

УДК 581.14.6:634.738

Е. Н. КУТАС, А. А. ГОРЕЦКАЯ

ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ НА СНИЖЕНИЕ СКОРОСТИ РОСТА И СОХРАНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ СТЕРИЛЬНЫХ КУЛЬТУР

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

(Поступила в редакцию 13.12.2012)

Введение. В мировой практике в течение многих лет для поддержания коллекции стерильных культур использовали постоянное выращивание их при оптимальных условиях для данных растений. Однако оказалось, что такое выращивание имеет ряд существенных недостатков: во-первых, возможность появления соматональной 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.

Основным препятствием в хранении растительного материала брусники и голубики является его быстрое старение, ведущее в конечном счете к гибели растения. Чтобы предотвратить этот процесс необходимо регулярно, через каждые 2–3 недели, пересаживать регенеранты на свежие питательные среды.

На наш взгляд, одним из путей решения данной проблемы является замедление роста с помощью осмотических ингибиторов.

Как показал обзор литературы по данному вопросу, сведения, касающиеся влияния осмотических ингибиторов на жизнеспособность регенерантов в культуре *in vitro*, малочисленны [1–3], а для растений голубики высокой и брусники обыкновенной отсутствуют вообще.

Целью исследования явилось изучение влияния различных концентраций маннита и сорбита на жизнеспособность интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной в культуре *in vitro*.

Объекты и методы исследования. В качестве объектов исследования использовали 6 сортов голубики высокой (Bluecrop, Blueray, Dixi, Herbert, Rancocas, Scammel) и 3 сорта брусники обыкновенной (Koralle, Masovia, Erntedank), регенерированных в культуре *in vitro* методом активации пазушных меристем. Опыты проводили с маннитом и сорбитом в диапазоне концентраций 1–3 г/л, на питательной среде WPM, содержащей 4 мг/л индолилуксусной кислоты и 15 мг/л изопентениладенина при фотопериоде 16 ч, освещенности 4000 лк, температуре 25°C.

В ходе экспериментов растения культивировали без пересадки на свежую питательную среду на протяжении 12 мес. Жизнеспособность* материала оценивали по разработанному нами методу, включающему пятибальную шкалу, согласно которой: 0 баллов – гибель растения, 1, 2, 3 – промежуточное состояние, 4 – максимальная жизнеспособность, а также учитывали активацию меристем и скорость роста побегов. Показания снимали по истечении 2, 4 и 12 мес культивирования. Экспериментальные данные приведены в табл. 1–3. Цифры в таблицах являются средними арифметическими значениями для 10 регенерантов каждого сорта.

* Термин «жизнеспособность» использован нами как понятие, характеризующее потенциальную продолжительность жизни растений при культивировании их без обновления питательных сред.

Т а б л и ц а 1. Влияние различных концентраций маннита на жизнеспособность регенерантов *Vaccinium corymbosum* L. и *Vaccinium vitis-idaea* L. в культуре *in vitro*

Сорт	2 мес культивирования					
	среда № 1		среда № 2		среда № 3	
	А	Ж	А	Ж	А	Ж
	<i>Vaccinium corymbosum</i>					
Bluecrop	70,1	3,24±0,39	40,4	3,54±0,29	29,4	3,76±0,17
Blueraу	64,4	3,47±0,64	39,3	3,49±0,39	30,7	3,54±0,71
Dixi	67,1	3,39±0,17	36,1	3,43±0,41	31,3	3,51±0,63
Herbert	69,2	3,38±0,60	31,3	3,46±0,58	30,2	3,65±0,45
Rancocas	58,5	3,48±0,64	29,9	3,49±0,43	37,7	3,53±0,47
Scammel	50,6	3,29±0,73	27,1	3,56±0,81	24,1	3,76±0,29
	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>					
Koralle	70,9	3,23±0,24	50,4	3,81±0,39	50,7	3,89±0,19
Erntedank	76,4	3,76±0,29	53,9	3,74±0,26	51,3	3,81±0,39
Masovia	80,1	3,71±0,31	53,9	3,74±0,39	51,3	3,87±0,45
	4 мес культивирования					
	среда № 1		среда № 2		среда № 3	
Сорт	длина побегов на 1 растение, см	Ж	длина побегов на 1 растение, см	Ж	длина побегов на 1 растение, см	Ж
	<i>Vaccinium corymbosum</i>					
Bluecrop	0,40±0,13	2,89±0,43	0,41±0,15	3,18±0,67	0,39±0,13	3,75±0,29
Blueraу	0,53±0,26	3,01±0,87	0,51±0,19	3,24±0,43	0,29±0,11	3,49±0,34
Dixi	0,39±0,24	3,09±0,94	0,44±0,17	3,31±0,46	0,35±0,15	3,47±0,71
Herbert	0,46±0,17	2,97±0,53	0,48±0,13	3,29±0,37	0,41±0,17	3,61±0,60
Rancocas	0,49±0,41	3,17±0,46	0,54±0,21	3,18±0,60	0,47±0,17	3,41±0,45
Scammel	0,43±0,20	2,98±0,60	0,51±0,29	3,36±0,58	0,48±0,21	3,59±0,58
	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>					
Koralle	1,30±0,78	3,23±0,63	0,75±0,39	3,60±0,45	0,80±0,60	3,84±0,73
Erntedank	1,41±0,67	3,41±0,45	0,89±0,46	3,27±0,71	0,29±0,74	3,76±0,67
Masovia	1,37±0,53	3,35±0,24	0,74±0,49	3,44±0,41	0,77±0,29	3,81±0,24

Пр и м е ч а н и е. А – активация пазушных и верхушечных меристем в процентах; Ж – жизнеспособность, балл; среда № 1 – WPM + 1 г/л маннита; среда № 2 – WPM + 3 г/л маннита; среда № 3 – WPM + 2 г/л маннита; WPM – основная среда для клонального микроразмножения голубики высокой.

Таблица 2. Влияние различных концентраций сорбита на жизнеспособность регенерантов *Vaccinium corymbosum* L. и *Vaccinium vitis-idaea* L. в культуре *in vitro*

Сорт	2 мес культивирования					
	среда № 1		среда № 2		среда № 3	
	А	Ж	А	Ж	А	Ж
	<i>Vaccinium corymbosum</i>					
Bluecrop	64,5	3,01±0,21	56,5	2,84±0,51	57,1	2,93±0,36
Bluetray	69,3	2,99±0,34	61,3	2,73±0,60	64,3	2,81±0,14
Dixi	58,4	3,16±0,41	52,8	2,99±0,16	57,1	3,01±0,13
Herbert	66,7	3,38±0,56	60,7	3,01±0,22	61,4	3,15±0,12
Rancocas	54,2	3,27±0,18	50,3	3,03±0,46	51,1	3,21±0,17
Scammel	62,3	3,03±0,60	58,4	2,89±0,39	59,4	2,91±0,09
	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>					
Koralle	65,9	3,25±0,25	62,9	2,79±0,35	63,4	2,84±0,59
Erntedank	70,4	3,41±0,19	61,7	3,01±0,61	65,2	3,21±0,29
Masovia	67,3	3,34±0,20	59,4	2,99±0,24	64,4	3,15±0,11
	4 мес культивирования					
	среда № 1		среда № 2		среда № 3	
Сорт	длина побегов на 1 растение, см	Ж	длина побегов на 1 растение, см	Ж	длина побегов на 1 растение, см	Ж
	<i>Vaccinium corymbosum</i>					
Bluecrop	0,31±0,21	2,44±0,29	0,22±0,07	2,01±0,18	0,29±0,11	2,31±0,14
Bluetray	0,44±0,07	2,21±0,16	0,39±0,16	2,14±0,27	0,41±0,17	2,25±0,19
Dixi	0,32±0,09	2,36±0,31	0,28±0,19	1,99±0,19	0,29±0,09	2,14±0,22
Herbert	0,37±0,13	2,15±0,32	0,32±0,11	2,44±0,29	0,34±0,19	2,61±0,17
Rancocas	0,41±0,21	2,24±0,60	0,37±0,14	2,36±0,17	0,39±0,12	2,53±0,31
Scammel	0,35±0,16	2,09±0,45	0,33±0,14	2,17±0,07	0,33±0,16	2,35±0,24
	<i>Vaccinium vitis-idaea</i>					
Koralle	1,11±0,41	2,54±0,22	0,31±0,19	2,02±0,16	0,54±0,11	2,39±0,37
Erntedank	1,17±0,60	2,65±0,31	0,37±0,21	2,56±0,21	0,61±0,17	2,81±0,31
Masovia	1,15±0,45	2,71±0,44	0,35±0,24	2,14±0,25	0,60±0,26	2,43±0,21

Примечание. А – активация пазушных и верхушечных меристем в процентах; Ж – жизнеспособность, балл; среда № 1 – WPM + 1 г/л сорбита; среда № 2 – WPM + 3 г/л сорбита; среда № 3 – WPM + 2 г/л сорбита; WPM – основная среда для клонального микроразмножения голубики высокой.

Т а б л и ц а 3. Жизнеспособность (Ж) интродуцированных сортов *Vaccinium corymbosum* L. и *Vaccinium vitis-idaea* L. на различных питательных средах спустя 12 мес культивирования

Сорт	Среда № 4 (сорбит – 1 г/л)		Среда № 5 (сорбит – 2 г/л)		Среда № 6 (сорбит – 3 г/л)	
	длина побегов на 1 растение, см	Ж, балл	длина побегов на 1 растение, см	Ж, балл	длина побегов на 1 растение, см	Ж, балл
<i>Vaccinium corymbosum</i>						
Bluecrop	2,15±0,52	1,39±0,29	1,97±0,30	0,99±0,16	2,07±0,27	1,29±0,19
Bluegray	2,47±0,47	1,54±0,32	2,17±0,32	1,27±0,25	2,33±0,35	1,43±0,29
Dixi	2,91±0,39	1,12±0,51	2,59±0,21	0,84±0,30	2,81±0,40	1,07±0,31
Herbert	2,39±0,54	1,65±0,39	2,36±0,50	1,17±0,35	2,64±0,49	1,44±0,47
Rancocas	2,05±0,46	1,08±0,35	2,84±0,50	0,76±0,19	2,51±0,43	0,89±0,25
Scammel	2,91±0,43	1,39±0,40	2,51±0,49	1,01±0,27	2,43±0,40	1,27±0,33
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>						
Koralle	4,15±0,73	2,05±0,32	4,01±0,69	1,37±0,29	3,15±0,50	1,34±0,39
Erntedank	3,92±0,60	1,94±0,25	3,27±0,54	1,15±0,19	3,07±0,47	1,41±0,20
Masovia	4,25±0,65	1,65±0,30	4,09±0,60	1,29±0,27	3,44±0,39	1,37±0,26
Сорт	Среда № 7 (маннит – 1 г/л)		Среда № 8 (маннит – 2 г/л)		Среда № 9 (маннит – 3 г/л)	
	длина побегов на 1 растение, см	Ж, балл	длина побегов на 1 растение, см	Ж, балл	длина побегов на 1 растение, см	Ж, балл
<i>Vaccinium corymbosum</i>						
Bluecrop	3,21±0,54	1,17±0,35	3,15±0,50	2,01±0,50	3,17±0,51	2,38±0,40
Bluegray	3,87±0,69	2,31±0,40	3,67±0,59	2,04±0,35	3,84±0,67	2,65±0,39
Dixi	3,91±0,71	2,15±0,29	3,51±0,60	2,71±0,34	3,25±0,59	2,83±0,37
Herbert	4,01±0,74	2,01±0,27	3,91±0,65	2,58±0,39	3,01±0,53	1,07±0,18
Rancocas	3,09±0,65	2,54±0,45	3,37±0,70	1,89±0,31	3,67±0,78	2,27±0,33
Scammel	3,23±0,68	1,95±0,31	3,18±0,60	2,12±0,49	3,24±0,59	2,19±0,11
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>						
Koralle	4,21±0,69	2,51±0,37	4,81±0,75	2,61±0,40	4,37±0,70	2,89±0,47
Erntedank	4,39±0,71	2,66±0,40	4,15±0,69	2,84±0,51	4,25±0,67	2,25±0,36
Masovia	4,57±0,80	2,19±0,36	4,37±0,68	2,39±0,44	4,08±0,59	2,91±0,50

Результаты и их обсуждение. Цифровой материал в табл. 1 свидетельствует, что наибольшая активация меристем наблюдалась у всех сортов без исключения на среде № 1, содержащей 1 г/л маннита, в течение первых 2 мес культивирования и составила 50,6–80,1 %. Жизнеспособность регенерантов приближалась к высшей оценке 4 балла на среде № 3, содержащей 2 г/л маннита.

Спустя 4 мес культивирования отмечена максимальная длина побегов на среде №1 у всех сортов голубики высокой (0,39–0,53 см) и брусники обыкновенной (1,30–1,41 см). При этом их жизнеспособность снизилась и составила 2,89–3,23 балла. На наш взгляд, снижение жизнеспособности регенерантов не является случайным, так как завершение их роста сопровождается процессами старения.

У всех сортов отмечена хорошая жизнеспособность, равная 3,41–3,84 балла на среде № 3, содержащей 2 г/л маннита, несмотря на длительное их культивирование (4 мес) без пересадок. Такая концентрация маннита в среде способствовала снижению скорости роста, тем самым предотвращая процессы старения. Можно думать, что маннит в качестве осмотического ингибитора оказывал тормозящее действие на ток воды и пластических веществ – составляющих интегрального и сложного процесса, каким является рост регенерантов.

Анализ экспериментального материала, представленного в табл. 2, дает основание считать, что среда № 3, содержащая 2 г/л сорбита, является оптимальной для сохранения жизнеспособности большинства сортов голубики высокой (Blueray, Herbert, Rancocas, Scammel) и одного сорта брусники обыкновенной (Erntedank) в течение их длительного культивирования (4 мес) без пересадок. Для остальных сортов (Koralle, Masovia, Dixi, Bluecrop) оптимальной следует считать среду № 1, содержащую 1 г/л сорбита.

Таким образом, добавление в питательную среду 2 г/л маннита или 1–2 г/л сорбита способствует снижению скорости роста регенерантов, замедлению процессов старения, сохранению жизнеспособности, что дает возможность увеличить интервал между пересадками до 4 мес вместо 2–4 недель.

Самая высокая жизнеспособность в результате беспересадочного культивирования материала на свежие питательные среды в течение 12 мес отмечена для сорта брусники Masovia – 2,91 балл на среде № 9, содержащей 3 г/л маннита (табл. 3), самая низкая – 0,76 балла для сорта голубики Rancocas на среде № 5, содержащей 2 г/л сорбита. Остальные сорта заняли промежуточное положение.

Это является свидетельством зависимости жизнеспособности как от сортовой принадлежности материала, так и от ингибитора, содержащегося в питательной среде.

Оптимальным вариантом для длительного культивирования в течение 12 мес исследованных сортов голубики высокой следует считать среды (№ 7– № 9), содержащие манит: для 4 сортов – Bluecrop, Blueray, Dixi, Scammel – среду № 9, содержащую 3 г/л маннита, для Herbert – среду № 8, содержащую 2 г/л маннита, для Rancocas – среду № 7, содержащую 1 г/л маннита. В данном случае маннит оказал тормозящее действие на скорость роста голубики высокой, тем самым предотвратив старение, что выразилось в высоком показателе жизнеспособности.

Среды, содержащие сорбит, не могут быть рекомендованы для длительного культивирования (12 мес) интродуцированных сортов голубики высокой и брусники обыкновенной.

Сравнительный анализ жизнеспособности материала в зависимости от его сортовой и видовой принадлежности показал, что у сортов брусники она выше, нежели у сортов голубики. Вероятно, это связано с функциональными особенностями, присущими вечнозеленым кустарничкам, к которым принадлежит брусника. Это свидетельствует о зависимости жизнеспособности регенерантов не только от осмотических ингибиторов в среде, но и от генотипа растения.

Заключение. Результаты экспериментальных исследований позволяют констатировать, что добавление в питательную среду осмотических ингибиторов способствует снижению скорости роста, предотвращению старения и обеспечению жизнеспособности материала на протяжении 12 мес без пересадок его на свежую питательную среду. При этом необходимо учитывать сортовую и видовую специфику исследованного материала, четко проявившуюся при действии ингибиторов, а также избирательное действие самих ингибиторов.

Литература

1. *Высоцкая О. Н.* // Физиол. растен. 1994. Т. 41, № 6. С. 935–931.
2. *Салматова И. С., Дунаева С. Е., Шарова Е. И. и др.* // Растит. ресурсы. 2009. Т. 45, № 4. С. 1–12.
3. *San José M. C., Janeiro L. V., Corredoira E.* // Spanish Journal of Rural Development. 2010. Vol. 1, N 3. P. 31–38.

E. N. KUTAS, A. A. GORETSKAYA

EFFECT OF OSMOTIC INHIBITORS TO REDUCE THE RATE OF GROWTH AND THE CONTINUED VIABILITY OF STERILE CULTURES

Summary

The results of experimental studies on the effects of different concentrations of mannitol and sorbitol on the activation of meristems, growth rate and viability of regenerated sterile cultures 6 varieties of *Vaccinium corymbosum* L. and 3 varieties *Vaccinium vitis-idaea* L. were presented. It was shown the investigated parameters depend on osmotic inhibitors contained in the culture medium, their concentration and varietal identity of plants.

РЕФЕРАТЫ

УДК 581.14.6:634.738

Кутас Е.Н., Горецкая А.А. **Влияние осмотических ингибиторов на снижение скорости роста и сохранение жизнеспособности стерильных культур** // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. 2013. № 4. С. 24–29.

В работе изложены результаты экспериментальных исследований, касающиеся влияния различных концентраций маннита и сорбита на активацию меристем, скорость роста и жизнеспособность регенерантов стерильных культур 6 сортов голубики высокой и 3 сортов брусники обыкновенной. Показано, что активация меристем, скорость роста и жизнеспособность регенерантов исследованных сортов зависят от осмотических ингибиторов, содержащихся в питательной среде, их концентраций и сортовой принадлежности растений.

Табл. 3. Библиогр. – 3 назв.