

УДК 634.72: 581.149

## ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕПОНИРОВАНИЯ *RUBUS IDAEUS* L.

Князева И.В., канд. биол. наук,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства" (Москва)

**Реферат.** Разработка эффективных методов клонального микроразмножения растений является основным и необходимым условием в работах по созданию и сохранению генетических банков *in vitro*. Изучение действия температурного режима и минерального состава питательной среды на сохранение эксплантов малины (сорта Брянское Диво) позволило определить оптимальные условия культивирования на среде с добавлением маннита в концентрациях – 0,75%; 1,05% и температуры  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Совместное использование маннита и температуры позволило увеличить сроки беспересадочного культивирования до 6 месяцев и сохранить жизнеспособность растений на уровне 45 %. При депонировании в условиях низких положительных температур ( $+4-6^{\circ}\text{C}$ ) оптимальным источником органического питания оказалась сахароза. Жизнеспособность контрольных образцов была выше (30 %), чем опытных (5 %) на протяжении 12 месяцев среднесрочного хранения.

**Ключевые слова:** малина, сохранение, температура, жизнеспособность, осмотически активные вещества.

**Summary.** The development of effective methods for clonal micropropagation of plants is the main and necessary condition for the creation and conservation of genetic banks *in vitro*. The study of the effect of the temperature regime and the mineral composition of the nutrient medium on the preservation of raspberry explants (varieties Bryansk Divo) made it possible to determine the optimal cultivation conditions on the medium with the addition of mannitol in concentrations of 0.75%; 1.05% and temperatures  $25 \pm 10\text{C}$ . The combined use of mannitol and temperature allowed to increase the terms of direct cultivation up to 6 months and maintain the plant viability at the level of 45%. When deposited at low positive temperatures ( $+ 4-60^{\circ}\text{C}$ ), sucrose proved to be the optimal source of organic nutrition. The viability of the control samples was higher (30%) than the experimental ones (5%) during 12 months of medium-term storage.

**Key words:** raspberry, conservation, temperature, viability, osmotically active substances.

**Введение.** Разработка эффективных методов клонального микроразмножения растений является основным и необходимым условием в работах по созданию и сохранению генетических банков *in vitro*. Существуют несколько способов сохранения генофонда высших растений. Один из которых связан с техникой культивирования *in vitro* и криосохранением различных объектов при температуре жидкого азота [1, 2].

Хранение *in vitro* в условиях замедленного роста широко используется в современных генбанках для поддержания органов растений или целых растений в условиях, замедляющих темпы развития с целью снижения затрат труда и частоты перемещений, которые могут сопровождаться риском заражения и стрессовыми условиями, создающими в конечном итоге угрозу для генетической стабильности [3].

Важным фактором успешного культивирования микрорастений ягодных культур является оптимизация минерального состава питательной среды и температурного режима. В зависимости от видовой специфики растений применяются некоторые модификации используемых сред для более длительного сохранения растительного

материала. В качестве фактора, замедляющего рост растений, может выступать пониженная температура в интервале от  $-1^{\circ}\text{C}$  до  $+10^{\circ}\text{C}$  и добавление в питательные среды органических веществ, обладающих высокой осмотической активностью: сахарозу, глюкозу, маннита или сорбита [4, 5].

Осмотические компоненты в искусственной питательной среде используются как для увеличения длительности хранения, так и для продления сроков жизнеспособности растений. Культивирование на модифицированной питательной среде с добавлением сорбита и сахарозы (3% и 5%) при нормальной скорости роста ( $+24-26^{\circ}\text{C}$ ) и в условиях пониженных положительных температур ( $+3-6^{\circ}\text{C}$ ) позволили поддерживать сохранность микрорастений сортов рябины в течение 26 месяцев на уровне 21-75 % и 47-60 % соответственно [6].

Цель работы: изучить влияние осмотически активных веществ на жизнеспособность эксплантов ягодных культур при длительном хранении *in vitro*.

**Объекты и методы исследований.** Исследования проводили на базе лаборатории биотехнологии ФГБНУ ВСТИСП в 2018-2019 гг. В качестве объекта исследований использовали растения малины *Rubus idaeus* L. (сорт Брянское Диво) из генетической коллекции *in vitro*.

Растительный материал размножали по стандартной технологии на питательной среде на основе Мурасиге и Скуга (МС), дополненную 0,7 мг/л 6-бензиламинопкринина (БАП), 0,1 мг/л индолил-3-масляной кислоты (ИМК), 30 г/л сахарозы и 8 г/л агар-агара (Panreac, Spain), с целью получения нужного для эксперимента количества отдельных эксплантов (микропобегов) [7].

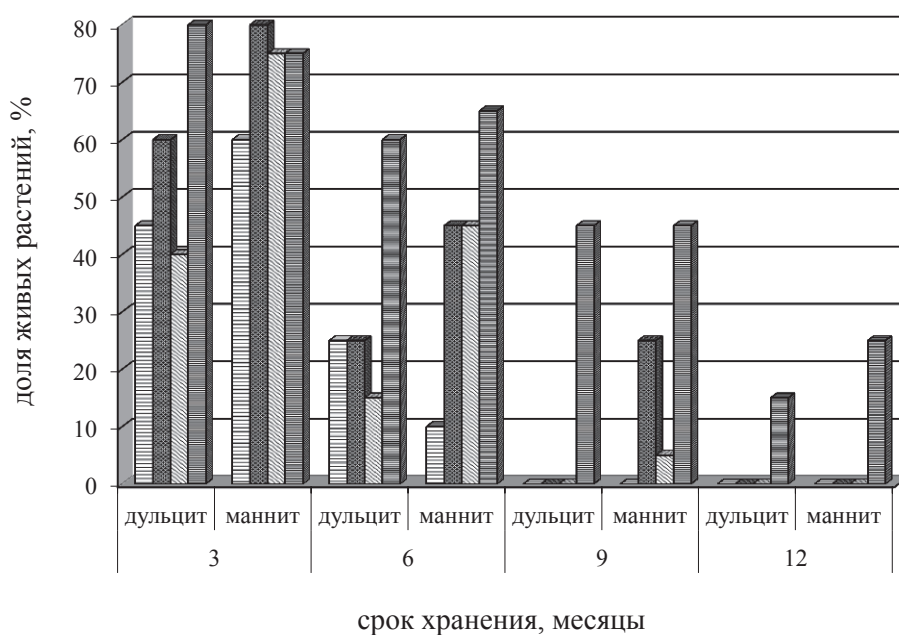
Культивирование осуществляли в климатической камере КС-200 (Россия) при нормальной скорости роста ( $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 16-часовом фотопериоде и освещенности 2500-3000 люкс) и в холодильной камере марки Liebherr (Германия) в условиях положительных пониженных температур ( $4-6^{\circ}\text{C}$ ), при интенсивности освещения -500-1000 люкс и режиме короткого дня 8/16 ч). В качестве культуральных сосудов использовали химические пробирки  $1,5 \times 16$  см, предварительно стерилизованные сухим жаром ( $+ 150-200^{\circ}\text{C}$ ) с 10 мл агаризованной среды.

Микропобеги высаживались на питательную среду (в каждую пробирку по одному растению – 20 шт. на вариант) с добавлением осмотически активных соединений (маннита и дульцита) в концентрации 0,45 (1-й вариант), 0,75 (2-й вариант) и 1,05 % (3-й вариант), в качестве контроля служила среда с добавлением сахарозы 3,0 %. Учёт состояния образцов (количество живых и погибших растений, %) проводили один раз в месяц.

Экспланты находились в стандартных условиях культивирования (климатической камере) в течение двух недель культивирования, затем микрочеренки переносили на среднесрочное хранение в холодильную камеру.

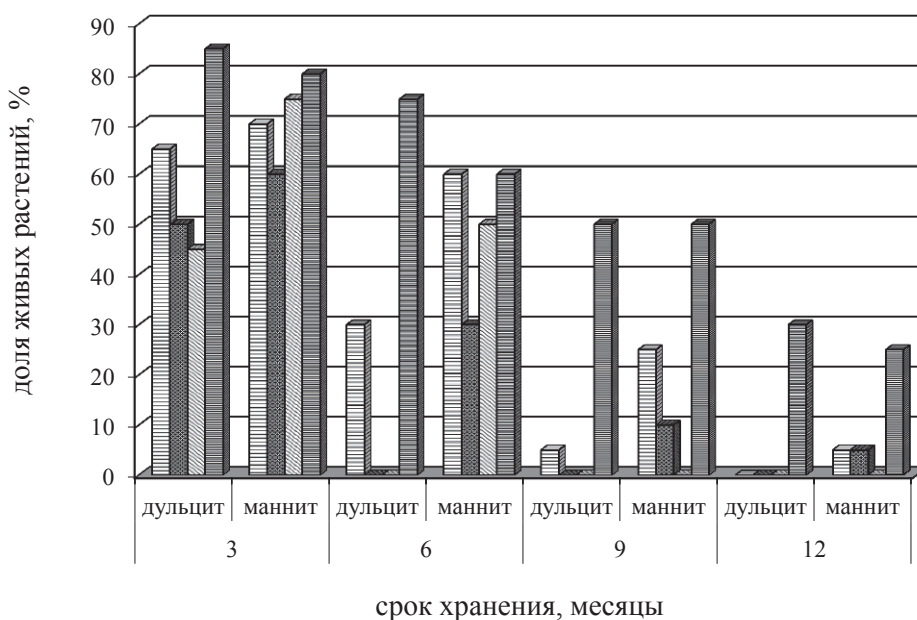
**Обсуждение результатов.** Изучение влияния сахаров и осмотически активных веществ в зависимости от температурного режима в процессе хранения эксплантов малины сорта Брянское Диво показало, что использование маннита в концентрации (0,75%) при температуре  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  позволило сохранить жизнеспособность микрорастений на уровне 25 % в течение 9 месяцев. Микрорастения малины, культивируемые на среде с дульцитом, к 9-му месяцу хранения все погибли (рис. 1). Наибольшая сохранность микрорастений малины в данных условиях отмечена на питательной среде с сахарозой до 45 % (на протяжении 9 месяцев) и 25 % (12 месяцев).

У микрорастений малины, хранящихся при низкой положительной температуре ( $+4-6^{\circ}\text{C}$ ) в течении 12 месяцев на среде с маннитом, доля живых растений составила 5%; на среде с дульцитом отмечалась полная гибель эксплантов. В отличие от опытных контрольные растения (на среде с сахарозой) сохраняли жизнеспособность на уровне 30% (рис. 2).



□ 0,45 % (1 вариант)    ▨ 0,75 % (2 вариант)    ▩ 1,05 % (3 вариант)    ▪ 3,0 % ( контроль)

Рисунок 1 – Влияние осмотически активных веществ на сохранение микрорастений малины сорта Брянское Диво при температуре  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ .



□ 0,45 % (1 вариант)    ▨ 0,75 % (2 вариант)    ▩ 1,05 % (3 вариант)    ▪ 3,0 % ( контроль)

Рисунок 2 – Влияние осмотически активных веществ на сохранение микрорастений малины сорта Брянское Диво при температуре  $+4-6^{\circ}\text{C}$ .

Анализ результатов опытов показал, что добавление в питательную среду осмотически активных веществ сохраняет жизнеспособность эксплантов малины на протяжении 9 месяцев (на среде с добавлением маннита) и 6 месяцев (на среде с добавлением дульцита) при температуре  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . В условиях низких положительных температур срок хранения опытных экземпляров на модифицированной среде увеличивался на 3 месяца. Однако доля живых растений была низкой – 5%. Оптимальным компонентом питательной среды для хранения микрорастений малины в разных температурных режимах оказалась сахароза.

**Выводы.** Изучение действия температурного режима и минерального состава питательной среды на сохранение эксплантов малины (сорта Брянское Диво) позволило определить оптимальные условия культивирования на среде с добавлением маннита в концентрациях – 0,75%; 1,05% и температуры  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Совместное использование маннита в указанных концентрациях и температуры позволило увеличить сроки беспересадочного культивирования до 6 месяцев и сохранить жизнеспособность растений на уровне 45 %. При депонировании в условиях низких положительных температур ( $+4-6^{\circ}\text{C}$ ) оптимальным источником органического питания оказалась сахароза. Жизнеспособность контрольных образцов была выше (30 %), чем опытных (5 %) на протяжении 12 месяцев среднесрочного хранения. Применение разработанных элементов технологии оптимизации содержания микрорастений дает возможность более успешно решать проблему поддержания и сохранения в живом виде образцов вегетативно размноженных растений в контролируемых условиях среды.

#### Литература

1. Сорокопудов В.Н., Сорокопудова О.Н., Князева И.В., Бурменко Ю.В. Биотехнологические приемы поддержания коллекции рода *Ribes* L. // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты). Материалы VIII Международной научно-практической конференции. - 2018. - С. 198.
2. Борисова А.А., Куликов И.М., Тумаева Т.А., Князева И.В. Создание современных генбанков-фундаментальная задача для решения проблем импортозамещения. // Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира (физиолого-биохимические, эмбриологические, генетические и правовые аспекты). Материалы VIII Международной научно-практической конференции. - 2018. - С. 29.
3. ФАО. Стандарты генных банков для генетических ресурсов растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства. Издание второе, исправленное и дополненное. Рим. - 2015. – 162 с.
4. Brailko V., Ivanova N., Mitrofanova I. Characteristics of the Assimilation in the Clematis Plants Propagated In Vitro // In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant. – 2018 – Vol. 58, Suppl. 1 – P. 45 <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9929-7>.
5. Ozudogru E.A., Previati A., Lambardi M. In Vitro Conservation and Cryopreservation of Ornamental Plants // Protocols for In Vitro Propagation of Ornamental Plants. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols) / Eds. Jain S.M., Ochatt S. – Vol. 589. – New York: Dordrecht: Heidelberg: London: Springer: Humana Press, 2010 – P. 303-324 <https://doi.org/10.1007/978-1-60327-114-128>.
6. Бьядовский И.А. Влияние компонентов питательной среды и пониженной температуры на способность к хранению рябины (*Sorbus*). // Плодоводство и ягодоводство России. Т. 48. - № 2. - 2017. - С. 60-64.
7. Алексеенко Л.В., Высоцкий В.А. Методика регенерации плодовых и ягодных растений в культуре эксплантов различного происхождения. М., 2008. – 25 с.