

Национальная академия наук Беларуси  
Центральный ботанический сад  
Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований

Российская академия наук  
Институт физиологии растений имени К. А. Тимирязева  
Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова



*Russian Academy of Sciences*



**ИФРРАН**



# Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология

*Тезисы докладов XI Международной конференции,  
которая знаменует полувековую историю по исследованию  
культивируемых *in vitro* клеток высших растений  
и 60-летие деятельности отдела биохимии и биотехнологии растений  
государственного научного учреждения  
«Центральный ботанический сад НАН Беларуси»*

*(г. Минск, 23–27 сентября 2018 г.)*

Минск  
«Медисонт»  
2018

УДК 58(4/5)(082)  
ББК 28.5  
Б63

XIth International conference  
«The biology of plant cells *in vitro* and biotechnology»  
(September 23–27, 2018, Minsk, Republic of Belarus)

Редакционная коллегия:

В. Н. Решетников, д-р биол. наук, академик НАН Беларуси;  
В. В. Титок, д-р биол. наук, чл.-корр. НАН Беларуси;  
А. М. Носов, д-р биол. наук, профессор;  
А. В. Носов, д-р биол. наук

Рецензенты:

В. М. Юрин, д-р биол. наук, профессор;  
Е. В. Спиридович, канд. биол. наук, доцент.

**Биология** клеток растений *in vitro* и биотехнология = The biology of plant cells *in vitro* and biotechnology : тезисы докладов XI Международной конференции, которая знаменует полувековую историю по исследованию культивируемых *in vitro* клеток высших растений и 60-летие деятельности отдела биохимии и биотехнологии растений государственного научного учреждения «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» (г. Минск, 23–27 сентября 2018 г.) / Национальная академия наук Беларуси; Центральный ботанический сад; Белорусский республиканский фонд фундаментальных исследований; Российская академия наук; Институт физиологии растений имени К. А. Тимирязева; Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова; редкол.: В. Н. Решетников [и др.]. — Минск : Медисонт, 2018. — 334 с.

ISBN 978-985-7199-23-5.

В материалы XI Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» включены научные сообщения, посвященные молекулярно-биологическим, генетическим, биохимическим и генетическим особенностям культивируемых клеток растений. Рассматриваются вопросы регуляции морфогенеза клеток *in vitro*, формирования и содержания биотехнологических коллекций, микроклональное размножение, а также культура клеток растений в промышленной биотехнологии.

Сборник материалов предназначен для широкого круга специалистов в области физиологии и биохимии растений, биотехнологии растений, преподавателей и студентов соответствующего профиля.

УДК 58(4/5)(082)  
ББК 28.5

ISBN 978-985-7199-23-5

© Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси, 2018  
© Оформление. ООО «Медисонт», 2018

## Введение в культуру *in vitro* редкого вида *Gentiana cruciata* L.

**Вайновская И. Ф., Чижик О. В., Власова А. Б., Спиридович Е. В.**

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, ул. Сурганова, 2 в, Минск, 220012, Беларусь,  
тел./факс: +375(17)284-17-47, e-mail: ilonavain@mail.ru

Происходящее в настоящее время обеднение генофонда растений приводит к нарушению функционирования природных экосистем. Наиболее перспективным направлением в решении проблемы сохранения генофонда и биоразнообразия является применение биотехнологических методов, в частности, сохранение редких и исчезающих видов растений в культуре *in vitro*. Цель исследования — разработка методов введения в культуру ткани и культивирования *in vitro* охраняемого вида *Gentiana cruciata* L. (горечавки крестовидной). Вид занесен в 1-е и 2-е издания Красной книги Беларуси (1981, 1993). Категория охраны: 1.

Эксплантами служили семена *Gentiana cruciata* L., собранные сотрудниками отдела биохимии и биотехнологии растений в Мядельском р-не (окрестности оз. Нарочь), где найдена природная популяция горечавки. Опыты показали, что при хранении семян при пониженной температуре (от  $-5^{\circ}\text{C}$  до  $+5^{\circ}\text{C}$ ), сохраняется всхожесть и ускоряется прорастание. Стерилизацию проводили по следующей схеме: замачивали в воде (60 мин.); переносили в раствор детергента — 15 мин.; отмывали под проточной водой 10 мин.; замачивали в растворе фунгицида «Прозаро» (15 мин.); отмывали стерильной дистиллированной водой; подвергали воздействию стерилизующих агентов; промывали стерильной дистиллированной водой в несколько смен. Комбинации стерилизующих агентов: 70 % этанол (1 мин.) + 0,1 % диацид (10 мин.); 70 % этанол (1 мин.) + 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 мин.); 70 % этанол (1 мин.) + 0,01 %  $\text{AgNO}_3$  (15 мин.). Применяемые нами схемы стерилизации по-разному влияли на жизнеспособность семян и последующее развитие проростков. Максимального числа жизнеспособных и минимального числа инфицированных семян удалось достичь при использовании комбинации стерилизующих растворов, а именно при последовательном выдерживании семян в 70 % этаноле (1 мин.) и 0,01 %-м растворе нитрата серебра (15 мин.).

После стерилизации семена для прорастания помещали на питательную среду по Мурасиге-Скута без регуляторов роста, содержащую: инозит — 100 мг/л, тиамин-НСI — 1 мг/л, никотиновую кислоту — 1 мг/л, пиридоксин-НСI — 1 мг/л, сахарозу — 2 %, агар — 0,8 %; рН среды 5,8. В целом, всхожесть семян *Gentiana cruciata* L. по сравнению с другими видами довольно низкая. Семена после стерилизации прорастали на среде культивирования через 45–50 дней.

Во втором пассаже использовали модифицированные питательные среды, дополненные витаминами и регуляторами роста (6-БАП, ИУК). Культивирование проводили при температуре 22–24 $^{\circ}\text{C}$ , длине дня — 16 часов, освещенности — 4000 люкс (лампы Floga). Скорость роста полученных молодых растений была относительно низкой. Высоты 25–35 мм они достигали через 60 дней. В этом возрасте они имели в среднем 8–10 нормально развитых листьев. Все проростки, которые культивировали на питательной среде, дополненной регуляторами роста, были использованы в дальнейшем для микрочеренкования. Использование методов культуры ткани является оптимальным решением задачи как для размножения видов с затрудненным размножением *in situ* и *ex situ*, так и при массовом производстве ценных генотипов растений из коллекций ботанических садов.

# Introduction to a culture *in vitro* of a rare species of *Gentiana cruciata* L.

**Vainovskaya I. F., Chizhik O. V., Vlasava N. B., Spiridovich E. V.**

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, 2v Surganova st., 220012,  
Minsk, Republic of Belarus, tel.: +375(17)284-14-74, fax: +375(17)284-14-64, e-mail: ilonavain@mail.ru

.....

The present depletion of the gene pool of plants leads to a disruption of the functioning of natural ecosystems. The most promising direction in solving the problem of preserving the gene pool and biodiversity is the use of biotechnological methods, in particular, the conservation of rare and endangered plant species in culture *in vitro*. The aim of the work is to develop methods for introducing into the tissue culture and *in vitro* cultivation of the protected species *Gentiana cruciata* L. The species is listed in the 1st and 2nd editions of the Red Book of Belarus (1981, 1993). Protection category: 1.

Explorers were seeds of *Gentiana cruciata* L., collected by employees of the Department of Biochemistry and Biotechnology of Plants in Myadel District (near Lake Naroch), where a natural population of gentian was found. Experiments have shown that when seeds are stored at a low temperature (–50°C to +5°C) germination is maintained and germination is accelerated. Sterilization was carried out according to the following scheme: soaked in water (60 min.); transferred to detergent solution — 15 minutes; washed under running water for 10 minutes; soaked in a solution of fungicide “Prozaro” (15 min); washed with sterile distilled water; sterilizing agents; washed with sterile distilled water in several shifts. Combinations of sterilizing agents: 70 % ethanol (1 min.) + 0.1 % diacid (10 min.); 70 % ethanol (1 min.) + 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 min.); 70 % ethanol (1 min.) + 0.01 % AgNO<sub>3</sub> (15 min.). The sterilization regimens used by us had different effects on the viability of the seeds and the subsequent development of seedlings. The maximum number of viable and the minimum number of infected seeds was achieved by using a combination of sterilizing solutions, namely, by successively maintaining the seeds in 70 % ethanol (1 min.) and 0.01 % silver nitrate solution (15 min).

After sterilization, seeds for germination were placed on a nutrient medium according to Murashige, Skoog without growth regulators, containing: inositol 100 mg/l, thiamine-HCl 1 mg/l, nicotinic acid 1 mg/l, pyridoxine HCl 1 mg/l, sucrose — 2 %, agar — 0.8 %; pH of the medium is 5.8. In general, the germination capacity of *Gentiana cruciata* L. seeds is rather low compared to other species. Seeds after sterilization sprouted on culture medium after 45–50 days.

In the second passage, modified nutrient media supplemented with vitamins and growth regulators (6-BAP, IAA) was used. The cultivation was carried out at a temperature of 22–24 °C, the length of the day was 16 hours, and the illumination level was 4000 lux (Flora lamps). The growth rate of the young plants obtained was relatively low. They reached heights of 25–35 mm in 60 days. At this age, they had an average of 8–10 normally developed leaves. All sprouts that were cultured on a nutrient medium supplemented with growth regulators were subsequently used for micro-engraving. The use of tissue culture methods is the optimal solution of the problem both for reproduction of species with difficult reproduction *in situ* and *ex situ*, and for mass production of valuable plant genotypes from botanical garden collections.