

Литература

1. Современные проблемы и методы биотехнологии [электронный ресурс] / Н.А. Войнов [и др.]: под науч. ред. Т. Г. Волковой. – Красноярск: ИПК СФУ, 2009. – 418 с.
2. Бутенко, Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р.Г. Бутенко. – Москва ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина [и др.]; под общ. ред. Н.В. Загоскиной, Л.В. Назаренко. – М.: Издательство Оникс, 2009. – 496 с.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЕПОНИРОВАНИЯ КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУР ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *ESCHINACEA*

Дитченко Т.И., Кривелева А.Н., Юрин В.М.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

В основе технологии депонирования, либо длительного беспересадочного культивирования растительных объектов *in vitro* лежит создание условий, индуцирующих устойчивое в течение нескольких месяцев (до года) торможение ростовых процессов вплоть до состояния физиологического покоя. При работе с коллекциями культур клеток и тканей растений, в частности, продуцентов фармакологически активных метаболитов, важным этапом является установление эффективных способов депонирования, позволяющих с минимальными затратами сохранять ценный исходный материал в неизменном виде, снизить трудоемкость поддержания пересадочных культур и т.д. С целью увеличения продолжительности беспересадочного культивирования растительных объектов *in vitro* используют несколько методических приемов: снижение температуры культивирования, добавление в питательные среды соединений, способных замедлять рост, создание условий гипоксии. В качестве ингибиторов ростовых процессов применяют осмотические агенты, такие как D-маннит, сорбит, сахара в повышенных концентрациях, или вещества гормональной природы – абсцизовая кислота, гидразид малеиновой кислоты, хлорхолинхлорид (ССС) и др. Для ряда культур показано, что наибольшего эффекта можно достигнуть в результате комбинирования разных приемов лимитирования роста [1]. Однако возможности этой технологии не могут быть реализованы в равной степени для разных растительных объектов. В связи

с этим целью работы явилась сравнительная оценка эффективности разных способов депонирования каллусных культур двух представителей рода *Echinacea* – эхинацеи пурпурной (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) и эхинацеи бледной (*Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.).

Для культивирования каллусных тканей *E. purpurea* и *E. pallida* в работе использовалась питательная среда по прописи Мурасиге и Скуга (МС), содержащая 3% сахарозы и фитогормоны (0,2 мг/л 2,4-Д, 0,5 мг/л кинетина и 1 мг/л ИУК). В контроле поддержание каллусных тканей осуществлялось в условиях термостата при 25 °С в темноте. Для их депонирования использовались приемы, связанные с воздействием осмотического агента D-маннита в концентрации 5%, ингибитора гормональной природы ССС в концентрации 100 мг/л, пониженной температуры (10 °С). Для увеличения продолжительности беспересадочного культивирования осуществлялось как однокомпонентное, так и сочетанное их воздействие. В результате работа включала 5 опытных вариантов инкубации каллусов: 1) в присутствии 5% D-маннита при температуре 25 °С; 2) в присутствии 100 мг/л ССС при 25 °С; 3) при температуре 10 °С; 4) в присутствии 5% D-маннита при 10 °С; 5) в присутствии 100 мг/л ССС при 10 °С. Культивирование каллусных тканей в указанных условиях проводили в течение 95 сут. На 30-е, 65-е и 95-е сут анализировали индекс роста, содержание сухого вещества, дегидрогеназную активность клеток по восстановлению 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида до формазана [2].

Определение индекса роста исследованных культур показало, что наиболее сильное и устойчивое торможение ростовых процессов в течение 95 сут наблюдалось при депонировании в условиях гипотермии, а также при сочетанном действии гипотермии и D-маннита, либо ССС. При однокомпонентном воздействии D-маннита, либо ССС ингибирование прироста биомассы проявлялось в гораздо меньшей степени. В случае использования D-маннита наблюдалось снижение ингибирующего эффекта по мере увеличения продолжительности депонирования. Эффект ССС имел более стойкий характер, однако степень подавления ростовых процессов была минимальной по сравнению с другими вариантами. Длительное культивирование каллусов *E. purpurea* и *E. pallida* на средах с осмотическим агентом сопровождалось существенным возрастанием содержания в них сухого вещества, тогда как ССС не оказывал практически никакого влияния на данный показатель. Возрастание процента сухого вещества отмечалось и в случае культивирования каллусов в условиях гипотермии. Уменьшение степени оводненности каллусных тканей можно рассматривать в качестве одной из причин снижения прироста биомассы культур.

Для разработки эффективных приемов депонирования наряду с подбором условий, приводящих к устойчивому торможению ростовых процессов в течение длительного времени, необходимо проведение периодического контроля за жизнеспособностью и метаболической активностью объектов. О глубине перехода депонированных культур в состояние физиологического покоя в период длительного беспересадочного культивирования можно судить по активности дыхательных ферментов, в частности, дегидрогеназ. Было установлено, что для каллусных культур *E. purpurea* и *E. pallida* уже в контроле происходило снижение способности клеток к образованию формазана при увеличении продолжительности культивирования от 30 до 65 и 95 сут, что свидетельствует об ингибировании интенсивности дыхания по мере старения культур. Однако при депонировании снижение активности дегидрогеназ обусловлено иными причинами, и в первую очередь, замедлением метаболизма. Выявлено, что во всех опытных вариантах, за исключением воздействия ССС, происходило резкое снижение дегидрогеназной активности клеток уже на 30-е сут культивирования.

Поскольку возможности лимитирования роста культивируемых *in vitro* растительных клеток и тканей имеют свои пределы, то эффективность разных режимов депонирования определяется не только глубиной замедления ростовых процессов, но и степенью их восстановления при переходе к стандартным условиям культивирования. При этом наиболее важным моментом является установление продолжительности процесса беспересадочного культивирования, после которого депонированные объекты, в частности, продуценты фармакологически активных соединений, в стандартных условиях восстанавливают не только активность ростовых процессов, но и свой биосинтетический потенциал. В связи с этим в работе проводилось определение индекса роста депонированных каллусных культур и содержания в них вторичных метаболитов фенольной природы после переноса на среду МС и выращивания в течение 30 сут при 25 °С. Установлено, что после 95-ти суточной инкубации в условиях гипотермии отмечалось практически полное восстановление ростовой активности каллусов *E. purpurea* и *E. pallida* при переходе к стандартным параметрам выращивания. Уровни накопления фенольных соединений также не претерпевали достоверных изменений по сравнению с контролем. Полученные результаты позволяют заключить, что для обеих исследованных каллусных культур наиболее оптимальным вариантом депонирования является инкубация в условиях гипотермии. Установленная способность каллусных тканей эхинацеи пурпурной и эхинацеи бледной адаптироваться к длительному воздействию пониженной температуры дает возможность

изменить кинетику их роста и до 3 мес увеличить продолжительность беспересадочного культивирования.

Литература

1. Endress, R. Plant cell biotechnology / R. Endress. – Berlin, Heidelberg; Springer–Verlag, 1994. – 353 p.
2. Еникеев, А. Г. Об использовании 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида для оценки жизнеспособности культур растительных клеток / А. Г. Еникеев, Е. Ф. Высоцкая, Л. А. Леонова // Физиология растений. – 1995. – Т. 42, № 3. – С. 423–426.

РОЛЬ ГЛЮКОЗО-6-ФОСФАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ПОДДЕРЖАНИИ ПУЛА ВОССТАНОВЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА В ЛИСТЬЯХ ЯЧМЕНЯ (*HORDEUM VULGARE*) ПРИ СОВМЕСТНОМ ДЕЙСТВИИ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ИЗБЫТОЧНОГО УВЛАЖНЕНИЯ

Дремук И.А., Шалыго Н.В.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
Минск, Беларусь

Защита растений от окислительного повреждения, индуцированного низкой температурой (НТ) и избыточным увлажнением почвы (ИУ), происходит с участием антиоксидантной системы. Одним из важнейших антиоксидантов является восстановленный глутатион (GSH), выполняющий в клетке ряд функций: поддержание пула восстановленного аскорбата, защита тиольных групп белков, разрушение свободных радикалов и перекисных соединений [1]. Восполнение пула GSH в клетке осуществляется не только за счет синтеза *de novo*, но и за счет активности глутатионредуктазы (ГР), которая восстанавливает окисленный глутатион (GSSG) до GSH в присутствии НАДФН [2]. Основным источником НАДФН в растительной клетке (особенно в ночное время) является пентозофосфатный цикл, ключевым ферментом которого является глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) [3]. Целью данной работы явилось определение роли Г6ФДГ в поддержании пула GSH в листьях ячменя при совместном действии НТ и ИУ.

В качестве объекта исследования использовали листья растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Гонар, выращенных при температуре