

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ ГОРИЦВЕТА ВЕСЕННЕГО (*ADONIS VERNALIS* L.) В СТЕРИЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ

Е.Н. Кутас, А.А. Горецкая, И.Н. Малахова, Л.Е. Огородник*

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь.

** Университет им. Т.Г. Шевченко, Киев, Украина.*

Введение

В условиях *in vitro* на жизнеспособность эксплантов оказывают влияние различные факторы: стерилизующие соединения, сезон отбора эксплантов, состав питательной среды, размер экспланта, его физиологическое состояние и другие.

Стерилизующие соединения и сезон отбора эксплантов являются одними из многочисленных факторов, оказывающих влияние на жизнеспособность эксплантов в условиях стерильной культуры.

Анализ литературных данных, касающихся стерилизации растительного материала при введении его в стерильную культуру показал, что для стерилизации используют различные стерилизующие соединения с различной концентрацией и временем экспозиции [1–6]. Для каждого вида растения оптимальный режим стерилизации, способствующий высокому выходу жизнеспособных эксплантов, устанавливается экспериментальным путем.

В доступной нам литературе не обнаружено информации об исследованиях, касающихся влияния стерилизующих соединений на выход жизнеспособных эксплантов у интродукта горицвета (адониса) весеннего. В этой связи нами проведены исследования, направленные на решение данной проблемы.

Как известно, при вычленении экспланта происходит механическое повреждение тканей, сопровождаемое резким усилением интенсивности биосинтеза фенольных соединений. При выходе фенолов из вакуолей (в которых они локализованы) в протоплазму в результате поранения ткани, во время вычленения экспланта, они неизбежно подвергаются ферментативному окислению, в результате которого образуются токсические соединения – хиноны, вызывающие некроз и гибель экспланта [7]. Вообще некротическая реакция рассматривается как защитная, сверхчувствительная функция, осуществляемая при помощи полифенольных соединений, так как продукты окисления фенолов создают на пути распространения инфекции хинонные барьеры – в результате возникают защитные некрозы [7–8]. Однако, такие некрозы крайне нежелательны при введении экспланта в стерильную культуру. В этой связи возникла необходимость в проведении исследований, на основании результатов которых будет определено наиболее благоприятное время года для отбора эксплантов горицвета весеннего в течение которого некроз их будет минимальным.

Методы исследований

Объектом исследования служил интродуцированный вид горицвет весенний.

В качестве эксплантов использовали свежесобранные семена, почки возобновления и придаточные почки адониса весеннего.

Обработка эксплантов проведена 0,1% раствором диацета, 0,1% раствором сулемы, 0,08% раствором азотнокислого серебра, 0,04% раствором азотнокислой ртути, 6% раствором гипохлорида кальция в сочетании с обработкой 70%-ным этанолом. Для каждого стерилизующего соединения испытана экспозиция 5, 10 и 15 минут. После стерилизации материал промывали в трех сменах стерильной бидистиллированной воды по 15 мин в каждой, затем высаживали на агаризованную среду MS [9]. Пробирки с высаженными эксплантами помещали на стеллажи, где температура воздуха составляла 24°C, освещенность – 4000 лк, относительная влажность воздуха – 70%. Опыт состоял из 10 вариантов. Повторность трехкратная. Учет окисленных, инфицированных и жизнеспособных эксплантов проводился ежедневно в течение 2 недель. Статистическая обработка данных проведена исходя из 20 эксплантов на повторность для семян и 10 – для почек.

Экспериментальные данные сведены в таблицу 1.

Для определения наиболее благоприятного времени года для отбора эксплантов были использованы почки возобновления интродуцента адониса весеннего, вычлененные в разное время года: весна (март), лето (июль), осень (ноябрь). Стерилизацию материала проводили 0,04% раствором азотнокислой ртути в течение 5 мин с предварительным погружением его в 70-градусный этанол на 5 с (на основании результатов экспериментальных исследований, полученных нами по стерилизации адониса весеннего). Почки высаживали на питательную среду и помещали под флюоресцентное освещение с фотопериодом 16 ч, освещенностью 4000 лк при температуре 24⁰ С и влажности воздуха 70%. Повторность опытов трехкратная. Учитывали количество окисленных эксплантов и жизнеспособных, регенерировавших побеги, спустя 45 дней с момента высадки эксплантов на питательную среду. Статистическая обработка данных проведена исходя из 10 эксплантов на повторность.

Экспериментальные данные представлены в таблице 2.

Результаты и обсуждение

Цифры в таблице 1 свидетельствуют о наибольшем выходе жизнеспособных семян (90%) у адониса весеннего при стерилизации их 0,08% раствором азотнокислого серебра и 0,04% раствором азотнокислой ртути. Для почек возобновления наибольший выход жизнеспособного материала (90%) наблюдался при стерилизации 0,04% раствором азотнокислой ртути, а для придаточных почек максимальный выход жизнеспособного материала составил 90% при стерилизации 6% раствором гипохлорида кальция.

Таблица 1 – Жизнеспособность эксплантов интродуцированного вида адониса весеннего (*Adonis vernalis* L.)

Эксплант	Концентрация раствора стерилизующего соединения, %														
	Диацид – 0,1			Сулема – 0,1			Азотнокислое серебро – 0,08			Азотнокислая ртуть – 0,04			Гипохлорид кальция – 6		
	Время экспозиции, мин*														
	5			5			5			5			5		
Семена	И	О	Ж	И	О	Ж	И	О	Ж	И	О	Ж	И	О	Ж
		$\frac{2}{10}$	$\frac{3}{15}$	$\frac{15}{75}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{17}{85}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{18}{90}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{1}{5}$	$\frac{18}{90}$	$\frac{2}{10}$	$\frac{2}{10}$
Почки возобновления	$\frac{1}{10}$	$\frac{2}{20}$	$\frac{7}{70}$	$\frac{2}{20}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{7}{70}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{2}{20}$	$\frac{8}{80}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{9}{90}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{8}{80}$
Придаточные почки	$\frac{4}{40}$	$\frac{4}{40}$	$\frac{2}{20}$	$\frac{3}{30}$	$\frac{2}{20}$	$\frac{5}{50}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{2}{40}$	$\frac{7}{70}$	$\frac{1}{20}$	$\frac{2}{40}$	$\frac{7}{70}$	$\frac{0}{0}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{9}{90}$

Примечание. 1. И - инфицированные, О - окисленные Ж - жизнеспособные экспланты; 2. в числителе количество эксплантов, шт., в знаменателе - %. 3.* – при экспозиции 10 и 15 мин все экспланты окислились.

Следовательно, из всех испытанных нами стерилизующих соединений, высокий выход жизнеспособных эксплантов получен при использовании трех видов стерилизующих соединений: азотнокислого серебра и азотнокислой ртути в концентрации 0,08 и 0,04% соответственно, а также гипохлорида кальция в концентрации 6%. Стало быть, эти концентрации следует использовать для стерилизации эксплантов адониса весеннего (семян, почек возобновления, придаточных почек) при введении их в стерильную культуру с целью разработки одного из этапов технологии клонального микроразмножения этого вида.

Анализ экспериментального материала, представленного в таблице 2, показал, что почки интродуцента адониса весеннего, вычлененные в марте в весеннее время года, были способны к пролиферации, то есть к образованию побегов. В процентном выражении они

составили 90%. У них наблюдалась интенсивная регенерация побегов. Остальные 10% почек оказались окисленными (бурыми) неспособными к пролиферации.

Таблица 2 – Влияние времени отбора эксплантов интродуцента адониса весеннего на их жизнеспособность в культуре *in vitro*

Время отбора эксплантов								
Весна (март)			Лето (июль)			Осень (ноябрь)		
1	2	3	1	2	3	1	2	3
90	10	++	0	100	–	70	30	+

Примечание. 1. процент жизнеспособных эксплантов, регенерировавших побеги. 2. процент окисленных эксплантов (без регенерации побегов). 3. регенерация побегов: «–» отсутствует, «+» медленная, «++» интенсивная.

Почки, вычлененные в летнее время года в июле, оказались окисленными (бурыми) неспособными к пролиферации. В процентном выражении они составили 100%. Регенерация побегов у них отсутствовала.

У почек, вычлененных осенью в ноябре, способность к пролиферации, то есть к образованию побегов была ниже по отношению к почкам, вычлененным в марте. Этот показатель составил 70%. Регенерация побегов была медленной. Остальные 30% почек оказались окисленными (бурыми) неспособными к пролиферации.

Сравнительный анализ материала, полученного в весенне, летнее и осеннее время года, позволил прийти к выводу, что почки, вычлененные в марте, то есть, в весеннее время года обладают наибольшей пролиферирующей способностью. Так как от общего числа почек, высаженных в это время года, 90% из них регенерировали побеги. Отсутствие регенерационной способности характерно для почек, вычлененных в летнее время года. Почки, вычлененные в осеннее время года, заняли промежуточное положение по данному показателю.

Таким образом, наблюдается отличие в способности к пролиферации у почек адониса весеннего, вычлененных в разное время года.

Как показали результаты экспериментальных исследований, способность к пролиферации выше у почек, вычлененных весной, в сравнении с почками, вычлененными летом и осенью. Отсутствие способности эксплантов к пролиферации, отобранных в летнее время (июль), вызвано сильным фенольным окислением почек, так как в это время происходит накопление фенолов в листьях и почках, выступающих в качестве стимуляторов роста.

Этот факт следует учитывать в дальнейшем при разработке технологии клонального микроразмножения адониса весеннего.

Наблюдая за ростом и развитием адониса весеннего, нами замечено, что из почек возобновления формируются побеги, несущие листья и цветковые почки. Рост цветковых почек предшествует росту листьев и происходит в марте–апреле. Согласно исследованиям Пошкурлат [10] рост корней происходит весной, раньше роста надземных побегов, и после летнего перерыва – в августе. В июле развиваются все зачатки однолетнего побега. В ноябре их рост прекращается до конца января–февраля.

Наибольшая активность роста почек возобновления наблюдается в июле–августе. В период с сентября по ноябрь рост почек резко замедляется. Вероятно в это время (ноябрь) для адониса весеннего характерно наступление начала состояния относительного покоя, так как у большинства многолетних травянистых растений начальное состояние эндогенного покоя приходится на ноябрь и прекращается в большинстве случаев в конце января–начале февраля [11].

Можно предположить, что повышение жизнеспособности эксплантов интродуцента адониса весеннего, отобранных в ноябре, связано с меньшим синтезом и окислением фенолов в почках возобновления.