шерстистая (*D. lanata* Ehrh.), наперстянка пурпурная (*D. purpurea* L.) и наперстянка крупноцветковая (*D. grandiflora* Mill.). Разработаны методы культивирования, микрклонального размножения, регенерации побегов в культуре ткани представителей рода *Digitalis* L.

В ботанических садах мира созданы банки культур растений *in vitro* и используются различные методические подходы для их сохранения [33–35]. В одних случаях хранение культур осуществляется без нарушения процесса роста, в других при замедлении (депонирование) или при полной остановке роста (криосохранение). Замедления 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 (1–10 °С) способствует замедленному росту растений с более продолжительным периодом между пересадками – 6–24 мес. (рис. 14.6, см. цв. вклейку). Часто для депонирования растений в коллекции *in vitro* используют *ретарданты* – вещества, способные тормозить удлинение стеблей растения.

14.4. Хозяйственно ценные растения рода *Vaccinium* L. в коллекции растений *in vitro*

В отделе биохимии и биотехнологии ЦБС НАН Беларуси с 1990-х гг. проводят комплексные исследования ценных в фармакологическом и пищевом отношении культур голубики высокорослой, клюквы крупноплодной и брусники обыкновенной на основе биотехнологических, биохимических и генетических подходов. Проведены исследования по оптимизации протокола микроклонального размножения 27 сортов голубики высокой, 2 сортов голубики низкорослой, 1 сорта голубики узколистной, 7 сортов брусники обыкновенной и 8 сортов клюквы крупноплодной. Оптимизированы условия инициации и культивирования асептических культур побегов интродуцированных сортов древесно-кустарниковых видов рода *Vaccinium* L. Подобраны тип первичного экспланта и условия его стерилизации, минеральный и гормональный состав питательных сред для инициации асептических культур, минеральный и гормональный состав питательных сред на этапе стабилизации культур *in vitro* (первое-третье субкультивирование). Исследована зависимость эффективности регенерации побегов из первичных меристем от генотипа, экзогенных регуляторов роста и физических условий культивирования на этапе размножения. Интенсифицированы процессы укоренения и адаптации размноженных *in vitro* регенерантов.

В качестве эксплантов для инициации стерильных культур использовали черенки с 2–3 пазушными почками или апикальной почкой активно растущих зеленых побегов. Оптимальной средой для инициации стерильной культуры стала модифицированная нами среда **Woody Plant Medium (WPM)**, содержащая: 5 мг/л зеатина – для всех исследуемых генотипов голубики, 15 мг/л 2иП и 4 мг/л ИУК – для брусники обыкновенной, 2 мг/л 2иП – для клюквы крупноплодной. Нами определены продолжительность и оптимальные условия стабилизации культур побегов интродуцированных сортов голубики, брусники обыкновенной и клюквы крупноплодной. Оптимальной средой на этапе стабилизации асептической культуры голубики является модифицированная среда WPM, содержащая 3 мг/л зеатина. Для брусники обыкновенной на этапе стабилизации культуры экспланты целесообразно выращивать на модифицированной среде WPM, дополненной 15 мг/л 2иП и 4 мг/л ИУК. Оптимальной средой для стабилизации культуры клюквы является модифицированная среда WPM, содержащая 2 мг/л 2иП. Наиболее высокий коэффициент размножения и наименьшее количество развития аномалий получены на модифицированной среде WPM, содержащей: 5 мг/л 2иП и 1 мг/л ИУК – для всех исследуемых генотипов голубики и брусники обыкновенной, 0,2 мг/л 2иП – для клюквы крупноплодной. Высокая интенсивность пролиферации побегов характерна для голубики высокой сортов Элизабет, Блюкроп, Легаси, брусники обыкновенной сорта Коралл, клюквы крупноплодной сорта Франклин. Один из главных физических факторов, воздействующих на органогенез, – световой

режим культивирования. Установлено, что у всех исследуемых генотипов интенсивность регенерационных процессов была выше при освещении 2000 лк.

Одна из важнейших задач при разработке эффективной методики микроклонального размножения – интенсификация укоренения размноженных *in vitro* регенерантов. Перспективно укоренение побегов в асептических условиях. Существенное влияние на реализацию морфогенетического потенциала в процессе укоренения оказала видовая и сортовая принадлежность исходного экспланта. Наиболее интенсивно (95–100% укоренения) процессы адвентивного корнеобразования протекали у клюквы крупноплодной – на среде, содержащей 0,5 мг/л ИМК, у голубики высокой – на средах с добавлением 1 мг/л ИУК или 1 мг/л ИМК, у брусники обыкновенной – на средах с добавлением 2 мг/л ИУК.

Результатом многолетней масштабной работы стали разработанные эффективные технологии микроклонального размножения интродуцированных сортов голубики, брусники обыкновенной и клюквы крупноплодной [36–39].

Создание коллекций растений – наиболее эффективный путь сохранения, обогащения и рационального использования генетического разнообразия. Возможности пополнения генофонда растений Беларуси новыми полезными образцами далеко не исчерпаны, во всем мире не прекращаются работы по созданию новых форм и сортов растений. Поэтому привлечение, описание и включение в коллекционные фонды нового генетического материала продолжает оставаться важнейшей задачей держателей ботанических коллекций, в особенности ботанических садов, демонстрирующих биоразнообразие растительного мира. В основе методических подходов изучения коллекций лежит принцип максимального охвата генетического разнообразия, включая дикорастущие виды, интродуцированные растения, а также коллекционный фонд растений, культивируемых *in vitro*. В результате исследований разработаны эффективные методы микроклонального размножения и получения растений-регенерантов в культуре ткани *in vitro* с оценкой морфогенетического потенциала различных культур при отборе на селективных средах. Коллекция растений *in vitro* пополнена ценными и перспективными для Беларуси генотипами растений. Дана оценка адаптационному потенциалу клонированных растений. Коллекция растений *in vitro* позволяет сохранять и неограниченно долго поддерживать генетические коллекции растений без изменения их наследственной основы. Сохранение генофонда в культуре *in vitro* – важное достижение биотехнологии.