

# **ВЕСЦІ**

**НАЦЫЯНАЛЬнай  
АКАДЭМІІ НАВУК БЕЛАРУСІ**

---

---

СЕРЫЯ БІЯЛАГІЧНЫХ НАВУК 2012 № 3

---

---

# **ИЗВЕСТИЯ**

**НАЦИОНАЛЬНОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ**

---

---

СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК 2012 № 3

---

---

**ЗАСНАВАЛЬНІК – НАЦЫЯНАЛЬНАЯ АКАДЭМІЯ НАВУК БЕЛАРУСІ**

Часопіс выдаецца са студзеня 1956 г.

Выходзіць чатыры разы ў год

# **PROCEEDINGS**

**OF THE NATIONAL ACADEMY  
OF SCIENCES OF BELARUS**

---

---

BIOLOGICAL SERIES 2012 N 3

---

---

**FOUNDER IS THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF BELARUS**

The Journal has been published since January 1956

Issued four times a year

УДК 581.14.6:634.738:634:737

Е. Н. КУТАС, М. В. ГАРАНИНОВА

**ВЛИЯНИЕ НЕТРАДИЦИОННЫХ ДОБАВОК,  
ВНОСИМЫХ В ПИТАТЕЛЬНУЮ СРЕДУ,  
НА СКОРОСТЬ РОСТА СТЕРИЛЬНЫХ КУЛЬТУР РОДОДЕНДРОНОВ**

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск,  
e-mail: vinogradova-kira@tut.by

(Поступила в редакцию 18.08.2011)

**Введение.** Депонирование коллекции стерильных культур – сложный, многофакторный физиологический процесс, базирующийся, с одной стороны, на изменении кинетики роста стерильных культур в сторону ее замедления, а с другой – на сохранении жизнеспособности и генетической стабильности регенерантов, длительно не пересаживаемых на свежие питательные среды.

Одним из основополагающих этапов в разработке технологии депонирования коллекции стерильных культур является изучение многочисленных факторов, влияющих на снижение скорости роста регенерантов и сохранение ими жизнеспособности без обновления питательных сред.

Депонирование стерильных культур растений, т. е. их длительное сохранение без пересадок, – одна из важнейших проблем клонального микроразмножения растений, поскольку частые пересадки сопряжены с существенными недостатками. К недостаткам следует отнести, во-первых, возможность появления соматоклональной изменчивости (из-за нарушения генетической стабильности часто пересаживаемого материала); во-вторых, опасность загрязнения чужеродным генетическим материалом и случайной утерей собственного генетического материала; в-третьих, трудоемкость процессов (необходимость регулярной пересадки на свежую питательную среду); в-четвертых, высокая стоимость компонентов питательной среды, требуемых для частых пересадок.

Изложенное достаточно ясно свидетельствует о необходимости изменения кинетики роста стерильной культуры и увеличения временного интервала между пересадками до максимально возможного. Хранение культуры в состоянии замедленного роста даст возможность значительно уменьшить расход дорогостоящих валютных реактивов на этот процесс, будет способствовать поддержанию генетической стабильности коллекционного материала, позволит создать банк культур *in vitro* и быстро реагировать на любой спрос потребителя независимо от времени года.

Замедление роста стерильной культуры можно достигнуть несколькими путями: 1) снижением температуры культивирования [1–5]; 2) изменением концентрации углеводов в среде [6–12]; 3) индукцией осмотического стресса [13–15]; 4) использованием ретардантов [16, 17]; 5) снижением атмосферного давления в культуральных сосудах [18–21]; 6) изменением состава питательной среды [6–7].

Однако, несмотря на общий подход к выявлению оптимальных условий сохранения *in vitro* растений, для многих культур, размножаемых *in vitro*, эти методы не разработаны вообще. К таким растениям принадлежат интродуцированные сорта голубики высокой, рододендроны.

На наш взгляд, одним из путей решения данной проблемы является замедление роста с помощью нетрадиционных компонентов питательной среды.

Цель настоящего исследования заключалась в определении концентраций нетрадиционных компонентов питательных сред (элеутерококка колючего, родиолы розовой, лимонника китай-

ского), необходимых для снижения скорости роста и сохранения жизнеспособности регенерантов стерильных культур без длительного обновления питательных сред.

**Объекты и методы исследования.** Объектами исследования служили четыре вида рододендронов: Форчуна (*Rhododendron fortunei* Lindl), японский желтая форма (*Rh. japonicum* (A. Gray) Suring.), Кочи (*Rh. Kotschyi* Simonk), Давида (*Rh. Davidsonii*) и один сорт голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) – *Concord* из коллекции стерильных культур.

Одновозрастные регенеранты каждого вида, высотой 10 мм, были высажены в колбы одинакового объема, по 25 шт. в каждую, на агаризированную среду WPM [32], содержащую 2,5, 4,0, 5,5 мл/л экстракта элеутерококка колючего; 2,0, 3,5, 5,0 мл/л экстракта родиолы розовой; 1,5, 3,0, 4,5 мл/л экстракта лимонника китайского и контрольный вариант, не содержащий экстрактов в питательной среде. Все компоненты питательной среды отечественного производства и стран СНГ. Экстракты элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus* Max.), родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.), лимонника китайского [*Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill.] приобретали в аптеке.

Культивирование рододендронов и голубики проводили при температуре 25 °С, относительной влажности воздуха 70 %, фотопериоде 16 ч, освещенности 4000 лк. Показания снимали через 2, 4, 6, 8, 12, 15 мес с момента посадки растений на питательную среду. В качестве диагностических признаков реакции рододендронов и голубики на содержание экстрактов в среде были взяты следующие показатели: высота растений и их жизнеспособность. Поставлено пять независимых опытов с трехкратной биологической повторностью каждый. В табл. 1–3 приведены средние арифметические и их стандартные ошибки.

Т а б л и ц а 1. Влияние различных концентраций экстракта элеутерококка колючего в питательной среде WPM на рост и жизнеспособность стерильных культур рододендронов

Вид	Продолжительность культивирования, мес	Показатель	Концентрация настойки элеутерококка, мл/л			
			0 (контроль)	2,5	4,0	5,5
Рододендрон Форчуна	2	ВР	15,70 ± 5,10	19,11 ± 3,71	12,92 ± 2,93	14,72 ± 4,83
		ЖС	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
	4	ВР	35,41 ± 3,91	30,92 ± 6,22	33,12 ± 4,52	32,13 ± 6,73
		ЖС	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
	6	ВР	44,70 ± 4,21	45,80 ± 8,04	43,41 ± 8,42	39,21 ± 5,13
		ЖС	3,50 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
	8	ВР	56,23 ± 5,41	50,80 ± 3,42	52,31 ± 7,50	48,73 ± 3,83
		ЖС	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,50	2,70 ± 0,50	2,70 ± 0,50
	12	ВР	60,81 ± 0,01	60,0 ± 1,53	50,52 ± 6,60	48,12 ± 4,72
		ЖС	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,50 ± 0,00	3,50 ± 0,50
	15	ВР	60,81 ± 0,01	60,0 ± 1,53	50,52 ± 6,60	48,12 ± 4,72
		ЖС	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,50 ± 0,00
Рододендрон Японский (желтая форма)	2	ВР	7,22 ± 1,70	9,03 ± 1,81	8,10 ± 2,01	6,91 ± 1,40
		ЖС	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
	4	ВР	11,09 ± 1,87	15,40 ± 2,09	10,95 ± 0,90	7,83 ± 1,30
		ЖС	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
	6	ВР	13,23 ± 1,51	16,60 ± 4,30	12,20 ± 2,92	8,82 ± 0,11
		ЖС	3,50 ± 0,50	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
	8	ВР	14,2 ± 3,10	20,08 ± 0,19	14,03 ± 1,02	9,77 ± 0,16
		ЖС	2,50 ± 0,00	3,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00
	12	ВР	16,13 ± 0,74	22,45 ± 0,95	14,43 ± 2,12	10,2 ± 3,51
		ЖС	1,00 ± 0,00	2,50 ± 0,00	2,80 ± 0,00	3,00 ± 0,00
	15	ВР	16,13 ± 0,74	22,45 ± 0,95	14,43 ± 2,12	10,2 ± 3,51
		ЖС	0,00 ± 0,00	2,50 ± 0,00	2,50 ± 0,20	3,00 ± 0,00

П р и м е ч а н и е. ВР – высота растений в мм, ЖС – жизнеспособность растений в баллах. Для оценки жизнеспособности регенерантов в контроле и опытах использовалась 5-балльная шкала, согласно которой: 4 балла – максимальная жизнеспособность растений (нет некрозов), 3 балла – некроз листьев и побегов менее 50 %, 2 балла – некроз листьев и побегов 50 %, 1 балл – некроз листьев и побегов более 50 %, 0 баллов – визуальная гибель растений, 100 % некроз. То же для табл. 2 и 3.

Т а б л и ц а 2. Влияние различных концентраций экстракта родиолы розовой в питательной среде WPM на рост и жизнеспособность стерильных культур рододендронов

Вид	Продолжительность культивирования, мес	Показатель	Концентрация настойки родиолы розовой, мл/л				
			0 (контроль)	2,0	3,5	5,0	
Рододендрон Кочи	2	ВР	17,10 ± 4,13	13,14 ± 3,18	14,28 ± 2,27	16,23 ± 3,25	
		ЖС	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	
	4	ВР	22,18 ± 5,16	21,07 ± 2,11	24,14 ± 1,50	24,10 ± 0,07	
		ЖС	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	3,70 ± 0,50	
	8	ВР	28,21 ± 6,40	30,80 ± 4,41	31,30 ± 7,50	34,10 ± 8,81	
		ЖС	3,50 ± 0,50	3,50 ± 0,50	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	
	12	ВР	33,61 ± 3,44	39,82 ± 7,34	34,36 ± 4,70	45,60 ± 11,13	
		ЖС	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	2,80 ± 0,20	2,30 ± 0,50	
	15	ВР	33,61 ± 3,44	39,82 ± 7,34	34,36 ± 4,70	45,60 ± 11,13	
		ЖС	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	2,80 ± 0,20	2,30 ± 0,50	
	Рододендрон Давида	2	ВР	7,31 ± 1,12	14,10 ± 4,15	10,20 ± 2,16	12,80 ± 2,13
			ЖС	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
4		ВР	10,12 ± 0,19	27,62 ± 7,53	20,33 ± 4,18	20,70 ± 2,18	
		ЖС	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	
8		ВР	23,21 ± 3,10	28,17 ± 7,27	28,10 ± 6,19	27,30 ± 4,13	
		ЖС	3,30 ± 0,50	3,60 ± 0,50	3,00 ± 0,00	3,30 ± 0,50	
12		ВР	26,21 ± 9,18	28,23 ± 7,14	42,93 ± 9,16	55,53 ± 9,17	
		ЖС	1,00 ± 0,00	3,30 ± 0,50	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	
15		ВР	26,21 ± 9,18	28,23 ± 7,14	42,93 ± 9,16	55,53 ± 9,17	
		ЖС	1,00 ± 0,00	3,30 ± 0,50	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	

Т а б л и ц а 3. Влияние различных концентраций экстракта лимонника китайского в питательной среде WPM на рост и жизнеспособность регенерантов голубики высокой

Сорт	Продолжительность культивирования, мес	Показатель	Концентрация лимонника китайского, мл/л			
			0 (контроль)	1,5	3,0	4,5
Конкорд	2	ВР	13,84 ± 2,01	15,31 ± 4,42	17,12 ± 2,15	12,15 ± 1,18
		ЖС	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00	4,00 ± 0,00
	4	ВР	20,61 ± 2,41	24,50 ± 1,23	21,17 ± 2,07	18,10 ± 2,11
		ЖС	4,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,50 ± 0,00	4,00 ± 0,00
	8	ВР	29,20 ± 2,14	30,18 ± 1,41	33,71 ± 1,51	26,70 ± 1,18
		ЖС	2,50 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	3,50 ± 0,50
	12	ВР	35,91 ± 2,18	49,2 ± 1,70	41,14 ± 1,15	33,51 ± 1,20
		ЖС	2,30 ± 0,00	2,50 ± 0,00	2,80 ± 0,10	3,30 ± 0,00
	15	ВР	35,91 ± 2,18	49,2 ± 1,70	41,14 ± 1,15	33,51 ± 1,20
		ЖС	1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,40	2,00 ± 0,00	2,50 ± 0,00

**Результаты и их обсуждение.** Из табл. 1 следует, что экстракт элеутерококка колючего в концентрации 5,5 мл/л способствует снижению скорости роста рододендронов Форчуна и японского (желтая форма), сохранению ими жизнеспособности в течение 15 мес без пересадки на свежую питательную среду. Стало быть концентрацию (5,5 мл/л) экстракта элеутерококка колючего можно использовать для депонирования данных видов рододендронов.

Анализ материала, представленного в табл. 2, показал, что экстракт родиолы розовой способствовал увеличению скорости роста исследованных видов рододендронов. Особенно четко эта закономерность проявилась у рододендрона Давида при концентрации родиолы розовой 5,0 мл/л. Эту концентрацию (5 мл/л) экстракта родиолы розовой можно использовать для клонального микроразмножения исследованных видов рододендронов.

Известно, что фенольные соединения в растениях обладают широким спектром функций. Входят в состав лигнина и суберина, являются исходными компонентами клеточной стенки; выполняют антиоксидантную роль, защищая клеточные структуры от коротковолнового УФ-излучения свободных радикалов [22–25, 30–31].

Основным компонентом, определяющим фармакологическую и антиоксидантную активность родиолы розовой, является салидрозид [26].

Г. Г. Гарифуллиной с соавт. было показано [27], что салидрозид обладает бифункциональными свойствами, т. е. проявляет себя как ингибитор или инициатор окислительных процессов. Проявление того или иного свойства зависит от концентрации салидрозид в реакционной среде: при низких концентрациях салидрозид выступает как ингибитор окислительных процессов, при высоких – как инициатор.

По-видимому, этими химическими свойствами салидрозид определяется и его биологический эффект. Исследования, проведенные М. М. Ишмуратовой [28] в условиях культуры тканей растений, показали, что низкие концентрации (5 %) экстрактов корневищ родиолы розовой, введенные в состав питательных сред, стимулируют ростовые процессы эксплантов растений, высокие концентрации (10 %) задерживают рост растений, а часто и разрушают ткани эксплантов.

М. М. Ишмуратова [29] исследовала влияние экстрактов *Rhodiola rosea*, входящих в состав питательных сред, на морфогенетические характеристики растительных эксплантов *Rhodiola rosea* и *Rh. iremelica in vitro*. Ею показано, что ростостимулирующим эффектом обладают только низкие концентрации экстрактов.

Вероятно, в ситуации со стерильными культурами рододендронов концентрации экстракта родиолы розовой в пределах 2–5 мл/л оказались низкими и стимулировали ростовые процессы исследованных культур. Логично предположить, что более высокие концентрации экстракта родиолы розовой в питательной среде будут ингибировать скорость роста стерильных культур рододендронов. Данное предположение требует экспериментального подтверждения.

Как следует из табл. 3, экстракт лимонника китайского в зависимости от концентрации оказывает двойное действие на скорость роста побегов голубики высокой и их жизнеспособность. При относительно низких концентрациях 1,5 и 3,0 мл/л он способствует увеличению скорости роста побегов и снижению их жизнеспособности в сравнении с контролем, а при относительно высокой концентрации 4,5 мл/л – снижению скорости роста побегов и увеличению их жизнеспособности. В данном случае концентрацию 4,5 мл/л экстракта лимонника китайского можно использовать для депонирования голубики высокой сорта Конкорд, а концентрации 1,5 и 3,0 мл/л – для ускоренного размножения исследованного сорта.

**Заключение.** На основании результатов экспериментальных исследований, полученных по изучению влияния нетрадиционных компонентов питательных сред (элеутерококка колючего, родиолы розовой, лимонника китайского) на скорость роста и сохранение жизнеспособности стерильных культур регенерантов интродуцированных видов рододендронов и сорта голубики высокой без длительного обновления питательных сред, определены концентрации элеутерококка колючего, родиолы розовой, лимонника китайского, необходимые для депонирования стерильных культур регенерантов исследованных видов рододендронов и голубики. Это позволяет рекомендовать питательную среду WPM, дополненную экстрактом элеутерококка колючего в концентрации 5,5 мл/л для сохранения жизнеспособности рододендрона Форчуна и рододендрона японского (желтая форма) течение 15 мес без пересадки на свежую питательную среду. Концентрацию 5 мл/л экстракта родиолы розовой следует использовать для клонального микро-размножения рододендрона Кочи и Давида. Для депонирования голубики высокой сорта Конкорд – экстракт лимонника китайского в концентрации 4,5 мл/л.

## Литература

1. Mullin P. H., Schelegel D. E. // Hort. Sci. 1976. Vol. 11, N 2. P. 100–105.
2. Coman T., Neculae L. // Probl. Genet. Apl. Bucurest. 1981. Vol. 13, N 6. P. 397–401.
3. Westcott R. J. // Potato Research. 1981a. Vol. 24. P. 331–342.
4. Чернец А. М., Абраменко Н. М., Стаканова Р. В. // Биология культивируемых клеток и биотехнология. Новосибирск, 1988. Ч. 2. С. 392.
5. Деменко В. И., Трушечкин В. Г. // Биология культивируемых клеток и биотехнология. Новосибирск, 1988. Ч. 2. С. 393.
6. Самсонова О. Н. // Длительное сохранение пробирочных растений земляники: Автореф. дис. ...канд. биол. наук. М., 1991.
7. Высоцкая О. Н. // Физиол. растен. 1994. Т. 41, вып. 6. С. 935–941.

8. Homes I., Dubus E., Bourdan I. // Plant Tissue Culture. 1982: V. Inter. Congr. of Plant Tissue and Cell. Culture. Japan, 1982. P. 801.
9. Rubluo A., Kartha K. K. // J. Plant Physiol. 1985. Vol. 119, N 5. P. 425.
10. Westcott R. J. // Potato Research. 1981b. Vol. 24. P. 343–352.
11. Tukai S., Morii M., Hasahuru O. // Plant Tissue Cult. Lett. 1988. Vol. 5, N 1. P. 20–25.
12. Codaccioni M., Vesovi P. // Bull. Soc. Bot. Fr. Lett. Bot. 1987. Vol. 134, N 3. P. 269–274.
13. Schilde –Renther L., Espinosa N., Estrada R., Lizarrga R. // Plant Tissue Culture. 1982: V. Inter. Congr. of Plant Tissue and Cell. Culture. Japan, 1982. P. 781.
14. Wanas W. H., Collow J. A., Lindsey A. W. // Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications. London: Butterworths, 1986. P. 285–291.
15. Pua Eng Chong Calvin. // J. Am. Soc. Hort. Sci. 1985. Vol. 10, N 5. P. 705–709.
16. Rostogi R., Sawhney V. // J. Plant. Physiol. 1988. Vol. 133, N 5. P. 620–624.
17. Alleweldt G. // Vitis. 1986. Bd 26, N 2. S. 57–64.
18. Муромцев Г. С., Бутенко Р. Г., Тихоненко Т. И., Прокофьев М. И. // Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М., 1990.
19. Winthers L. A. // Plant Physiol. 1979. Vol. 63. P. 460–467.
20. Brindgen M. P., Staby G. L. // In Handbook of Plant cell culture– Ed. Evens. Sharp. Ammirato, Jamada, Macmillan publ. Company. N. Y., 1983. N 1. P. 816–827.
21. Brindgen M. P., Staby G. L. // Plant Sci. Lett. 1981. Vol. 22, N 1. P. 117–185.
22. Брумтон Г. Биохимия природных пигментов. М., 1986.
23. Запрометов М. Н. // Физиол. растен. 1992. Т. 39, вып. 6. С. 1197–1207.
24. Запрометов М. Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М., 1993.
25. Пахомов В. П., Копейкина А. В., Маркарян А. А. // Российские аптеки. 2003. № 5. С. 20–25.
26. Саратиков А. С., Краснов Е. А. Родиола розовая – ценное лекарственное растение (золотой корень). Томск, 1987.
27. Гарифуллина Г. Г. и др. // Растит. ресурсы. 2000. Т. 36, вып.3. С. 94–99.
28. Ишмуратова М. М. // Вестн. Башкирского ун-та. 2001. № 2. С. 74–76.
29. Ишмуратова М. М. // Биотехнология. 2002. № 6. С. 52–56.
30. Куркин В. А., Евстратова Р. И., Запесочная Г. Г. // Химия природных соединений. 1991. № 6. С. 854–856.
31. Микаэлян Е. М., Мхитарян В. Г. // Биол. журн. Армении. 1986. № 3. С. 593–597.
32. Lloyd G., McCown. // Proc. Intern. Plant Prop. Soc. 1981. N 30. P. 421–427.

*E. N. KUTAS, M. V. GARANINOVA*

### **EFFECT OF NON-CONVENTIONAL ADDITIVES INTRODUCE TO THE NUTRIENT MEDIUM, ON THE GROWTH RATE OF STERILE CULTURES**

#### **Summary**

The results of experimental studies on the effects of different concentrations of extracts of *Eleutherococcus senticosus* Max., *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill., *Rhodiola rosea* L., on the growth and viability of the regenerated sterl cultures of *Rhododendrons* and *Vaccinium corymbosum* L. was presented.