

**РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ДЛИТЕЛЬНОГО ДЕПОНИРОВАНИЯ КОЛЛЕКЦИИ  
ОЗДОРОВЛЕННЫХ КЛОНОВ ФЛОКСА МЕТЕЛЬЧАТОГО (*PHLOX PANICULATA L.*)**

*I.S. Kovaleva, A.E. Matsneva, O.E. Khanbabaeva,  
A.S. Mazaeva, V.N. Sorokopudov*

**THE DEVELOPMENT OF OPTIMAL CONDITIONS OF LONG-TERM DEPOSITION OF IMPROVED  
CLONES OF A *PHLOX PANICULATA L.* COLLECTION**

**Ковалева И.С.** – ст. науч. сотр. лаб. клонального микроразмножения садовых растений Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва.

E-mail: irino4ka\_koval@mail.ru

**Мацнева А.Е.** – мл. науч. сотр. лаб. клонального микроразмножения садовых растений Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва.

E-mail: macnusha@mail.ru

**Ханбабаева О.Е.** – канд. с.-х. наук, доц. каф. ландшафтной архитектуры Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва.

E-mail: hanbabaeva@yandex.ru

**Мазаева А.С.** – асп. каф. плодоводства и виноградарства Российского государственного аграрного университета – МСХА им. К.А. Тимирязева, г. Москва.

E-mail: maeva91@mail.ru

**Сорокопудов В.Н.** – д-р с.-х. наук, проф., зав. Центром генетики, селекции и интродукции садовых культур Всероссийского селекционно-технологического института садоводства и питомниководства, г. Москва.

E-mail: sorokopud2301@mail.ru

**Kovaleva I.S.** – Senior Staff Scientist, Lab. of Clone Microreproduction of Garden Plants, Russian State Agrarian University – MAA named after K.A. Timiryazev, Moscow.

E-mail: irino4ka\_koval@mail.ru

**Matsneva A.E.** – Junior Staff Scientist, Lab. of Clone Microreproduction of Garden Plants, Russian State Agrarian University – MAA named after K.A. Timiryazev, Moscow.

E-mail: macnusha@mail.ru

**Khanbabayeva O.E.** – Cand Agr. Sci., Assoc. Prof., Chair of Landscape Architecture, Russian State Agrarian University – MAA named after K.A. Timiryazev, Moscow.

E-mail: hanbabaeva@yandex.ru

**Matsneva A.E.** – Junior Staff Scientist, Lab. of Clone Microreproduction of Garden Plants, Russian State Agrarian University – MAA named after K.A. Timiryazev, Moscow.

E-mail: macnusha@mail.ru

**Sorokopudov V.N.** – Dr. Agr. Sci, Prof., Head, Center of Genetics, Selection and Introduction of Garden Cultures, All-Russia Selection Institute of Technology of Gardening and Nursery, Moscow.

E-mail: sorokopud2301@mail.ru

Цель исследования – оптимизировать условия для длительного депонирования флокса метельчатого (*Phlox paniculata L.*). Опыты проводили в Лаборатории клонального микроразмножения садовых растений, Лаборатории плодоводства Российского государственного аграрного университета – Московской сельскохозяйственной академии имени К.А. Тимирязева в 2016–2018 гг. Объектами исследования были выбраны два сорта флокса метельчатого: сорт Иоганн Себастьян Бах селекции Ю.А. Репрева (1987 г.) и сорт Успех селекции П.Г. Гаганова (1937 г.). В результате работы предложена беспересадочная технология де-

понирования флокса метельчатого, при котором за 12 месяцев депонирования жизнеспособность растений сохраняется на уровне 90–95 %. Учеты и наблюдения, статистическая обработка данных проводилась с применением двухфакторного дисперсионного анализа. Были изучены условия длительного депонирования коллекции микрорастений флокса метельчатого в банке оздоровленных клонов, представлены результаты эксперимента по влиянию концентрации коричной кислоты и мантина на сохранение микрорастений *in vitro* флокса метельчатого. Одним из самых распространенных сахароспиртов является ман-

нит, в функции которых входит запасание органического углерода, защита от окислительного стресса и регуляция фотосинтетических процессов, также известно, что маннит накапливается в тканях растений в качестве запасного питательного вещества. Было выявлено, что для длительного депонирования коллекции микрорастений флокса метельчатого в банке оздоровленных клонов в течение 12 месяцев эффективно использовать питательную среду с солями по прописи МС (Мурасиге – Скуга), с добавлением препарата маннит в концентрации 15 мг/л и хранении при температуре +4...+6°C и освещенности 400–600 Лк.

**Ключевые слова:** длительное депонирование, хранение, флокс метельчатый, микроразмножение, *in vitro*, коричная кислота, маннит.

The research objective was to optimize conditions for long deposition of *Phlox paniculata* L. The experiments were made in the Laboratory of Clonal Micropropagation of Garden Plants, by Laboratories of fruit growing of Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev in 2016–2018. Two varieties of *Phlox paniculata* L.: the variety Johann Sebastian Bach of the selection of Yu.A. Reprev (1987) and the variety Uspekh of the selection of P.G. Gaganov (1937) were chosen as the object of the study. As a result of the research, a non-stop technology of storage of *Phlox paniculata* L. was proposed, in which the viability of plants remained at the level of 90–95 % for 12 months of storage. Accounting and observation, statistical data processing were carried out using two-factor analysis of variance. The conditions for long-term storage of the collection plants of *Phlox paniculata* L. in a bank of healthy clones, and presented the results of an experiment on the effect of the concentration of cinnamic acid and mannitol on the preservation of *in vitro* plants of *Phlox paniculata* were examined. Mannitol is one of the most common sugar alcohols, whose functions include storage organic carbon, protecting against oxidative stress and regulating photosynthetic processes, it is also known that mannitol is accumulated in tissues of plants as spare nutrient. It was found out that for a long-term depositing of a collection of plants *Phlox paniculata* L. in a bank of healthy clones for 12 months, it is effective to use a nutrient medium with salts ac-

ording to MS (Murasige – Skuga) prescription with the addition of the drug mannitol at the concentration of 15 mg / l and stored at + 4 ... + 6 °C and light – 400–600 Lux.

**Keywords:** long deposition, storage, *Phlox paniculata* L., microreproduction, *in vitro*, cinnamic acid, mannitol.

**Введение.** В последнее время для создания и хранения коллекций растительных объектов все шире привлекаются методы биотехнологии. В основу этих методов положена возможность поддержания жизнеспособности «пробирочных растений» или их отдельных органов в течение длительного времени. Преимущество данного способа состоит в том, что он позволяет значительно снизить затраты на оздоровление вегетативно размножаемых растений, обеспечить сохранность их ценных форм, сортов и видов, для создания коллекции не нужно большого количества посадочного материала, площади, кроме того, она не подвержена действию биотических и абиотических факторов [3, 4].

Хранение растительного материала *in vitro* возможно тремя способами:

- 1) хранение в условиях нормального роста;
- 2) депонирование, или хранение в условиях замедленного роста;
- 3) криосохранение.

Возможность неограниченно долгого хранения растительных объектов может обеспечить криосохранение, так как клеточные деления при этом полностью исключены. Однако этот прием требует наличия криогенного оборудования, регулярной поставки жидкого азота и хорошо отработанной технологии криоконсервации, обеспечивающей гарантированное возобновление культуры из каждого сохраняемого образца. Поэтому пока применение этого способа все же ограничено [1, 2].

Хранение в условиях нормального роста требует регулярной пересадки на свежие питательные среды, обеспечение стабильных условий культивирования (температура, влажность, освещенность, состав питательной среды), что делает этот метод дорогим и трудоемким.

При хранении флокса метельчатого используют низкие положительные температуры (2–5 °C).

Коричная кислота является одним из основных фенолпропаноидов с антиоксидантной ак-

тивностью, вырабатываемых растениями в ответ на стрессовые условия. Также в питательную среду для минимализации ростовых процессов добавляют осмотически активные вещества, такие как сахароподобные спирты, например маннит [5]. Клетки и культуры тканей обычно хранятся в хорошо освещенном помещении при температуре 25 °С. Однако это требует периодического переноса растений на свежие питательные среды. Данная процедура сопряжена с опасностями загрязнения, а иногда и с потерей всего материала. Кроме того, в результате длительного хранения может возникнуть генетическая нестабильность (неоднородность). В результате длительного хранения растения могут потерять способность к размножению. Чтобы преодолеть эти проблемы, разрабатываются и совершенствуются методы *in vitro* как для краткосрочного, так и долгосрочного хранения [6].

**Цель исследования:** оптимизировать условия для длительного депонирования флокса метельчатого.

**Условия, материалы и методы исследования.** Исследования проводили в 2016–2018 гг. на базе лаборатории плодоводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Объектами изучения были 2 сорта флокса метельчатого: Иоганн Себастьян Бах и Успех.

Питательная среда для длительного хранения содержала: макро- и микросоли по МС (Мурасиге-Скуга), витамины В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, РР – по 0,5 мг/л, 6-БАП – 1 мг/л, сахароза – 12000 мг/л, агар – 7000 мг/л. В качестве антиоксидантов добавляли:

1) без гормонов и регуляторов роста (контроль)

2) коричную кислоту (С<sub>6</sub>Н<sub>5</sub>СН) в концентрациях 0,5 и 1 мг/л;

3) маннит в концентрациях 15, 40, 60 мг/л.

Микрочеренкование производили в стеклянные культуральные сосуды объемом 250 мл. Повторность опыта трехкратная, по 7 сосудов. В каждом культуральном соседе по 7 растений. Сосуды закрывали полипропиленовой пленкой с микроперфорацией (БОПП) и обматывали стрейчпленкой для снижения конденсата и регулирования газообмена.

После пересадки растения содержали в световой комнате в течение 2 недель. Далее растения переносили в холодильную камеру. Условия холодной световой камеры были одинаковыми для всех изученных вариантов и сортов: температура +4... +6 °С, освещенность – 0,4–0,6 клк.

При проведении опыта растения не пересаживали на свежие питательные среды. Учет производили каждые 3 недели. Непрерывное хранение продолжали в течение 12 месяцев.

Оценку состояния растений проводили через 12 месяцев с момента высадки на питательную среду.

Показатель жизнеспособности растений измеряли в баллах по количеству некрозов тканей листьев и побегов:

– 0 баллов – визуальная гибель растения, все ткани растения потеряли зеленую окраску;

– 1 балл – некроз более 50 % тканей растения;

– 2 балла – некроз менее 50 % тканей;

– 3 балла – растение без некрозов.

Учеты и наблюдения, статистическая обработка данных – с применением дисперсионного анализа.

**Результаты исследования и их обсуждение.** Проведена сравнительная оценка всех изучаемых для депонирования препаратов.

При хранении в течение 12 месяцев отмечена высокая сохранность растений (сорт Успех – 2,7 баллов, сорт И.С. Бах – 2,85 баллов) при добавлении в питательную среду маннита в концентрации 15 мг/л (рис. 1).

При добавлении в среду маннита в концентрации 15 мг/л состояние сортов Успех и И.С. Бах оценивалось в 2,70 и 2,85 баллов соответственно (рис. 2).

Дальнейшие наблюдения показали, что при внесении в питательную среду маннита в повышенных концентрациях 40 и 60 мг/л на начальном этапе культивирования четко проявляется снижение интенсивности ростовых процессов, которое выражается, в первую очередь, в замедлении роста растений.

Однако при депонировании в течение 12 месяцев в этих вариантах не наблюдали рост микрорастений и значительную некротизацию тканей (0,25–0,55 баллов) (рис. 1).

В вариантах с добавлением в питательную среду коричной кислоты в концентрациях 0,5 и 1 мг/л, несмотря на высокую сохранность микрорастений, в течение следующих 12 месяцев наблюдали утончение, вытяжение и витрификацию побегов.

Статистическая обработка данных показала, что самое большое влияние на длительность хранения флокса метельчатого оказал фактор «концентрация вещества» – 81 %, при этом случайный фактор составил 19 % (рис. 3).



Рис. 1. Микрорастения флокса метельчатого после 12 месяцев хранения на среде, содержащей маннит в концентрации 15 мг/л

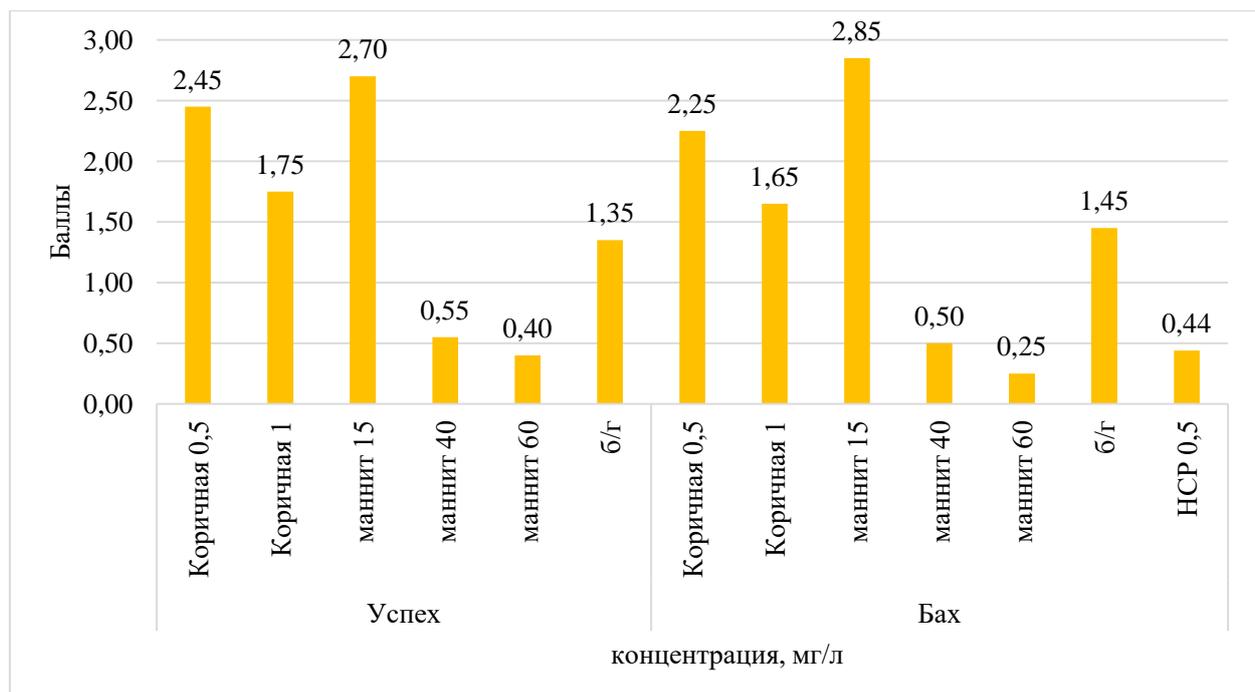


Рис. 2. Оценка состояния микрорастений флокса метельчатого в зависимости от концентрации регуляторов роста через 12 месяцев хранения (НСР<sub>0,5</sub> = 0,44)

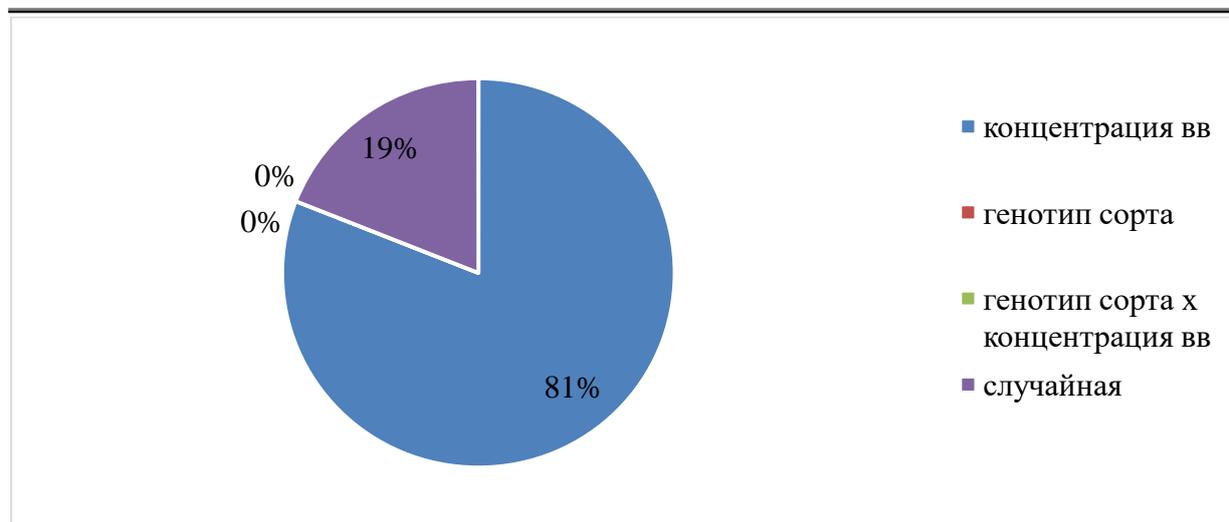


Рис. 3. Доли влияния фактора «концентрация вещества»

**Выводы.** Таким образом, изучив влияние коричной кислоты и маннита, а также их концентраций, на сохранность растений *in vitro* флокса метельчатого были предложены условия продолжительного хранения сортов флокса метельчатого: до 12 месяцев и более без пересадок за счет использования питательной среды МС, модифицированной маннитом в концентрации 15 мг/л для хранения при условиях низкой положительной температуры +4... +6 °С и освещенности 400–600 Лк.

#### Литература

1. *Высоцкий В.А.* Роль биотехнологических методов в интродукции, размножении, селекции и сохранении генофонда редких и нетрадиционных растений // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования. – 2015. – № 11. – С. 27–29.
2. *Высоцкий В.А.* Совершенствование методов сохранения ценных генотипов плодовых и ягодных культур *in vitro* // Плодоводство и ягодоводство России. – 2015. – № 41. – С. 69–73.
3. *Деменко В.И.* Микроклональное размножение садовых растений: учеб. пособие / РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева. – М., 2007. – 56 с.
4. *Катаева Н.В., Бутенко Р.Г.* Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – С. 41–43.
5. *Тараховская Е.Р., Маслов Ю.И.* Специфика усвоения маннита у *Fucus vesiculosus* L. и

6. *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis (*Phaeophyta*) // Вестн. Санкт-Петербургского университета. – 2010. – № 2. – С. 75–81.
6. *Bajaj Y.P.S.* High-Tech and Micropropagation // 1986. – С. 56–148.

#### Literatura

1. *Vysockij V.A.* Rol' biotehnologicheskikh metodov v introdukcii, razmnozhenii, selekcii i sohranении genofonda redkih i netradicionnyh rastenij // Novye i netradicionnye rastenija i perspektivy ih ispol'zovanija. – 2015. – № 11. – S. 27–29.
2. *Vysockij V.A.* Sovershenstvovanie metodov sohraneniya cennyh genotipov plodovyh i jagodnyh kul'tur in vitro // Plodovodstvo i jagodovodstvo Rossii. – 2015. – № 41. – S. 69–73.
3. *Demenko V.I.* Mikroklonal'noe razmnozhenie sadovyh rastenij: ucheb. posobie / RGAU – MSHA im. K.A. Timirjazeva. – M., 2007. – 56 s.
4. *Kataeva N.V., Butenko R.G.* Klonal'noe mikrorazmnozhenie rastenij. – M.: Nauka, 1983. – S. 41–43.
5. *Tarahovskaja E.R., Maslov Ju.I.* Specifika usvoeniya mannita u *Fucus vesiculosus* L. i *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis (*Phaeophyta*) // Vestn. Sankt-Peterburgskogo universiteta. – 2010. – № 2. – S. 75–81.
6. *Bajaj Y.P.S.* High-Tech and Micropropagation // 1986. – S. 56–148.