

БИОТЕХНОЛОГИЯ В СОХРАНЕНИИ УНИКАЛЬНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ДРЕВЕСНО-КУСТАРНИКОВЫХ НАСАЖДЕНИЙ – ОСНОВА РАЦИОНАЛЬНОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРНОГО НАСЛЕДИЯ

А.В. Зубарев, Н.В. Хотляник, А.В. Губаревич, В.Н. Решетников, Е.В. Спиридович
ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси», Минск, cbg.org.by

На сегодняшний день вопрос выявления, сохранения *ex situ* и документирования уникальных, наиболее устойчивых и адаптированных в местных условиях видов и форм древесно-кустарниковых растений, сохранившихся в старинных парках, является очень актуальным. Сохранившиеся старовозрастные насаждения являются объектами культурного наследия. Они интересны в образовательных целях, например, как элементы экспозиций различной тематической направленности, а также они могут иметь значение в общем образовании населения в сфере биологии, экологии и ландшафтного дизайна.

В ходе работы нами собрана информация о старовозрастных насаждениях, которая позволит систематизировать и обобщить сведения о динамических изменениях жизненного состояния старовозрастных древесных и кустарниковых растений. Эта информация необходима для принятия своевременных хозяйственных и агротехнических мер, направленных на сохранение жизнеспособности растений, на выполнение зелеными насаждениями целевого назначения. [1].

Использование биотехнологических подходов для сохранения биоразнообразия генетических ресурсов растений не только развивается высокими темпами, но и имеет значительный потенциал на будущее. Успешность этих подходов обеспечивается эффективным применением технологий *in vitro* в процессах сбора материала, его оздоровления, введения в культуру и клонального микро-размножения, проведения оценки генетической чистоты полученных регенерантов с помощью ДНК-маркеров, сохранения генетического материала в банках ДНК.

Объекты исследований

Объектами нашего исследования являлись древесно-кустарниковые виды и культивары (многие из которых являются интродуцентами) сохранившиеся в старинных парках северо-западного региона РБ, наиболее устойчивые и адаптированные к местным условиям.

Результаты и обсуждение

В 2020-2023 гг. были обследованы 15 старинных парков на территории северо-западного региона Беларуси с сохранившимися уникальными насаждениями из декоративных древесно-кустарниковых видов и форм; изучено их состояние, определена их значимость в культурном наследии страны, разработаны рекомендации по использованию. Наибольший интерес представляло наличие в насаждениях интродуцентов для сохранения в культуре *in vitro* и сохранения образцов в ДНК банке.

При выполнении работы по введению в асептическую культуру биологических образцов использовались разработанные в 2020 г. в отделе биохимии и биотехнологии ЦБС НАН Беларуси лабораторные регламенты производства микросаженцев старовозрастных древесных и кустарниковых растений.

Получена асептическая культура уникальных старовозрастных древесных пород 3-х видов: тополь черный (*Populus nigra 'Italica'*), катальпа бигнониевидная (*Catalpa bignonioides* Walter) и шелковица чёрная (*Morus nigra* L.). Основные этапы получения асептических культур включали оптимизацию процесса введения в культуру *in vitro*, подбор состава питательных сред для инициации и стабилизации роста регенерантов. Ключевыми факторами, которые повлияли на получение, устойчивый рост и размножение асептической культуры, стали схема стерилизации эксплантов при введении в культуру и состав питательной среды культивирования.

Тополь черный колоновидный. Это высокое, быстрорастущее, лиственное дерево с узкой колоновидной формой кроны нередко привлекало к себе внимание в прошлые века при подборе растений для парковых насаждений [2] (рисунок 1). В качестве первичных эксплантов использовали зимнюю выгонку – зеленые побеги, образовавшиеся в условиях лаборатории из почек на срезанных одревесневших ветках. Вначале эксплантаты промывали водой с жидким мылом (2,0 мл/л, 10 мин.). Затем в условиях стерильного ламинар-бокса обрабатывали фунгицидом широкого спектра действия «Прозаро» (действующие вещества: протиоконазол и требуконазол) – 0,1%-ный р-р, 15 мин, после чего дважды промывали стерильной дистиллированной водой. Далее экспланты помещали в 0,1% раствор $AgNO_3$ на 5 минут, с последующей двукратной отмывкой в стерильной ди-

стиллированной воде. Обработанные стерилизующими агентами эксплантаты поместили в культуральные сосуды, содержащие среду MS с добавлением 0,5 БАП и 15 г/л сахарозы.

Результаты введения оценивали на 7-ой и 14-ый дни культивирования. Данные по инициации и контаминации приведены в таблице 3.1.

Таблица 1. – Степень контаминации и инициации у эксплантов тополя черного при введении в культуру *in vitro*.

Срок культивирования	Контаминация, %	Инициация, %
7-ой день	10,0	20,0
14-й день	30,0	40,0

После 7 дней культивирования инициация наблюдалась у 20,0% эксплантов, а на 14-ый – уже у 40,0%. Остальные экспланты утратили свою жизнеспособность от действия стерилизующих агентов (некротизация тканей), либо под влиянием развившейся грибной инфекции.

В течение последующих семи месяцев в результате ряда пассажей была получена стабильно пролиферирующая культура на питательной среде Мурашига и Скуга (MS) [2], содержащей БАП 0,5мг/л, ИУК 0,2мг/л, сахарозу 15,0 г/л и условиях культивирования – 16/8 часовой светопериод при 24°C (рисунок 1 и 2). Период культивирования в пассаже 8-10 недель. Полученные микросаженцы довольно неприхотливы при адаптации. В результате в возрасте 1,5 года посадочный материал в среднем достигает 80 см высоты (рисунок 3).



Рисунок 1. – Тополь черный колоновидный в старовозрастных насаждениях

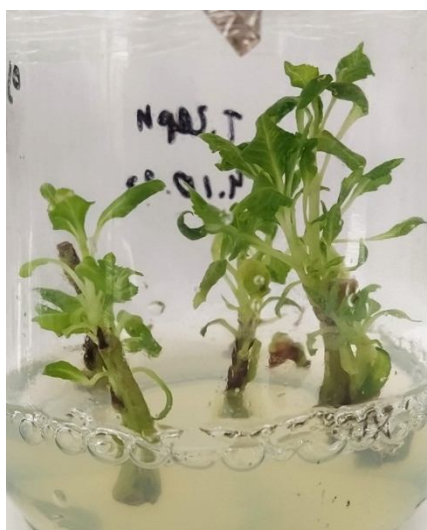


Рисунок 2. – Регенеранты второго пассажа (тополь черный)



Рисунок 3. – Саженцы микроклонально размноженного тополя черного колоновидного (возраст 1,5 года)

Катальпа бигнониевидная – очень необычное для белорусской флоры, декоративное и довольно редкое среди возрастных насаждений дерево высотой до 10 м, раскидистой кроной и восхитительными цветами (рисунок 4).

Для получения асептической культуры использовали выгонку из одревесневших побегов срезаемых в третьей декаде марта. Срезанные побеги содержали в сосуде с водопроводной водой покрытыми пакетом из прозрачного полиэтилена (при комнатной температуре). Каждые три дня проводились обновление срезов и смена воды. Через две недели из почек образовались зеленые побеги содержащие 2-3 узла. Полученные экспланты отмывали на магнитной мешалке в 2% растворе хозяйственного мыла (10 минут). Далее отмывали дважды по 5 минут в дистиллированной воде и переносили в стерильные условия ламинар-бокса. Экспланты помещали сначала на 10 минут в 0,1% раствор фунгицида «Прозаро». После чего отмывали дважды по 5 минут в стерильной дистиллированной воде. Следующий этап – стерилизация в 0,1% растворе нитрата серебра в течение 3 минут. Отмывку проводили дважды по 5 минут в стерильной дистиллированной воде. Стерильные экспланты помещали на модифицированные питательные среды на основе среды Мурашига и Скуга MS [3] и Woody Plant Medium [4] с различными концентрациями гормонов и сахаро-

зы (контроль – безгормональная среда MS). Условия культивирования: температура 25°C, освещенность 3000 лк, фотопериод 16 часов.

В результате экспериментов выявлено, что при введении оптимальной средой для катальпы бигнониевидной является среда MS с добавлением 1 мг/л зеатина и 10 г/л сахарозы. На этой среде наблюдается наибольшая высота регенерантов. На среде MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП и 15 г/л сахарозы наблюдался развитие корней. Наилучшее развитие корневой системы у микрочеренков наблюдалось на среде WPM без гормонов с добавлением 15 г/л сахарозы.

Для дальнейшего клонального микроразмножения катальпы бигнониевидной оптимальной средой по всем показателям оказалась среда MS с добавлением 0,5 мг/л 6-БАП и концентрацией сахарозы 15 г/л (рисунок 5). Длительность пассажа – 8-10 недель.



Рисунок 4. – Катальпа бигнониевидная в городских насаждениях 1920-х годов в г. Барановичи



Рисунок 5. – Регенеранты катальпы бигнониевидной (2-ой пассаж)

Шелкови́ца чёрная – листопадное дерево высотой 10-13 м. Шелковица чёрная происходит из Юго-Западной Азии (Иран, Афганистан, Таджикистан, Узбекистан, Кавказ). Культивировалась иногда в старых усадьбах в качестве плодового дерева.

Для получения асептической культуры *Morus nigra* L. было решено использовать свежесобранные семена из спелых плодов. Материал для введения был взят в первой декаде июля. Предварительно проверенная всхожесть семян в лабораторных условиях на фильтровальной бумаге в чашках Петри оказалась близкой к 100%.

Семена были помещены в мешочки из нейлоновой ленты и подвергнуты предварительному замачиванию в течение 24 часов в дистиллированной воде. После этого мешочки с семенами обработали хозяйственным мылом и промыли в струе водопроводной воды. Далее следовала обработка стерилизующими агентами в условиях стерильного ламинар-бокса.

При введении были испытаны две схемы стерилизации:

1-ая – Спирт этиловый (78%) – 2 минуты → р-р NaClO (3%) – 10 минут;

2-ая – Фунгицид прозаро (0,1%) – 10 минут → р-р AgNO₃ (0,1%) – 5 минут.

После обработки каждым из стерилизующих агентов следовало двукратное ополаскивание в стерильной дистиллированной воде.

Затем семена разложили на поверхности агаризованной питательной среды. Были испытаны четыре варианта питательных сред:

1. Мурасига-Скуга (МС), 0,5мг/л 6-БАП, сахароза 15 г/л;

2. МС 0,5 мг/л 6-БАП, сахароза 30 г/л;

3. МС 1,0 мг/л 6-БАП, сахароза 15 г/л;

4. МС 1,0 мг/л 6-БАП, сахароза 30 г/л.

В течение последующих десяти дней наблюдали за культурой с целью своевременного выявления проявившихся инфекций. Сравнить эффективность испытанных схем стерилизации можно по показателю степени контаминации приведенному в таблице 2.

Таблица 2. – Степень контаминации при ведении шелковицы черной на 10-ый день культивирования

Тип стерилизации	Контаминация, %		
	грибная	бактериальная	общая
Фунгицид → AgNO ₃	0	3,6	3,6
Спирт → Гипрохлорит Na	0	0	0

На десятый день культивирования оценили всхожесть семян. Во всех вариантах опыта она была примерно одинакова – около 70%.

На 30-ый день культивирования оценили ростовые параметры проростков. Проростки в вариантах с 1,0 мг/л БАП развивались активнее, у них в большинстве наблюдалось развитие второй пары настоящих листьев и более развитая корневая система.

Во всех вариантах опыта наблюдалась тенденция зависимости степени развития корневой системы у проростков от способа стерилизации семян при введении. Таким образом стало очевидно, что обработка по схеме «этанол → гипохлорит натрия» подавляет развитие корней у проростков (рисунок 6).

Заключение. Сохранение биоразнообразия растений разного целевого назначения, в настоящее время входит в число приоритетных задач большинства государств, эти генетические ресурсы приравниваются к национальному достоянию. Биотехнологические коллекции являются одним из наиболее перспективных способов сохранения растительного генофонда, прежде всего, хозяйственно-ценных редких природных и интродуцированных видов растений, их рационального использования в различных сферах деятельности: озеленении территорий; демонстрации социального и культурного наследия и современного значения видов, сосредоточенных в парках и/или усадебных комплексах.



Рисунок 6 – Развитие корневой системы у проростков шелковицы чёрной на 30 день культивирования после стерилизации в варианте культивирования на питательной среде с 1,0 мг/л 6-БАП и 30 г/л сахарозы (слева – вариант «фунгицид → AgNO₃», справа – «этанол → NaClO»).

Полученные культуры служат основой клонального микроразмножения для быстрого получения вегетативным путем посадочного материала растений, идентичных исходному. Стратегия, разработанная для 6 видов древесных и кустарниковых пород, повышает эффективность размножения устойчивых клонов, способствует долгосрочному сохранению элитных генотипов, а также обеспечит биотехнологический подход к улучшению сохранения других видов старовозрастных деревьев и кустарников.

Работа проводилась в рамках задания «Разработать методы сохранения и размножения уникальных видов и форм старовозрастных древесно-кустарниковых насаждений северо-западного региона Беларуси, создать геоинформационную систему (ГИС) для документирования ботанических объектов» подпрограммы «Интродукция растений» отраслевой научно-технической программы «Интродукция и инвазии» на 2021-2025 гг.

Список использованных источников

1. Дружинин Ф.Н., Макаров Ю.И., Корякина Д.М. Паспортизация как средство мониторинга ценных древесных и кустарниковых растений // Лесн.журн. 2018. № 5. С. 94–104. (Изв. высш. учеб. заведений). DOI:10.17238/issn0536-1036.2018.5.94.
2. Чаховский, А.А. Опыт интродукции рода *Populus*L. в Белоруссию / А.А. Чаховский, Е.И. Орленок, Е.З. Бобореко // Интродукция растений : сб. статей / отв. ред. Н.В. Смольский. – Минск : Наука и техника, 1976. – С. 106–122.
3. Murashige, T. Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture// *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. 473-497 p.
4. McCown, B.H. and Lloyd, G. (1981) Woody Plant Medium (WPM)—A Mineral Nutrient Formulation for Microculture of Woody Plant Species. *HortScience*, 16, 453-453.