

ISSN 2221-9927

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ  
«НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ  
НАУК БЕЛАРУСИ ПО БИОРЕСУРСАМ»

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ИНСТИТУТ  
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БОТАНИКИ ИМЕНИ В.Ф.КУПРЕВИЧА НАН БЕЛАРУСИ»  
ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ «БЕЛОРУССКОЕ БОТАНИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО»  
БЕЛОРУССКОЕ ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ ФИЗИОЛОГОВ РАСТЕНИЙ

# БОТАНИКА

## (ИССЛЕДОВАНИЯ)

Выпуск 40

*Посвящается 80-летию  
Института экспериментальной ботаники  
им .В.Ф.Купревича НАН Беларуси*

Минск  
«Право и экономика»  
2011

**Ботаника (исследования): Сборник научных трудов. Выпуск 40 /**  
Ин-т эксперимент. бот. НАН Беларуси – Минск: Право и экономика,  
2011. - 641 с.

ISSN 2221 - 9927

Настоящий выпуск сборника посвящен 80-летнему юбилею старейшего в республике академического биологического учреждения – Института экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси. В сборник включены очерки руководителей крупнейших научных школ об истории становления и достижениях Института за период его существования, перспективах развития и деятельности в XXI веке, представлены оригинальные научные статьи белорусских ученых из ведущих научно-исследовательских учреждений Национальной академии наук и ВУЗов Беларуси, содержащие результаты экспериментальных исследований, теоретических и практических разработок в широком спектре направлений ботанической науки, физиологии и экологии растений.

**Редакционная коллегия:**

акад. НАН Беларуси, проф. Н.А.Ламан  
акад. НАН Беларуси, проф. В.И.Парфенов

к.б.н. Д.Г.Груммо

д.б.н. А.И.Заболотный

к.б.н. Н.А.Копылова

д.б.н. В.Н.Прохоров

к.б.н. А.В.Пугачевский

д.б.н., проф. Л.М.Сапегин

член-корр. НАН Беларуси, проф. Е.А.Сидорович

д.б.н. В.В.Сарнацкий

д.б.н. Г.Ф.Рыковский

д.б.н., проф. А.Т.Федорук

к.б.н. Е.О.Юрченко

**Научные редакторы:**

акад. НАН Беларуси, проф. Н.А.Ламан  
акад. НАН Беларуси, проф. В.И.Парфенов

**Ответственный секретарь**

к.б.н. Т.А.Будкевич

**ISSN 2221 - 9927**

© ГНУ «Институт экспериментальной  
ботаники имени В.Ф.Купревича», 2011

© Оформление. ИООО «Право и экономика», 2011

---

Адрес редакции: 220072, г.Минск, ул.Академическая, 27, Институт экспериментальной ботаники им. В.Ф.Купревича НАН Беларуси.

Факс +375 (17) 284-18-53, E-mail: exp-bot@biobel.bas-net.by

УДК 581.143.6:582.931.4

Е.В. СПИРИДОВИЧ<sup>1</sup>, Т.И. ФОМЕНКО<sup>1</sup>, Н.В. МАКЕДОНСКАЯ<sup>1</sup>,  
В.П. КУРЧЕНКО<sup>2</sup>, Л.А. ЛЮБАКОВСКАЯ<sup>3</sup>, Н.Г. БРЕЛЬ<sup>1</sup>,  
А.Н. ЮХИМУК<sup>1</sup>, В.Н. РЕШЕТНИКОВ<sup>1</sup>

## **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В СОЗДАНИИ, ОЦЕНКЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОЛЛЕКЦИИ СИРЕНИ ЦБС НАН БЕЛАРУСИ**

<sup>1</sup>*Центральный ботанический сад НАН Беларуси*

<sup>2</sup>*Белорусский государственный университет*

<sup>3</sup>*Витебский государственный медицинский университет  
им. Дружбы народов*

**Введение.** Создание коллекций растений является наиболее эффективным путем сохранения, обогащения и рационального использования генетического разнообразия. В странах СНГ в том числе в России, Беларуси и Украине коллекции растений рассматриваются, прежде всего, как источник исходного материала для селекции и банк его сохранения, где образцы генофонда подобраны по степени фенотипического проявления отдельных признаков и их сочетаний [1,2]. Возможности пополнения генофонда растений Беларуси новыми полезными образцами далеко не исчерпаны, во всем мире не прекращаются работы по созданию новых форм и сортов растений, в т.ч. с использованием генно-инженерных технологий. Поэтому привлечение, описание и включение в коллекционные фонды нового генетического материала продолжает являться важнейшей задачей держателей ботанических коллекций, в особенности Ботанических садов, демонстрирующих биоразнообразие растительного мира [3, 4].

Род сирень (*Syrínga* L.) относится к семейству Маслинные (*Oleaceae* Lindl). Описан К.Линнеем в 1753 г. Род включает листопадные деревья и кустарники. Распространена в Южной Европе и восточной Азии, в основном в Китае. Сирень - одно из наиболее популярных декоративных древесных растений. Наиболее репрезентативные коллекции этой культуры сосредоточены преимущественно в ботанических садах и интродукционных центрах, где обычно представлены малым числом экземпляров. Коллекция сирени в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси по видовому, сортовому и гибриднему разнообразию полная и находится на уровне последних достижений в селекции и

составляет 248 таксонов. Видовая коллекция представлена 25 таксонами в возрасте 40–50 лет и состоит из трех секции рода сирень.

В данной работе обсуждаются результаты комплексных исследований по интродукции сирени, биохимической оценке видового материала на содержание биологически активных веществ, использование биотехнологических методов для представителей рода *Syringa* L. при создании коллекции культуры клеток и тканей ценных генотипов. Представлены результаты использования молекулярно-генетических методов для выявления генетического родства отдельных ценных генотипов и сортов в процессе их паспортизации, верификация клонов и сортов сирени коллекций разных ботанических садов.

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводили с асептическими культурами сирени обыкновенной *S. vulgaris* сортов М-м Флорен Степман, Флора, Красавица Москвы, Радж Капур, Лаплас, Павлинка, Нестерка, Жемчужина и Лунный Свет. Клонирование осуществляли методом одноузловых черенков.

В эксперименте микрочеренки культивировали на следующих питательных средах: Murashige and Skoog (MS) [5]; Woody Plant Medium (WPM) [6]; Gamborg (B5) [7]; Simmonds and Comming (SC) [8]. При оценке коэффициента размножения учитывали среднее число узлов, формирующихся на одном побеге в течение одного субкультивирования.

Модификации сред касались состава макросолей и включали следующие варианты: 1,5 количества макросолей MS; макросоли по MS с половинным содержанием нитрата аммония (MS модиф.). В результате каждого субкультивирования оценивали коэффициент размножения, длину побегов, средние показатели сырого и сухого веса одного побега. Среда культивирования содержала бензиладенин (БАП) в концентрациях 1; 2; 3 и 5 мг/л; либо изопентениладенин (2iP) в концентрациях 1 и 5 мг/л.

Культуры выращивались в климатической камере при температуре  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , интенсивности освещении  $6\text{Wm}^{-2}$  и 16-часовом фотопериоде.

Препараты суммарной ДНК получали по методике из листьев растений [9]. В работе использовали 10 олигонуклеотидных десятичленных праймеров. Продукты ПЦР разделяли и визуализировали по стандартным методикам [10].

**Результаты и обсуждение.** Род сирень (*Syringa* L.) насчитывает около 100 видов ([www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)) Также существует большое количество сортов, межвидовых гибридов и форм среди других видов данного рода. В настоящее время род сирень подразделяют на 2 подрода: сирени и лигустрина. Подрод сирени состоит из черырёх серий: пушистые, волосистые, перистолистные и настоящие сирени. В течение нескольких столетий ее культивируют в умеренных широтах Евразии и Северной Америки. Практически все виды рода *Syringa* L. в большей или меньшей степени декоративны и устойчивы в культуре. Целенаправленная работа по созданию сортов сирени была начата в середине XIX в. Большинство культиваров было выведено в первой половине XX в. В настоящее время Международный регистр сирени (International Register and Checklist of Cultivar Names in the Genus *Syringa* L.) насчитывает около 2000 сортов. В создании национального генофонда коллекции сирени ЦБС НАН Беларуси вложен труд нескольких поколений ботаников-интродукторов: Н.В. Смольского, В.Ф.Бибиковой, Э.А.Бурой, Г.И.Матусевича, Н.В. Македонской.

Работа по интродукции сирени и уже тесно увязывалась с задачами максимального внедрения научных достижений в зеленое строительство республики. С 1961 по 2011 гг. интродуцировано более 300 сортов сирени. Все они оценены по декоративности, продуктивности и пригодности для различных технологий выращивания. Более 60 сортов признаны пригодными для промышленного разведения. На основе данных по интродукции рода *Syringa* L. были отобраны высокодекоративные и устойчивые виды и сорта для проведения комплексных исследований с использованием анатомо-морфологических, биотехнологических и молекулярно-генетических методов.

Состав коллекций ЦБС НАН Беларуси достаточно полно отражает генотипическое разнообразие рода *Syringa* L. (Рис. 1).

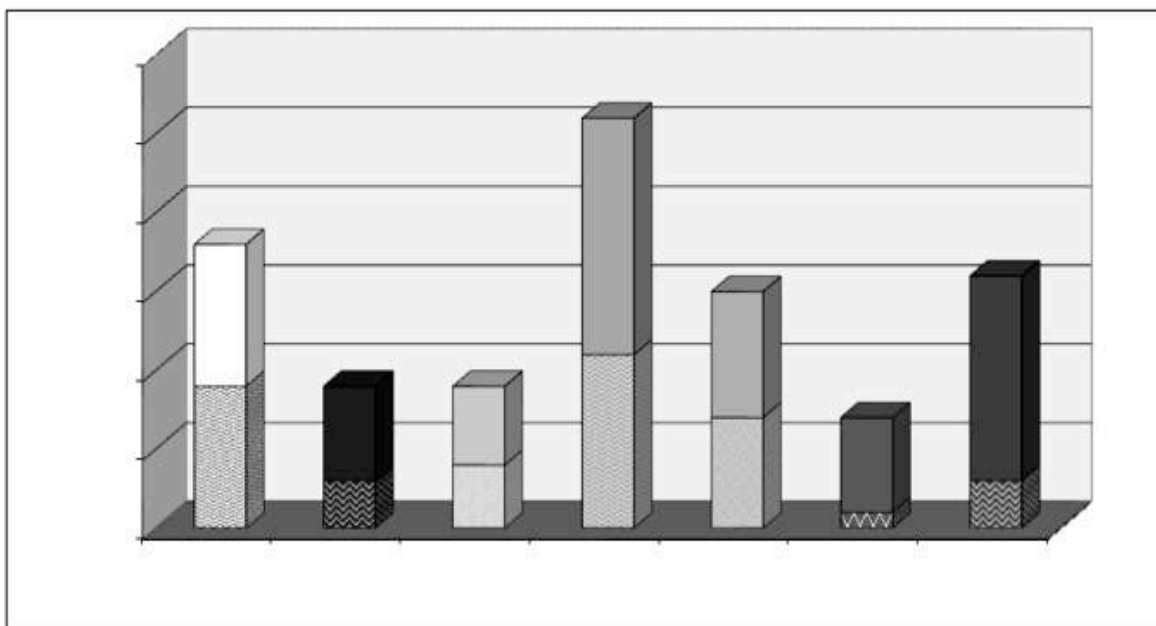


Рис 1. Распределение сортов коллекций на группы по форме и окраске цветка (в соответствии с Международным регистром рода *Syringa* L.).

В коллекции представлены сорта с простыми (60%) и махровыми (40%) цветками; с широкой цветовой гаммой: белой (17%), фиолетовой (9%), голубоватой (9%), лиловой/сиреневой (26%), розоватой (15%), мажентовой (8%), пурпурной (16%).

Данные, полученные на основе многолетних фенологических наблюдений, изучения особенностей роста и цветения, нуждаются в систематизации и дополнении биохимическими характеристиками. Сложность генетической интерпретации морфологических признаков, связанная с полигенным наследованием и, как правило, сильным влиянием среды на фенотипическое проявление признака, зачастую ограничивает использование методов традиционного описания морфологических и цитологических характеристик растений.

Из литературных данных следует, что кора и листья сирени является важным источником биологически активных соединений [11]. Однако информация по количественному содержанию данных веществ, в частности сирингина, у различных представителей рода *Syringa* отсутствует. Совместно с сотрудниками Белгосуниверситета была проведена количественная характеристика экстрактов коры сирени по содержанию сирингина. Полученные данные представлены в таблице 1. Они хорошо согласуются с результатами ТСХ и указывают на то, что наибольшее количество сирингина обнаруживается в коре *S.*

*reticulata*, которое более чем в полтора раза выше, чем у других видов сирени, также характеризующихся высоким содержанием сирингина. К числу последних можно отнести *S. villosa*, *S. vulgaris*, *S. emodi*, *S. yunnanensis*, *S. amurensis* и *S. wolfii*. Напротив, сирингин практически отсутствует в коре *S. sweginzowii*, а у *S. reflexa* и *S. pekinensis* его количество практически в 10 раз меньше чем у *S. reticulata*.

Таблица 1. Содержание сирингина в спиртовых экстрактах различных видов сирени по данным ВЭЖХ анализа

Виды	Площадь пика, mAU*s	Содержание сирингина, мг · г <sup>-1</sup> сухой массы
<i>S. reticulata</i>	6556,6	4,90
<i>S. villosa</i>	4240,4	3,17
<i>S. vulgaris</i>	4092,5	3,06
<i>S. emodi</i>	3976,0	2,97
<i>S. wolfii</i>	3845,4	2,87
<i>S. amurensis</i>	3779,2	2,82
<i>S. yunnanensis</i>	3721,9	2,78
<i>S. pubescens</i>	3192,0	2,38
<i>S. josikaea</i>	3010,2	2,25
<i>S. microphylla</i>	2108,4	1,57
<i>S. pekinensis</i>	769,9	0,58
<i>S. reflexa</i>	688,8	0,51
<i>S. sweginzowii</i>	0	0,00

Проведенные исследования позволили выявить наиболее перспективный источник биологически активного фенольного гликозида сирингина среди различных представителей рода *Syringa*, произрастающих на территории Ботанического сада НАН Беларуси [12]. Кроме того, обнаружены иридоиды: метилсирамуральдегид в коре сирени амурской (*Syringa amurensis* Rupr.), дезоксилогановая, 8-эпидезоксилогановая, 7-эпилогановая и логановая кислоты – сирени венгерской (*Syringa josikae* Jacq. Fil.). Кора и листья молодых ветвей сирени амурской (*Syringa amurensis* Rupr.) и сирени Вольфа (*Syringa wolfii* Schneid.) обладают антиоксидантными свойствами.

Очевидно, что проведение селекционных работ, направленных на повышение содержания сирингина, и разработку и получение

суспензионной культуры клеток с повышенным содержанием БАВ, целесообразно выполнять, используя *S. reticulata* в качестве исходного материала.

Наряду с традиционными методами сохранения растений *ex situ* все большее значение приобретает использование для коллекции сирени культуры изолированных тканей и органов. Применение клеточных биотехнологий обеспечивает ускоренное получение новых ценных форм и линий декоративных культур, используемых в селекции на устойчивость, продуктивность и качество. Микрклональное размножение растений позволяет получать растения, идентичные исходному типу. При микрклональном размножении наиболее полно реализуется регенерационный потенциал первичных меристем. Это особенно важно для размножения генотипов и декоративных форм растений, ценные характеристики которых нельзя поддержать при семенном воспроизведении. Растения-регенеранты, полученные с помощью биотехнологических методов в дальнейшем можно размножать микрочеренкованием побега, сохраняющего апикальное доминирование, для увеличения количества посадочного материала.

Отработка основных этапов размножения *in vitro* является первым и обязательным условием применения в промышленных масштабах любых биотехнологий, связанных с регенерацией целого растения. Коллекции *in vitro* являются маточником, донором для их расширенного воспроизводства и тиражирования. Создание технологии производства посадочного материала, оздоровленного через культуру *in vitro*, один из насущных вопросов, требующий тщательного изучения особенностей культивирования различных сортов в ходе этого процесса.

Известно, что существует комплекс факторов, каждый из которых в отдельности и в сочетании с другими оказывает заметное влияние на развитие меристем *in vitro*. Среди них наиболее важными являются тип экспланта, генотип растений, условия культивирования донорных растений, состав питательных сред и другие. Особенности клонального микроразмножения и выбор оптимальной модели культивирования *in vitro* тесно связаны с биологическими особенностями вида и его размножением в природе. У эксплантов сирени в культуре *in vitro* происходит реализация органогенного потенциала пазушных почек, а также



активизация деятельности клеток пазушной меристемы. Растения-регенеранты развиваются посредством прямого органогенеза, минуя стадию каллусообразования [13]. Культивирование побегов сирени на разных питательных средах показало, что для всех исследованных сортов наиболее эффективное клонирование наблюдалось на среде MS (рис.2).

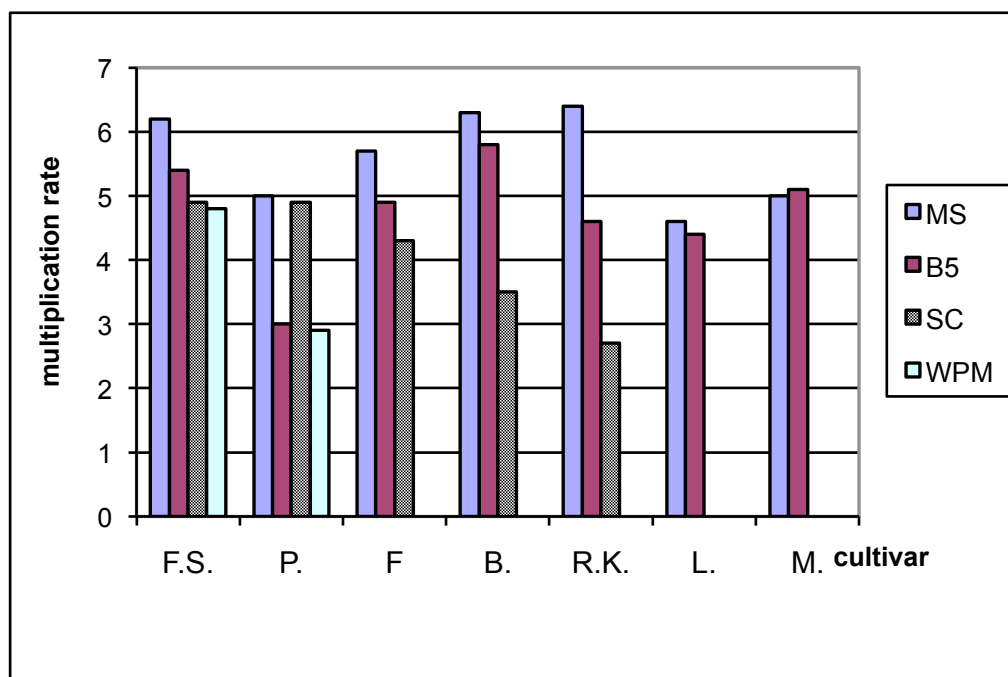


Рис. 2. Влияние различных питательных сред на коэффициент размножения: F.S.-М-м Флорен Степман, P.-Павлинка, F.-Флора, B.-Красавица Москвы, R.K.-Радж Капур, L.-Лаплас, M.-Лунный Свет.

Среда MS имеет богатую композицию минеральных солей, что способствует эффективному микроклонированию сирени, но и поддерживает развитие аномалий связанное с гиперпроводностью побегов. Одной из причин этого может быть избыток аммонийных ионов. Культивирование на средах WPM, B5 и SC, напротив, позволяло преодолеть развитие этих аномалий. В ходе оптимизации питательной среды для культивирования сирени Pierik с сотрудниками пришли к выводу, что увеличение концентрации макросолей MS в 1,25-1,5 раза улучшает микроразмножение [14,15]. Наши эксперименты также показали, что на эффективность микроразмножения сирени может оказывать существенное влияние еще количество аммонийного азота и соотношение в питательной среде аммонийных и нитратных ионов (табл.2). Использование модифицированной среде MS также способствовало увеличению сырой и сухой вес сформированных побегов.

Таблица 2. Влияние минерального состава питательной среды на микроразмножение сирени

Сорт	Среда	Коэффициент размножения	Длина побегов, мм	Случаи Аномалий
Лунный свет	Контроль MS	3,5±0,6	21,8±4,9	++
	MS	3,6±0,7	15,4±3,8	-
	MS модиф.	5,0±0,5	46,9±4,4	+
	1,5 MS модиф.	4,8±0,3	35,1±9,5	-
Нестерка	Контроль MS	4,2±0,3	15,5±3,6	++
	MS	5,2±0,5	28,7±2,0	+
	MS модиф.	5,1±0,3	24,3±2,7	-
	1,5 MS модиф.	5,5±0,5	31,1±7,3	+

Примечание: - без аномалий, + менее 10% аномальных побегов, ++ свыше 50% аномальных побегов.

На этапе микроразмножения наиболее важной группой регуляторов роста являются цитокинины [15,16]. Из трех цитокининов (кинетин, БАП, 2iP), действие которых мы анализировали, только БАП и 2iP оказались эффективными. Культивирование микрочеренков на средах с 1, 2 и 3 мг/л БАП в течение первого субкультивирования не показало достоверных различий в коэффициенте размножения для сортов Лунный Свет и Нестерка. Только для сорта Павлинка наблюдалось повышение этого показателя с увеличением концентрации БАП и различия между вариантами с 1 и 3 мг/л БАП были достоверны. Во втором субкультивировании тенденция к увеличению скорости размножения с возрастанием содержания в среде БАП проявилась у всех трех сортов. Сирень демонстрирует определенную толерантность как к типу, так и к концентрации цитокинина в питательной среде, однако ряд сортов имеет специфическую потребность либо в БАП, либо в 2iP (табл.3). Хотя для всех сортов отмечен высокий коэффициент размножения, а для сортов Флора и Лунный Свет получена наибольшая масса формирующихся побегов (табл.4). Однако, длительное использование таких доз регуляторов роста неизбежно приведет к накоплению аномалий развития.

Из приведенных в таблице 3 данных видно, что для сорта Нестерка БАП в концентрации 3 мг/л предпочтительнее, так как и коэффициент размножения, и длина, и масса побегов на этой среде у него достоверно выше, чем на среде с 1 мг/л 2iP. Концентрация БАП 1 мг/л недостаточна. Для сорта Красавица Москвы, напротив,

по всем показателям видно преимущество культивирования на среде с 1мг/л 2iP.

Таблица 3. Влияние различных типов и концентраций цитокининов на эффективность роста и размножения сирени обыкновенной

Сорт	Тип и концентрация цитокининов	Коэффициент размножения	Длина побегов, мм
Флора	3 мг/л БАП	5,1±0,2	66,4±0,6
	5мг/л БАП	5,7±0,2*	55,2±9,4
	1 мг/л 2iP	5,5±0,2	61,5±4,1
	5 мг/л 2iP	6,5±0,9 *	56,6±4,1
Красавица Москвы	3 мг/л БАП	6,5±0,1	47,9±5,5
	1 мг/л 2iP	6,0±0,2	75,1±1,7
	5 мг/л 2iP	6,8±0,6 *	27,3±1,9 **
Нестерка	1 мг/л БАП	4,6±0,1	22,2±3,8**
	3 мг/л БАП	5,3±0,4	60,6±1,8
	1 мг/л 2iP	5,0±0,3	36,0±3,4
	5 мг/л 2iP	6,3±0,3 *	55,9±1,9
Лунный Свет	1 мг/л БАП	4,3±0,5	52,6±4,3
	3 мг/л БАП	5,1±0,2	54,8±2,3
	5 мг/л БАП	5,9±0,5 *	66,9±5,9
	1 мг/л 2iP	5,2±0,3	60,8±3,1
	5 мг/л 2iP	5,3±±0,3*	61,1±4,6

Примечание: \* активация пазушных почек, \*\* формирование сильно укороченных побегов.

Кроме оптимизации состава питательной среды и используемого гормонального баланса, большое значение для успешного культивирования растений *in vitro* имеют физические факторы, такие как температура и освещение. Оптимальными для культивирования сирени является температура 25±1°C. При повышении температуры культивирования выше 27°C увеличивается количество аномальных побегов. Если температура культивирования опускается ниже 22°C, рост побегов сильно замедляется.

Условия освещения заметно влияли на габитус формирующихся растений. Площадь листьев в условиях низкой интенсивности освещения была гораздо меньше, чем при более ярком освещении. Для большинства изучаемых сортов низкая интенсивность освещения способствовала развитию слабых истонченных побегов. Наиболее серьезное внимание оптимизации

условий освещения при культивировании сирени уделялось в работе R.L.M.Pierik et al. [15]. При культивировании сирени *in vitro* диапазон условий освещения, которые авторы считают оптимальными, варьирует от  $4 \text{ Wm}^{-2}$  до  $6 \text{ Wm}^{-2}$  [17]. Однако это не исключает существование сортов сирени с более высоким оптимумом освещения  $6-7 \text{ Wm}^{-2}$ , как например сорт Красавица Москвы.

Таблица 4. Влияние концентраций цитокининов различных типов на массу формирующихся побегов сирени обыкновенной

Сорт	Тип и концентрация цитокининов	Сырая масса, мг	Сухая масса, мг
Флора	3 мг/л БАП	145,7±8,8	26,6±1,3
	5 мг/л БАП *	141,9±47,7	25,4±2,6
	1 мг/л 2iP	115,9±13,6	22,2±0,6
	5 мг/л 2iP *	154,5±1,0	24,7±1,4
Красавица Москвы	3 мг/л БАП	207,3±8,9	26,6±2,2
	1 мг/л 2iP	254,5±4,0	41,2±1,0
	5 мг/л 2iP *	101,1±7,2	12,7±1,1
Нестерка	3 мг/л БАП	221,2±3,4	34,3±3,3
	1 мг/л 2iP	112,6±15,4	23,9±3,2
	5 мг/л 2iP *	196,3±18,6	27,0±3,0
Лунный Свет	3 мг/л БАП	213,6±6,0	31,1±1,3
	5 мг/л БАП *	217,9±1,6	30,3±1,2
	1 мг/л 2iP	157,7±33,1	27,1±4,3
	5 мг/л 2iP *	236,9±20,3	39,7±1,1

Примечание: \* активация пазушных почек.

Исследованы особенности адаптации микроклонов различных сортов сирени *ex vitro*. Укорененные растения сирени разных сортов (Моник Лемуан, Абель Карьер, Поль Ариа, Кавур, Михаил Шолохов, Жемчужина, Флора, Павлинка, Лунный Свет, Сенсация, Рочестер, Франк Паттерсон, А. Громов, Сумерки, Никитская, Кончаловский, Павлика, Амий Шотт, Мадам Казимир Перье, Радж Капур, Виргиниана) были высажены на адаптацию в почвенно-песчаную смесь в условиях теплицы (рис.3).

В настоящее время коллекция рода *Syringa in vitro* ЦБС НАНБ состоит из 65 сортов *S. vulgaris L.*, на стадии получения стерильной культуры находится еще 7 сортов селекции Л.А. Колесникова и американской селекции, а также 4 вида *S. reticulata (Blume) H. Hara*, *S. villosa Vahl*, *S. amurensis Rupr.* и *S. oblata Lindl.* 25 %

коллекции составляют сорта Л.А. Колесникова, 11 % - сорта белорусской селекции, 15 % составляют сорта Лемуана, 7 % - сорта Н.Л. Михайлова, остальная часть коллекции представлена сортами американской, голландской, российской, латышской и украинской селекции.



Рис. 3. Микрклональное размножение в культуре *in vitro* и размножение *ex situ* сирени сорта Павлинка.

В качестве адаптационного субстрата была использована смесь из песка (верхний и нижний слой) и смеси листовой и дерновой земли (средняя часть). Субстрат обрабатывали 0,4 % раствором фунгицида (Байтан, Винцит) для предотвращения поражения адаптантов грибной инфекцией, которой растения сирени, извлеченные из стерильных условий и помещенные в условия теплицы, подвержены в большой степени. В процессе адаптации в ящиках под полиэтиленовой пленкой или спанбондом растения также обрабатывались из пульверизатора 0,2 % раствором фунгицида. В феврале – апреле растения трижды с интервалом 1

месяц обрабатывались препаратом Эпин, который является регулятором роста и иммуностимулятором, и оказывает защитное действие на растения в неблагоприятных условиях, повышает устойчивость к вредителям и болезням.

Приоритетными для длительного хранения также являются хозяйственно-ценные виды сорта и, в частности, виды с высоким содержанием сирингина — *S. villosa*, *S. vulgaris*, *S. emodi*, *S. yunnanensis*, *S. amurensis*. Они также были введены в культуру в 2011 г. и составляют *in vitro* коллекцию клеток лекарственных растений сирени, как основу массового промышленного производства физиологически активных соединений из растений. Эта работа была начата и проводится в тесном сотрудничестве с Витебским Государственным Медицинским университетом им. Дружбы народов. Так, установлен спектр фенольных соединений листьев и цветков *Syringa vulgaris* L. дикорастущей и культиварах: Радж Капур, Лунный Свет, М.Шолохов, Красавиц Москвы, Партизанка: флавоноиды (рутин, астрагалин, кемпферол-3 рамноглюкозид), фенольные кислоты (кофейная, феруловая, ванилиновая гидроксикофейная, пара-гидроксифенилуксусная, пара-гидроксibenзойная, пара-кумаровая, о-гидроксикоричная кислота), простые фенолы (тирозол, резорцин) [18,19]. Определено количественное содержание ФС в культиварах. Сумма ФС в *Syringa vulgaris* L. с. М.Шолохов составляет: в листьях —  $23,35 \pm 0,50$  мг/г, цветках —  $24,14 \pm 0,28$  мг/г [18]. Впервые разработаны условия для культивирования каллуса *Syringa vulgaris* L. с. М.Шолохов характеризующегося высоким содержанием суммы ФС ( $11,27 \pm 0,02$  мг/г) и ростовых показателей: максимальным накоплением сухой биомассы ( $4,608 \pm 0,027$  г/л), экономическим коэффициентом по сухой биомассе ( $0,15 \pm 0,001$  г биомассы на 1 г потребленной сахарозы), продуктивностью по сухой биомассе ( $0,08 \pm 0,001$  г/л в сутки) [19].

Необходимым этапом при создании, сохранении и поддержании коллекций *ex situ* и *in vitro*, а также при обмене коллекционными образцами между учреждениями является проведение скрининга коллекционных фондов, выявление и отбор хозяйственно-ценных таксонов, оценка степени генетического разнообразия отобранных таксонов, формирование core-коллекций (коллекций, сохраняющих максимальное генетическое разнообразие) *in vitro*, создание базы данных, включающей наряду

с морфологическим описанием молекулярно-генетические и биохимические данные по каждому конкретному образцу. Эта работа была начата в 2003 г., когда была создана комплексная база данных коллекции сирени, сегодня создается информационно-поисковая база данных белорусских коллекций *in vitro*, обеспечивающая эффективное хранение и обработку информации о паспортизованных образцах, что даст основу для расширения сотрудничества и информационного обмена в целях сохранения биоразнообразия [20].

При проведении молекулярно-генетических работ, начатых с 2005 г., был найден быстрый и простой метод выделения ДНК из листовой ткани сирени, подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения полимеразной цепной реакции, при этом варьировали концентрацию ионов  $Mg^{2+}$ , *Tag*-полимеразы, праймеров и самого препарата ДНК. Метод RAPD-анализа адаптирован для популяционно-генетических исследований и генотипической паспортизации сирени. На основании полученных RAPD-спектров для 18 представителей рода *Syringa* были составлены многолокусные RAPD-паспорта. Выявлена генетическая стабильность полученных микропобегов в коллекции *in vitro* и материнских сортов сирени. Разработанная методическая основа молекулярно-генетического и биохимического документирования коллекционного материала сирени будет продолжена как основа единых требований к держателям коллекций разных ботанических садов, особенно для коллекций *in vitro*. Известно, что изменчивость среди растений, регенерированных *in vitro*, бывает очень высокой, поэтому немаловажным условием стабильного подержания полученных микропобегов, является контроль и сохранение стабильности генотипа. Такая работа уже начата при сравнении микроклонов сортов Партизанка и Свитязянка из коллекций *in vitro* ЦБС НАН Беларуси и ГБС РАН. На рисунке 4 представлен результат электрофоретического разделения ампликонов полученных в результате полимеразной цепной реакции тотальной ДНК двух сортов сирени (Партизанка и Свитязянка из коллекции *in vitro*) с декамерным праймером OPD-03. Для сорта Свитязянка (треки 3 и 4) уровень полиморфизма при RAPD-PCR оказался 10,6 % (2 полиморфных фрагмента из 19). Видно, что для обоих сортов наиболее интенсивные полосы являются мономорфными,

полиморфизм наблюдается среди минорных фрагментов, что говорит об идентичности образцов этого сорта из обеих коллекций. Для другого сорта — Партизанка — наблюдается несколько другая картина: уровень полиморфизма между образцами оказался 20,0 % (2 полиморфных фрагмента из 10), у образцов из разных коллекций различия наблюдаются среди мажорных бэндов (в области 68 и 73 с.).

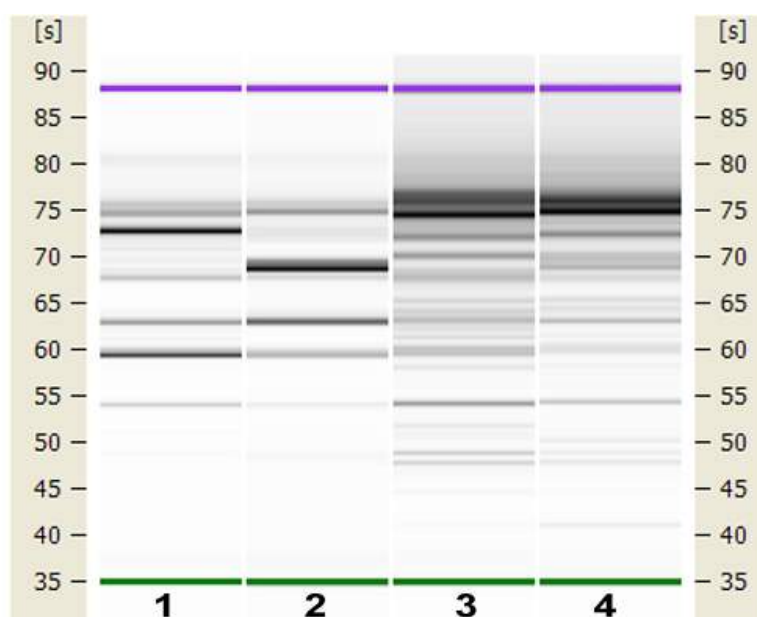


Рис. 4. Сравнительная гель-электрофореграмма разделения ампликонов (ПЦР с праймером OPD-03) сортов Партизанка и Свитязянка: 1 – Партизанка [ЦБС], 2 – Партизанка [ГБС], 3 – Свитязянка [ЦБС], 4 – Свитязянка [ГБС]

Наблюдаемую изменчивость среди растений, регенерированных *in vitro*, можно объяснить соматклональной изменчивостью: мутациями, хромосомными нарушениями, а также возникновением полиплоидных клеток. Для подтверждения генетической идентичности полученных клонов из коллекций двух ботанических садов, работу следует продолжить с использованием других методов РСР анализа.

В отделе биохимии и биотехнологии растений в ботаническом саду на основе препаратов создается ДНК-банк. В банк ДНК попадают образцы хозяйственно-ценных, а также редких и охраняемых растений Беларуси, банк призван решить задачи в области сохранения и изучения биоразнообразия флоры с использованием современных молекулярных методов. Препараты ДНК необходимо сохранять в строго контролируемых условиях (–80°C). К препаратам ДНК для длительного хранения предъявляется



повышенные требования по качеству: препарат ДНК должен быть высокомолекулярным, неповрежденным, быть определенной концентрации и чистоты, не содержать примесей РНК, белков, ДНКаз, ингибиторов активности Taq полимеразы, чтобы обеспечить возможность их использование в дальнейших анализах (секвенирование, генотипирование различными маркерными системами), а также для дальнейшего обмена информацией и ДНК с различными научными центрами мира в области сохранения и изучения биоразнообразия. Таким образом, удаётся сохранить хозяйственно-ценные генотипы сирени, представляющие сорта собственной селекции ЦБС, продуценты биологически-активных веществ, особо-ценные сорта (27 таксонов).

Работа с генетическими ресурсами рода *Syringa* на уровне создания коллекции открытого грунта (таксоны), гербария, семенотеки или банка семян, активной живой коллекции, создания *in vitro* коллекции клеток и тканей лекарственных видов и сортов сирени, а также репрезентативных и востребованных сортов, создание ДНК-банка редких и хозяйственно-ценных видов и сортов с использованием биохимического анализа и молекулярно-генетического типирования отражена в схеме на рисунке 5.

Таким образом, созданная в ЦБС НАН Беларуси, репрезентативная коллекция видов и сортов рода *Syringa* L. постоянно пополняется, что создает предпосылки для сохранения биологического разнообразия, проведения широкого спектра научных исследований, реализации образовательных программ, применения принципиально новых подходов массового размножения для целей озеленения, разработки методов культивирования тканей и клеток растений сирени — продуцентов биологически активных веществ для фармацевтического использования.

**Заключение.** Формирование и создание активной репрезентативной коллекции сирени создает предпосылки как для широкого спектра научных исследований, так и для сохранения и расширения биологического разнообразия *ex situ*. Комплексное исследование с использованием традиционных и биотехнологических подходов позволяет сохранить и увеличить видовое и сортовое разнообразие коллекции сирени ЦБС НАН Беларуси. Отбор образцов для формирования *in vitro* культуральной коллекции клеток и тканей сирени и поддержание генетической

чистоты таксонов проводится на основе современных молекулярно-генетических методов изучения биоразнообразия растений. Создание коллекции меристемных культур и ДНК коллекции редких сортов собственной и зарубежной селекции, а также хозяйственно-ценных таксонов сирени является основой для использования этой культуры при разработке технологии производства посадочного материала, оздоровленного через культуру *in vitro*, а также технологии получения биомассы клеток для фармацевтического использования.



Рис. 5. Схема направлений исследований коллекции сирени.

### Литература

1. Коваль С.Ф., Коваль В.С., Тымчук С.М., Богуславский Р.Л. // Цитология и генетика. 2003. Т. 37. №4. С. 46-53.
2. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура И.И., Глеба Ю.Ю. // Цитология и генетика. 2005. № 1. С. 41-51.
3. Решетников В.Н., Володько И.К., Мотыль М.М. // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. 2003. № 4. С. 5-8.
4. Т.И. Новикова, А.Ю. Набиева, Т.В. Полубоярова // Вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 564 - 572.

5. Murashige T., Skoog F. // *Physiol. Plaht.* 1962. V.15. P.473-497.
6. Lloyd G., McCown B. // *Proc. Inter. Pl. Prop. Soc.* 1980. V. 30. P.421-427.
7. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima R. // *Exp. Cell Res.* 1968. V.50. P.151-158.
8. Simmonds J.A., Comming B.G. // *Sci. Hort.* 1976. V.5. P.161-170.
9. Doyle J.J., Doyle J.L. // *Focus.* 1990. V.12. P. 13-15.
10. Westermeier R. *Electrophoresis in practice (Third Edition).*—WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2001. 349 p.
11. Любаковская Л.А. // *Вестн. фармации.* 2002. № 3. С. 28–30.
12. Подберезкин В.С., Червяковский Е.М., Янцевич А.В., Гаранович И.М., Спиридович Е.В., Курченко В.П. // *Труды Белорусского Государственного Университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем.* 2010. Т.2. С. 34-39
13. Молканова О.И., Зинина Ю.М., Македонская Н.В., Брель Н.Г., Фоменко Т.И., Спиридович Е.В. // *Физиол. и биохим. культур. растений.* 2010. Т. 42., №2. С.117-124
14. Pierik R.L.M., Steegmans H.H.M., Sprenkels P.A. // *Biotechnology in Agriculture and Forestry.* 1992. V.20. P. 407-426.
15. Skrzypczak E. // *Arboretum Kornickie,* 1992, V.37. P.21-41.
16. Wandenmaies S., Bunemann G. // *Acta Horticulturae,* 1991. V.300. P.201-209.
17. Welander N.T. // *J. Hort. Science,* 1987. V.62. P.89-96.
18. Любаковская Л.А., Яковлева О.А. // *Вестн. ВГМУ.* 2010. Т. 9. №. 1. С. 150-155.
19. Яковлева О.А., Любаковская Л.А., Брель Н.Г. // *Вестн. ВГМУ.* 2007. Т. 6. № 4. С. 162-166.
20. Решетников В.Н. Сохранение и изучение генофонда сирени в ЦБС НАН Беларуси / В.Н. Решетников [и др.] // *В кн. Проблемы лесоведения и лесоводства: сборник научных трудов.- Гомель: ИЛ НАН Беларуси.* 2007. С.238 - 245.

Е.В. СПИРИДОВИЧ, Т.И. ФОМЕНКО, Н.В. МАКЕДОНСКАЯ,  
В.П. КУРЧЕНКО, Л.А. ЛЮБАКОВСКАЯ, Н.Г. БРЕЛЬ, А.Н. ЮХИМУК,  
В.Н. РЕШЕТНИКОВ

### **БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В СОЗДАНИИ, ОЦЕНКЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИИ КОЛЛЕКЦИИ СИРЕНИ ЦБС НАН БЕЛАРУСИ**

#### **Резюме**

Комплексное исследование с использованием традиционных и биотехнологических подходов позволяет сохранить и увеличить видовое и сортовое разнообразие коллекции сирени ЦБС НАН Беларуси. Создание коллекции меристемных культур и ДНК коллекции редких сортов собственной и зарубежной селекции сирени является основой использования этой культуры при разработке технологии производства посадочного

материала, оздоровленного через культуру *in vitro*, и технологий получения биомассы клеток для фармацевтического использования.

E.V. SPIRIDOVICH, T.I. FOMENKO, N.V. MAKEDONSKAJA,  
V.P. KURCHENKO, L.A. LUBAKOVSKAJA, N.G. BREL, A.N. UHYMUK,  
V.N. RESHTNIKOV

**BIOTECHNOLOGICAL AND BIOCHEMICAL APPROACHES TO  
CREATION, APPRECIATION AND EMPLOYMENT OF THE LILAC  
COLLECTION IN CBG OF HAS OF BELARUS**

**Summary**

Complex research with use of traditional and biotechnological approaches allows to keep and increase a specific and high-quality variety of a lilac collection of TSBS HAH of Belarus. Creation of meristems cultures collection and DNA collection of rare own and foreign selection lilac species is a basis for use of this culture for production technology of the landing material improved through culture *in vitro*, and also for working out of technologies of reception of cell biomass for pharmaceutic uses.

*Поступила в редакцию 29.04.2011 г.*