

ВЛИЯНИЕ ОСМОТИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ НА РОСТОВЫЕ ПРОЦЕССЫ РЕГЕНЕРАНТОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Н.Н. Черкасова

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт
сахарной свеклы и сахара имени А.Л. Мазлумова»
e-mail: biotechnologiya@mail.ru

Аннотация. Изучено влияние осмотических ингибиторов при длительном беспересадочном хранении микроклонов сахарной свеклы в культуре *in vitro*. Выявлены оптимальные концентрации (5 г/л) маннита и сорбита в питательной среде, приводящие к замедлению роста и сохранению микроклонов на протяжении четырех месяцев культивирования. При последующей пересадке в стандартные условия культивирования рост микроклонов возобновлялся в течение двух–трех недель.

Ключевые слова: растения-регенеранты, *in vitro*, маннит, сорбит, питательная среда, сахарная свекла, депонирование.

В настоящее время для создания и сохранения коллекции растений используют биотехнологические методы. Культура *in vitro* позволяет поддерживать материал в среде, свободной от патогенов и влияния неблагоприятных природных факторов, а также в кратчайшие сроки получить большое количество растений при недостатке исходного материала, генетически идентичного виду или форме.

Хранение в условиях замедленного роста позволяет поддерживать биологический материал от нескольких месяцев до 2–3 лет без субкультивирования. Длительное хранение проводят различными способами: на питательной среде без регуляторов роста; при изменении состава и разбавления минеральной основы; при добавлении в среду ингибиторов роста и ретардантов; изменении светового и температурного режима и др. При длительном беспересадочном субкультивировании на питательных средах с осмотиками, как ингибиторами роста, происходит снижение метаболической активности тканей культивируемых растений. Установлено, что оптимальное сочетание условий культивирования позволяет увеличить как период культивирования, так и жизнеспособность эксплантов [1, 2].

Исследования, проведенные на таких культурах, как виноград [3], земляника [4], картофель [5], сахарная свекла [6], а также на плодовых деревьях [7] и др., показали возможность сохранения растительного материала при беспересадочном режиме в течение 12 и более месяцев при использовании различных способов культивирования. Использование длительного хранения позволяет в значительной степени снизить затраты на оздоровление вегетативно размножаемых растений, обеспечить ценность их сортов и видов.

Следует отметить, что одни и те же приемы замедления ростовых процессов не всегда могут быть использованы для разных видов растений, в связи с их высокой видоспецифичностью, поэтому поиск веществ, одновременно замедляющих рост растений и поддерживающих их жизнеспособность в течении длительного периода времени, и отработка способов их применения являются актуальной задачей.

Использование метода длительного культивирования позволит с минимальными затратами сохранить селекционно-ценный исходный материал в неизменном виде, сократить продолжительность и увеличить эффективность селекционного цикла, что является важным направлением исследований.

Один из способов замедления роста при хранении коллекции микроклонов является применение осмотиков – веществ, имитирующих для растения недостаток влаги. Действие водного стресса на растение выражается в снижении скорости ростовых процессов, угнетении фотосинтеза и дыхания, снижается ферментная активность, изменяется соотношение минеральных веществ [8, 9]. Как показал обзор литературы по данному вопросу, сведения касающиеся влияния осмотических ингибиторов на жизнеспособность регенерантов сахарной свеклы в культуре *in vitro*, малочисленны. В связи с этим исследования по этому вопросу являются актуальными.

Таблица 1. Влияние осмотических ингибиторов (маннит, сорбит) на снижение скорости роста и сохранение жизнеспособности микроклонов сахарной свеклы (среднее по всем генотипам)

Вариант сред	Количество, мг/л			Выживаемость, %				Высота, см			
	сорбит	маннит	сахароза	20 дней	2 мес.	3 мес.	4 мес.	1 мес.	2 мес.	3 мес.	4 мес.
Контроль	–	–	20	100	95,0	60,0	42,0	2,4	3,4	3,0	2,5
1	5	–	–	100	74,4	66,6	60,0	3,2	3,0	2,5	2,5
2	10	–	–	100	58,3	41,7	45,5	2,7	2,6	1,9	1,8
3	15	–	–	100	58,3	41,7	33,3	2,8	2,6	1,8	1,6
4	20	–	–	66,7	33,3	33,3	22,2	2,2	1,2	0,3	0
5	25	–	–	44,6	0	0	0	2,5	1,2	0	0
6	–	5	–	100	66,7	60,0	58,0	2,9	3,2	2,8	2,6
7	–	10	–	100	75,0	62,0	41,7	3,1	3,0	2,8	2,6
8	–	15	–	83,3	58,3	16,7	0	2,7	1,9	1,2	0
9	–	20	–	73,0	0	0	0	2,5	2,4	0	0
10	–	25	–	75,0	0	0	0	2,3	1,7	0	0
11	5	–	20	100	86,3	75,0	62,0	3,4	3,7	3,5	3,5
12	10	–	20	90,1	77,7	59,5	54,5	2,8	2,7	2,4	2,6
13	15	–	20	85,0	63,6	36,4	18,2	3,1	3,0	2,5	1,9
14	20	–	20	62,5	25,0	12,5	0	4,0	3,1	2,4	0,6
15	–	5	20	100	86,4	78,4	63,6	3,3	3,3	3,5	3,5
16	–	10	20	90,9	63,6	54,5	50,4	3,3	3,5	3,0	2,5
17	–	15	20	81,9	63,6	54,5	36,4	3,1	2,8	2,0	1,0
18	–	20	20	71,4	55,6	33,3	0	2,9	2,4	1,9	0

Цель исследований – изучить влияние различных концентраций маннита и сорбита на жизнеспособность растений сахарной свеклы для продолжительного беспересадочного хранения и создания вегетирующей коллекции в культуре *in vitro*.

Научные исследования выполнены на базе лаборатории культуры тканей и молекулярной биологии ФГБНУ «Всероссийский НИИ сахарной свеклы и са-

хара имени А.Л. Мазлумова» с использованием биотехнологических методов культуры *in vitro* [10].

В качестве исходного материала в опытах были использованы генотипы сахарной свеклы Рамонской селекции: МС-2113, ОП-14044, предоставленные доктором сельскохозяйственных наук М.А. Богомоловым.

Культивирование микроклонов проводили при 16-ти часовом фотопериоде, температуре 23–26 °С, освещенности 5 тыс. люкс и влажности воздуха 70 %.

В качестве эксплантов использовали микроклоны сахарной свеклы.

Для выявления жизнеспособности микроклонов сахарной свеклы при длительном культивировании использовали осмотические ингибиторы роста – маннит и сорбит в различной концентрации (5–25 г/л).

Результаты проведенных исследований показали, что добавление в питательную среду сорбита и маннита повышает приживаемость микроклонов на начальных этапах развития (20 дней), особенно при концентрации 5–15 г/л, где она составила 100 % (табл.).

Более высокие концентрации веществ (20 г/л сорбита и 15 г/л маннита) приводили к снижению жизнеспособности микроклонов уже

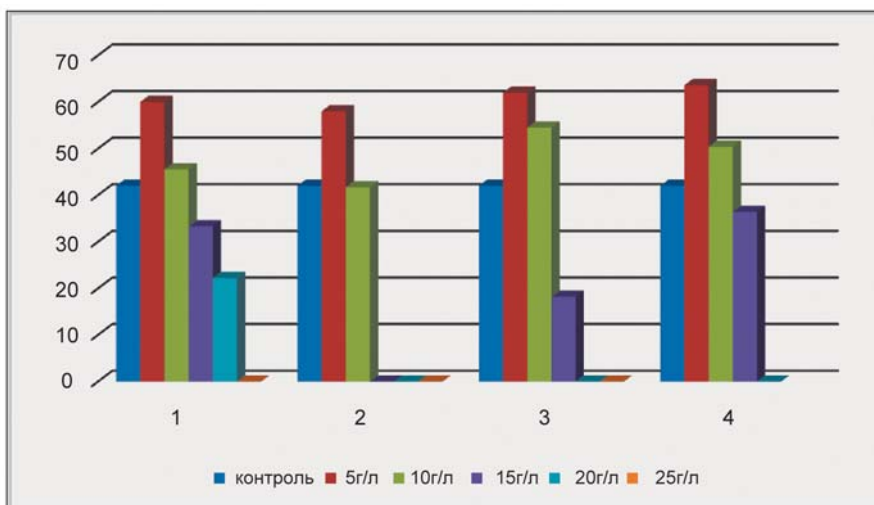


Рисунок 1. Сохранность микроклонов сахарной свеклы в течение 4 месяцев культивирования при различных концентрациях (г/л): 1 – сорбита; 2 – маннита; 3 – сорбита + 20 г/л сахарозы; 4 – маннита + 20 г/л сахарозы

в начале развития, а к четырем месяцам культивирования жизнеспособность снижалась до 22,2 %, что в дальнейшем приводило к гибели микроклонов (рис. 1).

Интенсивность ростовых процессов на протяжении всего периода культивирования была замедлена, особенно при концентрациях 15–25 г/л. При повышенных концентрациях сорбита и маннита наблюдался резкий спад ростовых процессов, что приводило к гибели микроклонов. В течение 2–3 месяцев хранения отмечали признаки некроза у регенерантов сахарной свеклы. Изменение зеленой окраски начиналось постепенно, распространяясь по листу, независимо от положения на растении. Иногда листочки приобретали коричневую окраску, некоторые из них отмирали. С удлинением периода хранения микроклональных растений описанные выше процессы становились у них более выраженными. Полностью засохшие или некротизированные растения обычно наблюдали спустя четыре месяца при концентрации сорбита 20–25 г/л, маннита 15–25 г/л (рис. 2).

На протяжении четырех месяцев культивирования оптимальное развитие растений сахарной свеклы происходило при внесении 5 г/л сорбита и маннита, что способствовало замедлению скорости роста и сохранению 60,0–58,0 % микроклонов. Добавление сахарозы (20 г/л) в питательные среды с сорбитом и маннитом (5 г/л) повышало выживаемость до 62,0–63,6 % (рис. 3).

Добавление осмотических ингибиторов (маннит, сорбит) в питательные среды при концентрации 5 г/л приводило к снижению метаболической активности тканей культивируемых растений, не вызывая токсического эффекта, замедлению процессов старения, сохранению жизнеспособности, что дало возможность увеличить интервал между пересадками до 4 месяцев вместо 2–4 недель.

К четвертому месяцу культивирования на всех вариантах начала отмечаться незначительная гибель микроклонов из-за усыхания питательной среды, отмечен также некроз и отмирание листьев, в тоже

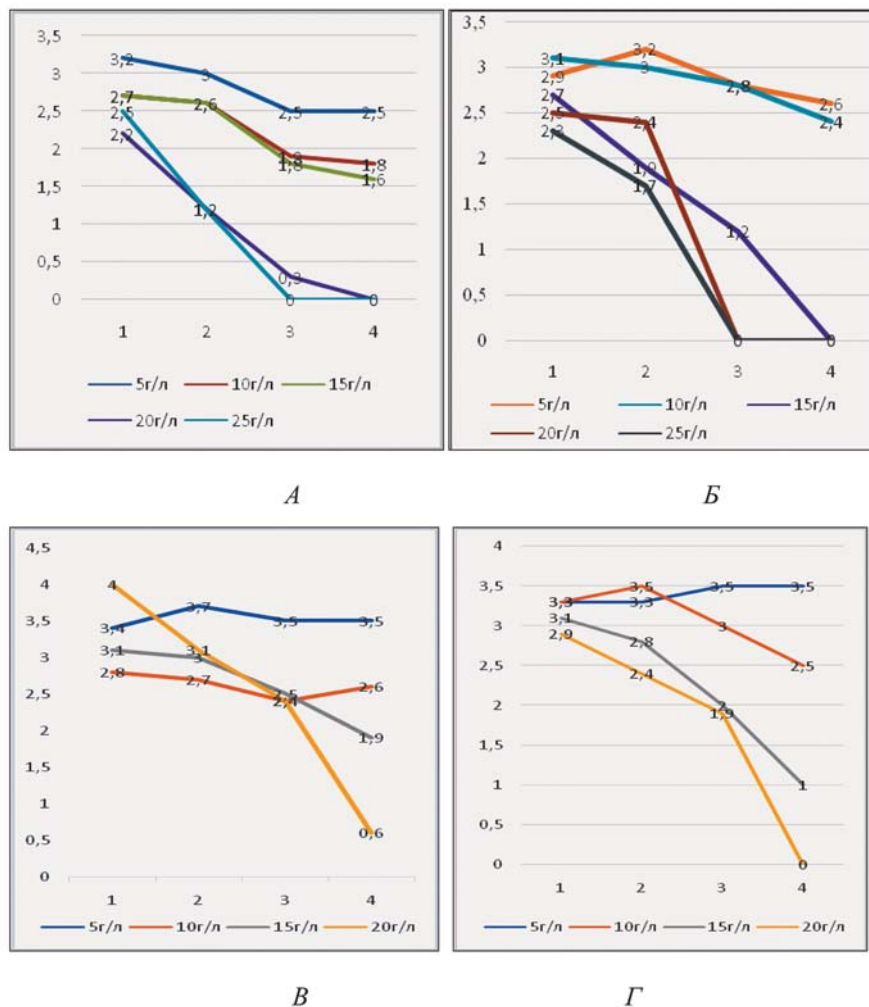


Рисунок 2. Динамика роста растений сахарной свеклы в течение четырехмесячного беспересадочного хранения в культуре *in vitro* при различных концентрациях:

А – сорбит; Б – маннит; В – сорбит + 20 мг/л сахарозы;

Г – маннит + 20 мг/л сахарозы

время микроклоны оставались жизнеспособными. При последующей пересадке эксплантов в стандартные условия культивирования рост возобновлялся в течение двух – трех недель (рис. 4).

Проведенные исследования позволили выявить факторы длительного беспересадочного хранения ми-

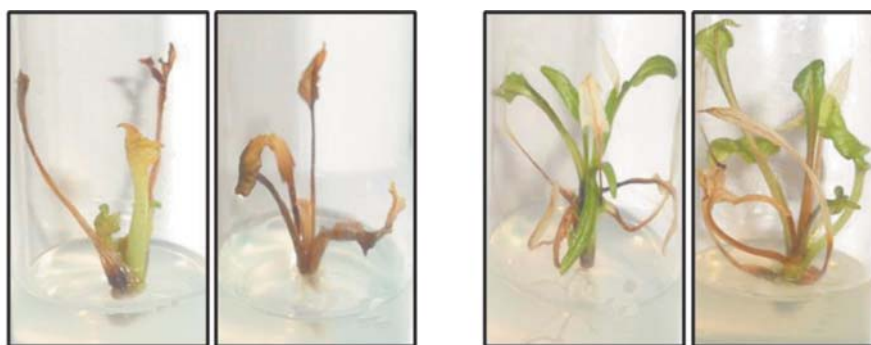


Рисунок 3. Микроклоны сахарной свеклы после четырех месяцев депонирования при различных концентрациях осмотиков: 1,2 – 20–25 г/л; 3,4 – 5 г/л.

кроклонов сахарной свеклы в культуре *in vitro*.

Изучено влияние осмотических ингибиторов (сорбит, маннит) на снижение скорости роста и сохранение жизнеспособности микроклонов. Было выявлено, что добавление в питательную среду осмотических ингибиторов маннита и сорбита в концентрации 5 г/л в питательную среду способствовало снижению скорости роста и сохранению жизнеспособности микроклонов на протяжении четырех месяцев без пересадок его на свежую питательную среду. Что дает возможность более успешно решать проблему поддержания и сохранения в живом виде селекционно ценных образцов сахарной свеклы в контролируемых условиях среды. Данные исследования имеют огромную практическую ценность, так как позволяют в неограниченном количестве сохранять и поддерживать в культуре *in vitro* ценные генотипы сахарной свеклы и компоненты перспективных гибридов.

Список использованной литературы

1. Молканова, О.И. Генетические банки растений: проблемы формирования, сохранения и использования / О.И. Молканова, О.И. Коротков, Е.М. Ветчинкина, Н.А. Мамаева, О.Г. Васильева // Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о Земле. — 2010. — № 3. — С. 33-39.
2. Митрофанова, И.В. Создание медленно растущих коллекций *in vitro* ценного растительного генофонда в Никитском ботаническом саду — национальном научном центре / И.В. Митрофанова // Интродукція рослин, збереження та збагачення біорізноманіття в ботанічних садах і дендропарках. — 2010. — С. 611-613.
3. Дорошенко, Н.П. Создание и хранение коллекции винограда *in vitro* / Н.П. Дорошенко, Т.В. Жукова // Русский виноград. — 2016. — Т. 3. — С. 8-14.
4. Высоцкая, О.Н. Испытания технологий длительного сохранения *in vitro* коллекций земляники / О.Н. Высоцкая, Е.К. Спринчану, В.А. Высоцкий // Плодоводство и ягодоводство России. — 2016. — Т. 45. — С. 50-53.
5. Дерябин, А.Н. Образование и морфометрические показатели микро-клубней картофеля *in vitro* при разном составе сахаров в среде / А.Н. Дерябин, Н.О. Юрьева // Сельскохозяйственная биология. — 2011. — № 1. — С. 54-59.
6. Подвигина, О.А. Депонирование селекционного материала сахарной свеклы на искусственных питательных средах / О.А. Подвигина, В.В. Знаменская, Л.А. Цупикова // Сахарная свекла. — 2000. — № 12. — С. 18. — 19.
7. Шорников, Д.Г. Оптимизация условий культи-



Рисунок 4. Микроклоны сахарной свеклы при последующей пересадке в стандартные условия культивирования.

вирования *in vitro* ягодных и декоративных культур / Д.Г. Шорников, С.А. Брюхина, С.А. Муратова, М.Б. Янковская, Р.В. Папихин // Вестник ТГУ. — 2010. — Т. 15. — Вып. 2. — С. 640-645.

8. Бьядовский, И.А. Влияние различных источников углерода на способность к хранению клоновых подвоев яблони и груши *in vitro* / И.А. Бьядовский // Плодоводство и ягодоводство России. — 2014. — Т. 39. — С. 44-47.

9. Кутас, Е.Н. Влияние осмотических ингибиторов на снижение скорости роста и сохранение жизнеспособности стерильных культур / Е.Н. Кутас, А.А. Горецкая // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Серыя Біялагічных Навук. — 2013. — № 4. — С. 24-29.

10. Знаменская, В.В. Микроклонирование *in vitro* как метод поддержания и размножения линий сахарной свеклы / В.В. Знаменская // Энциклопедия рода Beta: Биология, генетика и селекция свеклы. Новосибирск. — 2010. — С. 420-437.

Influence of osmotic inhibitors on growth processes of sugar beet regenerants under *in vitro* culture N.N. Cherkasova

Summary. *Influence of osmotic inhibitors when storing sugar beet microclones under in vitro culture for a long time without transplanting was studied. Optimal concentrations (5g/l) of mannitol and sorbitol in a nutrient medium leading to growth retardation and maintenance of microclones throughout 4 months of cultivation were revealed. After their further transplanting to standard cultivation conditions, growth resumed during two-three weeks.*

Key words: *plants-regenerants, in vitro, mannitol, sorbitol, nutrient medium, sugar beet, deposition.*