

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ
И БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов
III Международной научной конференции
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии
и биотехнологии растений*

Минск
«Издательский центр БГУ»
2008

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад
НАН Беларуси, 2008

УДК 582.949.2:581.143.6

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *LAMIACEAE*

Мазур Т.В., Бердичевец Л.Г., Фоменко Т.И.

ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск,
ул. Сурганова 2в, e-mail: cbg@it.org.by

Разработаны методы введения в культуру in vitro и микроклонального размножения растений Agastache rugosa и Melittis sarmatica, представленных в коллекции ЦБС НАН Беларуси. Проведена оценка эффективности различных подходов стерилизации семян и побегов при введении в культуру in vitro и подобраны оптимальные условия роста и развития растений.

Коллекция растений *in vitro* предоставляет широкие возможности для сохранения и восстановления численности дикорастущих исчезающих, редких и эндемичных видов, изучения и использования лекарственных и хозяйственно ценных растений [1-3]. Создание и поддержание коллекции растений *in vitro* предусматривает разработку приемов и методов для конкретных генотипов, что составляет один из предметов исследования отдела биохимии и биотехнологии растений ЦБС НАН Беларуси.

Все виды растений потенциально могут быть размножены через культуру тканей, однако далеко не для всех генотипов на данный момент имеются приемлемые методики. В наших исследованиях разработаны методы введения в культуру *in vitro* растений представителей семейства *Lamiaceae* – многоклубника морщинистого (*Agastache rugosa* (Fish. Et Mey) и кадила сарматского (*Melittis sarmatica* Klok.).

Для получения асептических линий в качестве исходного материала использовали семена и экпланты растительной ткани. Поверхностную стерилизацию проводили согласно общепринятым методикам с использованием в качестве стерилизующих агентов хлор-, ртуть- и серебросодержащие соединения. Время обработки подбирали эмпирически для каждого конкретного вида растений в зависимости от типа экпланта, размера семян и характера их поверхности. Семена проращивали на модифицированной безгормональной среде Мурасиге и Скуга (МС) с половинным содержанием макрокомпонентов и сахарозы. Растения, полученные из семян и почек, культивировали при 22-25°С и 16-часовом фотопериоде.

Для стерилизации семян многоклубника морщинистого использовали четыре стерилизующих соединения (0,1% раствор диацета, 0,1% раствор нитрата серебра, 10% раствор хлорамина, 10% раствор гипохлорита кальция) в сочетании с замачиванием в воде на 3 часа, после чего 10 ми-

нут выдерживали в перманганате калия с последующей трехкратной промывкой стерильной водой. Время стерилизации – 5, 10, 15, 20 и 30 минут. Семена проращивали на питательных агаризованных средах.

Во всех рассмотренных вариантах при стерилизации семян увеличение времени обработки стерилизующими агентами наряду с уменьшением контаминации исходного материала, приводило к снижению его жизнеспособности. Так, при 15-минутной стерилизации 0,1% раствором диацета достигали 100% стерильности материала при всхожести семян 66,6%, в то время как при 5-минутной обработке 75,2%, 15 минутная обработка 10% раствором хлорамина и гипохлорита кальция давала высокий процент контаминации. Более длительная обработка этими реагентами хотя и снижала процент контаминации, но не обеспечивала полной стерильности материала. Установлено, что 0,1% раствор нитрата серебра (20 мин.) и диацет (15 мин.) – оптимальные стерилизующие реагенты для семян многоколосника морщинистого, учитывая жизнеспособность эксплантов (табл. 1).

Таблица 1

Эффективность действия различных стерилизующих соединений при введении в культуру *in vitro* многоколосника морщинистого

| Стерилизующее вещество | Время стерилизации, мин. | Контаминация, % | Всхожесть семян, % |
|----------------------------|--------------------------|-----------------|--------------------|
| 0,1% раствор диацета | 5 | 20,3 | 75,2 |
| | 10 | 15,7 | 71,0 |
| | 15 | 0 | 66,6 |
| 0,1% раствор нитрата Ag | 10 | 3,4 | 80,1 |
| | 20 | 0 | 78,3 |
| 10% раствор хлорамина | 15 | 10,7 | 77,2 |
| | 30 | 5,6 | 68,6 |
| 10% раствор гипохлорита Ca | 15 | 9,2 | 71,5 |
| | 30 | 4,2 | 59,7 |

Исследовано влияние концентрации ИУК на морфогенетические показатели и процесс укоренения черенков многоколосника морщинистого в культуре *in vitro*. Для этого проростки многоколосника переносили на питательную среду МС, содержащую половинный состав солей с добавлением β-индолил-3-уксусной кислоты (ИУК) в концентрации 1, 2 и 3 мг/л. Контролем служили растения, высаженные на питательную среду без добавления гормонов роста (табл. 2). Субкультивирование растений проводили с интервалом от 1 до 2 месяцев путем черенкования и пересадки верхушки побега или участков побега с почкой на свежую питательную среду.

Размножение растений многоколосника морщинистого на средах, содержащих ИУК, стимулировало более интенсивное образование корней.

При добавлении в среду 2 и 3 мг/л ИУК инициацию корнеобразования наблюдали уже на 8-е сутки культивирования, в то время как в других вариантах на 12-е сутки. Стопроцентное укоренение черенков отмечено на 26-е сутки на среде, содержащей 3 мг/л ИУК.

На среде с добавлением 2 мг/л ИУК укоренилось 95% черенков. Дальнейшее уменьшение концентрации ИУК (до 1 мг/л) в среде культивирования приводило к снижению количества укорененных растений, однако количество укорененных растений было значительно выше по сравнению с контролем (83 и 43,3% соответственно).

Таблица 2

Влияние концентрации ИУК на морфогенетические показатели и процесс укоренения черенков многоколосника морщинистого в культуре *in vitro*

| Концентрация ИУК, мг/л | Укоренившиеся растения, % | Высота стебля, см | Длина корней, см | Количество корней |
|------------------------|---------------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| контроль | 43,3 | 5,6±0,3 | 5,2±0,6 | 4,6±2,6 |
| 1 | 83,0 | 7,7±0,3 | 5,5±0,6 | 6,8±2,7 |
| 2 | 95,0 | 8,0±1,2 | 6,8±0,8 | 6,4±3,0 |
| 3 | 100,0 | 9,7±1,6 | 6,9±0,5 | 6,2±3,3 |

Отмечено, что присутствие ИУК в среде культивирования черенков также оказало положительное действие на высоту стебля, количество и длину корней. Проведенные исследования позволили подобрать оптимальные условия для микроклонального размножения *Agastache rugosa* в культуре *in vitro*.

Разработка методов микроклонального размножения кадила сарматского является актуальным для сохранения генофонда данного вида. Кадило сарматское – многолетнее травянистое растение, занесенное в Красную книгу Беларуси, и представляет большой практический интерес как пряно-ароматическое и лекарственное растение. Учитывая ограниченные природные запасы кадила и сложность его размножения семенами, целесообразным было провести исследования по введению кадила в культуру *in vitro* с разработкой методов его микроклонального размножения. Это позволит не только сохранить генофонд растения, но и получить неограниченное количество посадочного материала для создания сырьевой базы *M. sarmatica* в кратчайшие сроки.

Для получения асептической культуры кадила сарматского использовали в качестве исходного материала семена и пазушные почки растений, растущих в открытом грунте. Подбор условий введения в культуру *in vitro* кадила сарматского через семена не дал положительного результата из-за низкой всхожести семян, которая после их стерилизации вообще отсутствовала. Для стерилизации пазушных почек применяли 0,1% раствор диацида в течение 3,

5, 7 и 10 минут. Наилучшие результаты были получены при 7 минутной обработке диацидом. Размножение кадила сарматского проводили путем черенкования побегов. Культивирование осуществляли на модифицированной среде МС с половинным содержанием солей и измененным витаминным составом [4]. Для увеличения коэффициента размножения в среду культивирования вводили 6-бензиламинопурин (БАП) в концентрации 1, 2, 3, и 4 мг/л (рис.). Контролем служили растения, высаженные на аналогичные питательные среды без добавления гормонов (табл. 3).

Таблица 3

Влияние концентрации бензиламинопурина на морфогенетические показатели черенков кадила сарматского в культуре *in vitro*

| Концентрация БАП, мг/л | Высота стебля, см | Количество побегов | Наличие каллуса | Корневая система |
|------------------------|-------------------|--------------------|-----------------|------------------|
| Контроль | 6,42±2,01 | 1 | - | + |
| 1 | 4,68±1,15 | 1,86±0,26 | + | + |
| 2 | 3,80±1,25 | 2,44±0,38 | + | - |
| 3 | 3,80±1,28 | 2,50±0,71 | + | - |
| 4 | 4,12±0,78 | 2,90±0,41 | + | - |

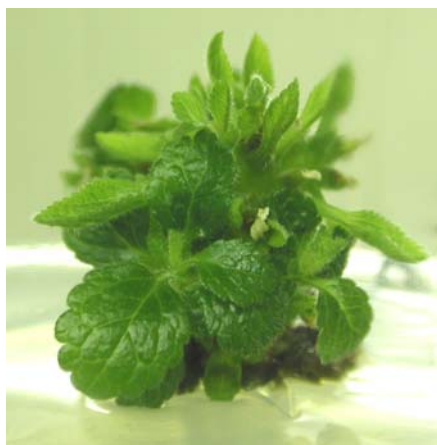


Рис. Кадило сарматское в культуре *in vitro* на среде культивирования, содержащей 4 мг/л БАП

Данные, представленные в таблице 3 и на рисунке, показывают, что добавление в среду культивирования БАП приводило к стимуляции пролиферации пазушных меристем, что выражалось в множественном развитии побегов. Увеличение в среде культивирования концентрации цитокинина стимулировало более интенсивное побего – и каллусообразование. Наличие корневой системы отмечено на растениях, культивируемых на контрольной среде и среде, содержащей 1 мг/л БАП. С увеличением концентрации БАП в среде культивирования наблюдалось редуцирование листовой пластинки, что снималось при пассировании на среду с более низкой концентрацией БАП.

В наших исследованиях разработаны методы введения в культуру *in vitro* растений *Agastache rugosa* и *Melitis sarmatica*, представленных в кол-

лекции ЦБС НАН Беларуси. Проведена оценка эффективности различных подходов стерилизации семян и побегов при введении в культуру *in vitro*, разработаны оптимальные условия обеспечения роста и развития растений за счет подбора питательной среды и физических условий культивирования.

Литература

1. Hammer K., Arrosmith N., Gladis T. // *Naturwissenschaften*. 2003. V.90, № 6. P. 241-250.
2. Rout G. R., Samantaray S., Das P. // *Biotechnol. Adv.* 2000. V.18, № 2. P. 91-102.
3. Коваль С.Ф., Коваль В.С., Тымчук С.М., Богуславский Р.Л. // *Цитология и генетика*. 2003. Т., № 4. С. 46-53.
4. Saxena C, Palai SK, Samantaray S, Rout GR, Das P.// *Plant growth Regulation* 1997. 22. 1333-5.

Summary

Introduction methods of *in vitro* culture and microclonal duplication of plants *Agastache rugosa* and *Melitis sarmatica*, presented in Central Botanical Garden NAS of Belarus collection are developed. The estimation of various approaches efficiency of seeds and shoots sterilization at introduction *in vitro* culture is lead. Optimum conditions of plants growth and development are picked up.