

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

**ОСОБЕННОСТЬ ВВЕДЕНИЯ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO*
НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА РОЗОЦВЕТНЫХ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы
Направления 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Потехиной Анастасии Витальевны

Научный руководитель
доцент кафедры генетики,
к.б.н.

9.06.2017  Т.А.Алаторцева

Научный консультант
ведущий биолог
УНЦ «Ботанический сад СГУ»,
г. Саратов

9.06.2017  С.Н.Тимофеева

Зав.кафедрой генетики,
д.б.н., профессор

9.06.2017  О.И.Юдакова

Саратов 2017

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время усилиями отечественных и зарубежных селекционеров созданы многочисленные крупноплодные сорта малины, ежевики и малиново-ежевичных гибридов, обладающих высокими вкусовыми качествами, урожайностью, зимостойкостью, разными сроками созревания. Среди них особенно востребованными являются ремонтантные формы.

Восполнить недостаток здоровых саженцев позволяет клональное микроразмножение *in vitro* [Сковородников Д.Н., 2015, Вовк В.В., 2000]. Благодаря высокому коэффициенту размножения, в десятки раз превышающему традиционные способы черенкованием и корневыми отпрысками и возможности оздоровления растений от патогенных микроорганизмов, метод становится очень популярным и перспективным [Д.Г. Шорников, 2010]. Особенно это касается штамбовых сортов и гибридов малины, трудно размножаемых в естественных условиях, так как образуют мало побегов замещения.

Несмотря на то, что существует много эффективных протоколов микроразмножения, по-прежнему в каждом конкретном случае требуется разработка или оптимизация всех этапов культивирования под каждый конкретный генотип.

В связи этим исследование, посвященное изучению особенностей введения в культуру представителей рода *Rubus* семейства розоцветных, является актуальным и практически значимым.

Цель настоящей работы:

Подобрать условия для введения в культуру *in vitro* садовой малины (сорт Желтый гигант) и ежевики (сорт Торнфри).

В задачи эксперимента входило:

1. Отработать способ стерилизации эксплантов малины и ежевики (подобрать дезинфицирующее средство и длительность его воздействия).
2. Определить характер инфицирования эксплантов на начальных этапах культивирования.
3. Выявить оптимальный тип первичного экспланта для введения в культуру *in vitro*.
4. Изучить морфогенетическую реакцию эксплантов при введении их в условия экзогенного питания.
5. Определить оптимальный состав питательной среды, необходимый на разных этапах микроразмножения.

Характеристика материалов и методов:

Материал исследования:

Объектами исследования являлись:

1. Сорт желтой садовой малины Желтый гигант (рисунок 1.) Выведен профессором В.В.Кичиной (патент №1859) во Всероссийском селекционно-технологическом институте садоводства и питомниководства путем скрещивания сортов Маросейки (шотландский гибрид) и Ивановская. Является одним из лучших десертных сортов желтой малины. По срокам созревания - среднеранний сорт, приближающийся к ремонтантным сортам. [39].

2. Сорт ежевики Торнфри (*Thornfree*). Выведен в 1966 году доктором Скоттом, селекционером штата Мэриленд в восточной части США. Характеризуется полным отсутствием шипов, поздним сроком созревания плодов высокой урожайностью (20 кг с растения), один из лучших коммерческих сортов (рисунок 2).

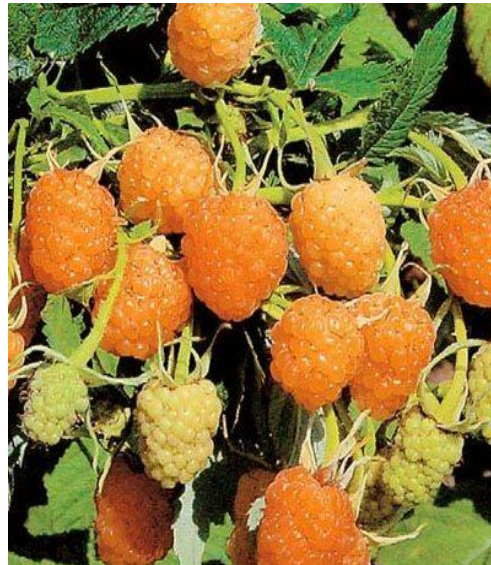
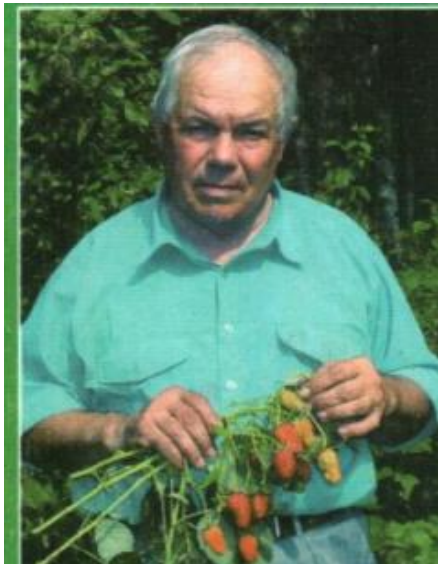


Рисунок 1- Малина сорта Желтый гигант: *а* – В.В.Кичин, создатель сорта малины Желтый гигант, *б* – плоды малины сорта Желтый гигант (<http://www.udec.ru/images/02309-06.jpg>).



Рисунок 2 – Плоды ежевики сорта Торнфри (<http://asprus.ru/blog/wp-content/gallery/p31827/4.jpg?6c2e35>).

Методы исследования:

Растения малины и ежевики выращивали в открытом грунте. В конце осени (октябре-ноябре) побеги с вызревшими почками срезали с растений и хранили в сосудах с небольшим количеством воды в холодильнике при температуре +3°C. Для подготовки эксплантов к культивированию побеги с набухшими почками, как показано на рисунке 3, с помощью ёршика и

хозяйственного мыла, очищали от загрязнений, затем промывали проточной водой.

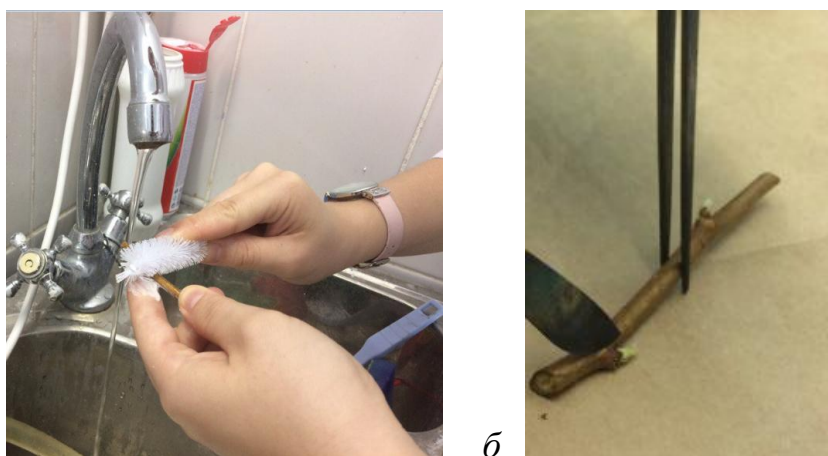


Рисунок 3 – Подготовка побегов малины к изоляции почек: *а* – очистка мыльным раствором с помощью ёршика, *б* – побег с почками, предназначенными для эксплантации.

Фрагменты побегов обрабатывали последовательно:

70%-ным этанолом - 30 секунд;

одним из дезинфицирующих средств:

раствором «Белизны» (содержание гипохлорита натрия 22%, в разведении 1:1; 1:2; 1:5) – 20 минут,

перекисью водорода (3%) – 20 минут,

раствором (30 мг/л) натриевой соли этилмеркуртисалициловой кислоты – 7 минут.

По окончании времени стерилизации объекты промывали тремя порциями стерильной дистиллированной воды.

В условиях ламинар-бокса почки срезали со стебля, промокали стерильной фильтровальной бумагой, очищали от покровных чешуй. Готовые к эксплантации почки помещали в чашки Петри на поверхность питательной среды.

Культивирование проводили при температуре $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ и 16-часовом фотопериоде.

Питательные среды включали: макро- и микроэлементы по Мурасиге и Скугу, тиамин – 0,5 мг/л; пиридоксин – 0,5 мг/л; никотиновую кислоту – 1,0

мг/л; аскорбиновую кислоту – 1,0 мг/л; глицин – 1 мг/л, мезоинозит – 70 мг/л. В зависимости от цели культивирования : сахарозу –10 или 20 мг/л, а также агар-агар – 7000 мг/л и разные варианты концентраций цитокинина 6-БАП и ауксинов ИМК и НУК (таблица 1).

Таблица 1 – Состав питательных сред, используемых для клонального микроразмножения малины и ежевики.

Этап клонального микроразмножения	Минеральные соли	Индукторы морфогенеза, мг/л
Инициация стерильной культуры	MS	6-БАП – 0,5; 1,0; 2,0
Размножение	½ MS	6-БАП – 1,0; 2,0
Укоренение	¼ MS	ИМК – 0,5; НУК – 0,5 Контроль без гормонов

Перед автоклавированием рН среды доводили NaOH до 5,8 – 6,1.

Анализ культивируемых объектов осуществляли с использованием микроскопа МБС-9 и Stemi 2000 – С. Микрофотосъёмку проводили с помощью фотокамеры Canon PC 1200 и компьютерного программного обеспечения Canon Utilities ZoomBrowser EX 5.7 (рисунок 4).

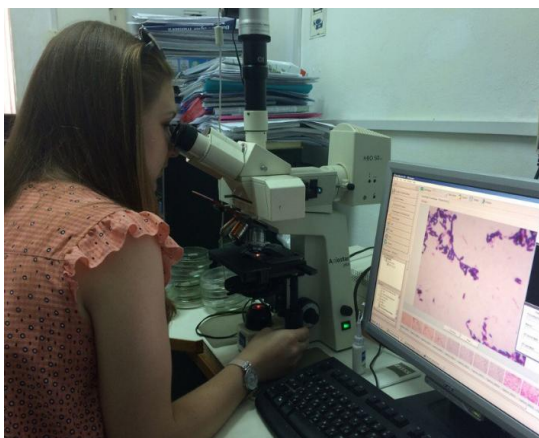


Рисунок 4 – Процесс анализа и фотосъёмки микробиологических препаратов.

Достоверность полученных результатов оценивалась по критерию Стьюдента, применительно к альтернативному распределению для качественных показателей [Зайцев Г.Н., 1990].

В процессе биометрической обработки определялись следующие параметры:

m_M - ошибка средней арифметической;

$m_M = \sqrt{pq/N}$, где p —доля эксплантов с признаком конкретного типа;

q —доля эксплантов, не имеющих этого признака;

N —объем выборки.

2) границы достоверности, вычислялись по формуле $p = \pm t m_M$, где t - критерий Стьюдента с числом степеней свободы $\nu = N-1$ и доверительном уровне 95%.

Структура и объем работы: работа изложена в 42 листах машинописного текста и включает в себя введение 3 главы с таблицами, рисунками, заключение и выводы. Список использованных источников содержит 40 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение в культуру *in vitro* любых растительных эксплантов представляет собой исследовательскую работу, включающую несколько обязательных этапов, без которых невозможно обеспечить в дальнейшем массовое воспроизводство здорового посадочного материала. К их числу относятся: получение стерильной исходной культуры, создание условий для успешной пролиферации тканей экспланта и регенерации микрорастений.

3.1 Стерилизация эксплантов

Первая стадия нашего исследования состояла в отработке метода дезинфекции растительного материала, предназначенного для культивирования в стерильных условиях *in vitro*. Работа включала выбор стерилизующих средств соответствующей концентрации и времени экспозиции. Для нашего эксперимента мы использовали дезинфицирующие растворы, обычно рекомендуемые для подобных работ [Егорова Т. А. , 2003].

На данном этапе эксперимента важно выбрать условия стерилизации, обеспечивающие минимальный вред для развития экспланта.

Было испытаны: средство «Белизна», содержащее 22,0% гипохлорита натрия (разведение 1:1; 1:2; 1:5); водный раствор натриевой соли этилмеркуртиосалициловой кислоты (Na- ЭМТСК) – 30мг/л; раствор перекиси водорода (3,0 %). Как указывалось выше, в разделе 2.2 настоящей работы, во всех случаях обработке названными средствами предшествовало ополаскивание растительного материала 70% этиловым спиртом.

При сравнительном анализе было выявлено, что максимальное количество инфицированных эксплантов обнаруживалось при использовании Na- ЭМТСК) – 30мг/л и минимальное количество – в случае «Белизны» (в разведении 1:1 и 1:2).

Проведенное микробиологическое исследование показало заражение изолированных почек малины и ежевики грибковыми и бактериальными культурами (рисунок 5).

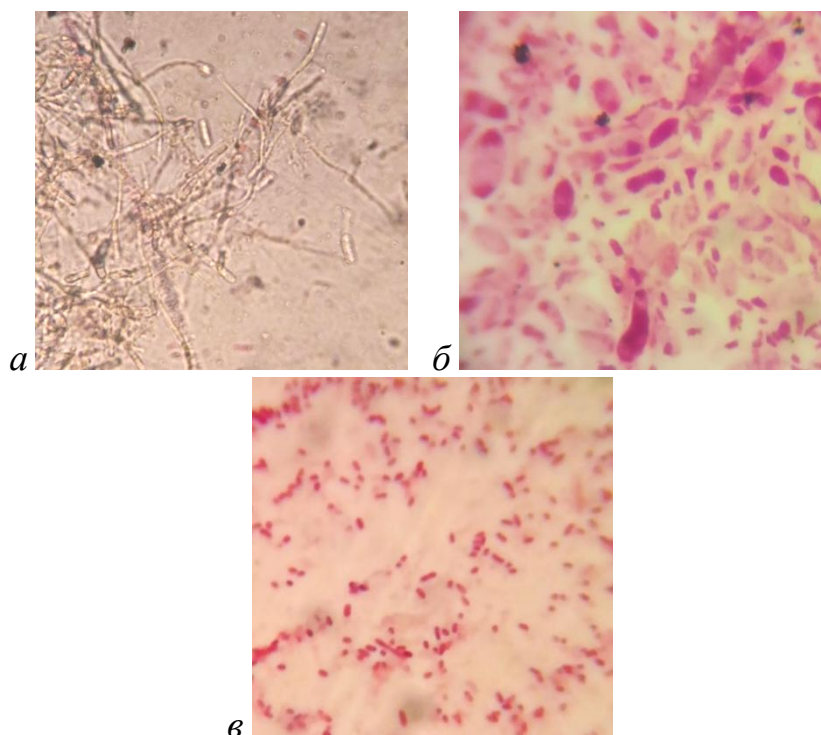


Рисунок 5 – Микроорганизмы, инфицирующие изолированные почки малины и ежевики *in vitro*: а – плесневые грибы, б – дрожжеподобные грибы, в – бактерии.

Биометрическая обработка, показала значимое различие между дезинфицирующим действием Na-ЭМТСК и другими четырьмя растворами. Однако между последними («Белизна» и перекись водорода) различия оказались статистически недостоверными (рисунок 6).

Подобное испытание стерилизующих растворов было проведено и с почками ежевики. Результаты оказались аналогичными.

Для уменьшения риска некроза эксплантов, учитывая результаты микробиологического анализа, на следующих этапах своей работы мы использовали «Белизну» (разведение 1:2).

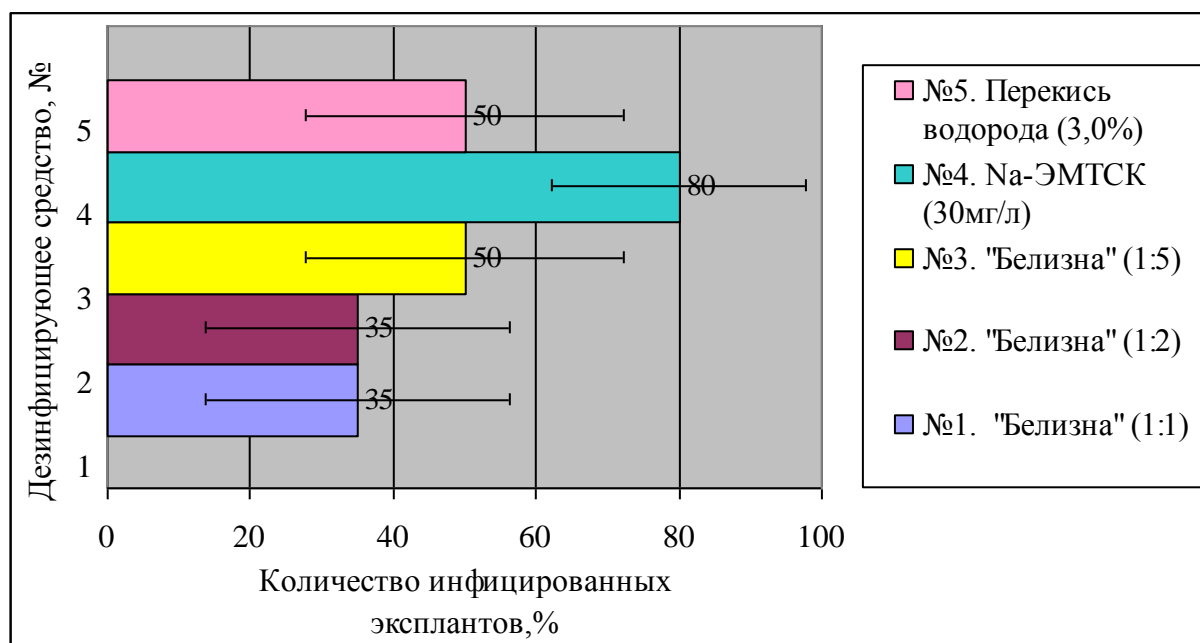


Рисунок 6– Результаты действия дезинфицирующих растворов на эксплантированные *in vitro* почки малины.

3.2 Индукция морфогенеза

Дальнейший этап нашей исследовательской работы включал подбор компонентов питательной среды, необходимых для активации роста первичного побега и стимуляции развития пазушных меристем.

Для первичного культивирования вегетативных и генеративных почек желтой малины и ежевики была выбрана питательная среда, включающая макро- и микроэлементы по Мурасиге и Скугу [Murashige T., 1962], витамины, сахарозу (20г/л), и другие компоненты, в соответствии с разделом 2.2 настоящей работы. В качестве индуктора морфогенеза мы использовали цитокинин 6-БАП в концентрации 0; 0,5; 1,0; 2,0 мг/л.

Наблюдения за эксплантами показали, что и для малины, и для ежевики не перспективными для культивирования являются цветочные почки. В процессе их первичного культивирования в условиях *in vitro* мы наблюдали только появление бутонов - флоральный геммогенез. Культивирование вегетативных почек малины и ежевики было более успешным: разворачивались покровные чешуи и листочки, появлялся небольшой первичный побег.

Как известно, успех клонального микроразмножения во многом определяется концентрацией используемого цитокинина.

При культивировании на среде без гормонов экспланты малины и ежевики коричневели, дегенерировали и погибали в течение 7 суток. На среде с высокой концентрацией БАП (2.0 мг/л) экспланты как-бы «замирали» в развитии на длительное время. При наличии в среде цитокинина в концентрации 0,5-1,0 мг/л мы наблюдали активные ростовые процессы в первичных эксплантах: рост и развитие первичного побега, разворачивание листочков.

Результаты анализа культивируемых *in vitro* объектов спустя 30 суток первичного культивирования представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Влияние концентрации 6-БАП на инициацию изолированных почек малины сорта Жёлтый гигант в условиях *in vitro*

Концентрация 6-БАП, мг/л	Количество высаженных эсплантов, шт.	Количество жизнеспособных эсплантов,		Количество эсплантов с побегами,	
		шт.	%	шт.	%
0	45	0	0	0	0
0,5	48	36	75,0	34	70,8
1,0	47	32	68,1	24	51,1
2,0	44	27	61,4	18	40,9

Таблица 4 – Влияние концентрации 6-БАП на инициацию изолированных почек сорта Торнфри в условиях *in vitro*

Концентрация 6-БАП, мг/л	Количество эсплантов, всего, шт.	Количество жизнеспособных эсплантов,		Количество эсплантов с побегами,	
		шт.	%	шт.	%
0	45	0	0	0	0
0,5	45	39	86,7	37	82,2
1,0	46	40	87,0	34	73,9
2,0	45	38	84,4	29	64,4

Статистическая обработка (графический метод) результатов сравнительного анализа эксплантированных пазушных почек малины показала, что среды с содержанием 6-БАП в концентрации 1,0 и 2,0 мг/л достоверно не отличаются по индукции морфогенеза (рисунок 7). Можно говорить лишь о преимуществе среды с невысокой (0,5 мг/л) концентрацией цитокинина. В данном случае частота встречаемости иницированных почек составляет 70,8%, что находится за пределами доверительных интервалов двух других названных вариантов сред.

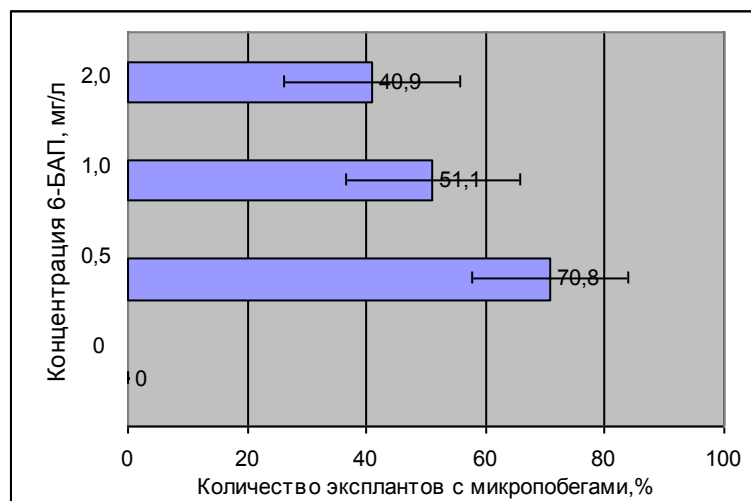


Рисунок 7 – Сравнительный анализ развития *in vitro* пазушных почек малины сорта Желтый гигант при разных концентрациях цитокинина.

Биометрический метод, применённый для оценки приживаемости эксплантов ежевики сорта Торнфри, показал, как изображено на рисунке 8, что среда с 0,5 мг/л 6-БАП визуальнее более продуктивна по сравнению со средой, включающей 2,0 мг/л фитогормона. В тоже время достоверных различий по инициации почек между концентрациями 6-БАП – 1,0 и 2,0 мг/л не обнаружено.

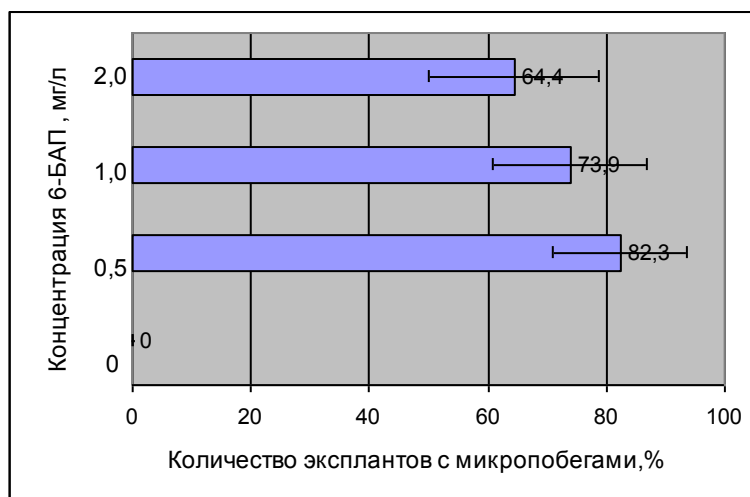


Рисунок 8 – Сравнительный анализ культивирования *in vitro* пазушных почек ежевики сорта Торнфри при разных концентрациях цитокинина.

Исходя из выше изложенного, можно заключить, что почки обоих представителей рода *Rubus*: малины сорта Жёлтый гигант и ежевики сорта Торнфри проявляют во многом сходную реакцию при идентичных

количества цитокинина в питательной среде. Однако при попарном сравнении этих двух объектов, культивируемых на средах с одинаковой концентрацией 6-БАП, были выявлены достоверные различия в частоте побегообразования. В пределах одной среды она была выше у ежевики по сравнению с малиной.

Можно предположить, что ежевика обладает более высоким природным регенерационным потенциалом.

3.3 Собственно размножение

Инициированные культуры переносили на среды для собственно размножения, содержавшие 6-БАП в количестве 1,0 мг/л. В процессе культивирования наблюдали индукцию к развитию боковых побегов из боковых пазушных почек центрального зачаточного побега. От одной почки и у малины, и у ежевики развивалось от одного до пяти пазушных побегов.

Каждый из этих боковых микропобегов мог служить эксплантом для дальнейшего клонального микроразмножения растений изученных видов (рисунок 9).

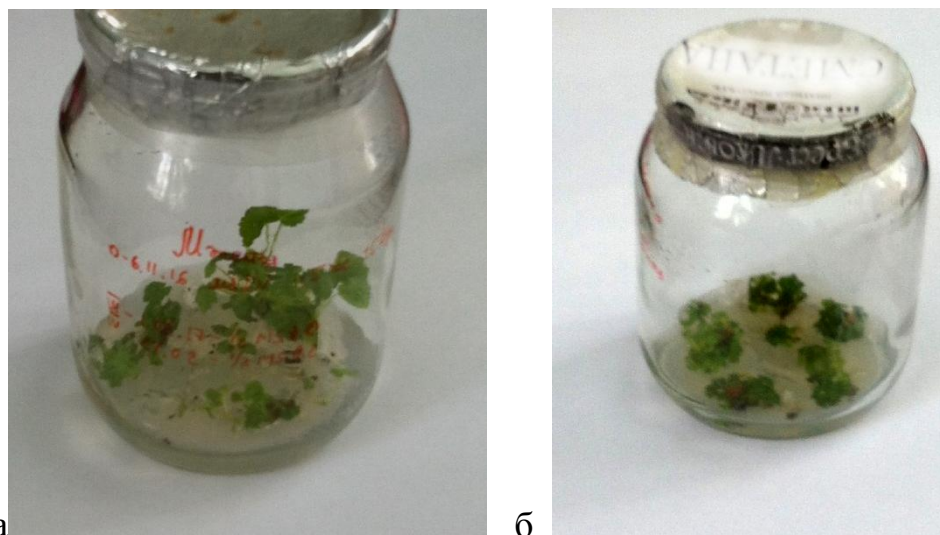


Рисунок 9 – Микропобегов, развившиеся на этапе собственно размножения при культивировании на среде $\frac{1}{2}$ МС, дополненной 1.0 мг/л БАП: *а* – малины сорта Жёлтый гигант, *б* – ежевики сорта Торнфри.

3.4 Укоренение микропобегов

Для индукции корнеобразования были испытаны варианты сред с уменьшенным в четыре раза количеством макроэлементов и сахарозы (до 10 г/л). В качестве стимуляторов ризогенеза в питательную среду добавляли ауксины: ИМК (0,5 мг/л), либо НУК (0,5 мг/л). Контролем служила среда без ауксинов.

Установлено, что по способности к укоренению растения малины и ежевики отличаются.

В культуре малины в контроле, на среде без ауксинов укоренение отмечали в 25-30 % случаев, при этом, как показано на рисунке 10а, развивался единственный корень длиной до 30 мм. Ауксины заметно влияли на ризогенез побегов в условиях *in vitro*. При наличии в среде ИМК приблизительно 60% растений малины продуцировали корни, тогда как на среде с НУК количество укорененных растений составляло около 45%. На среде с ИМК развивалось по 4-6 корней длиной 10-15 мм от каждого побега (рисунок 10б). На среде с НУК - не более 3-4 корней длиной 15-20 мм (рисунок 10в).

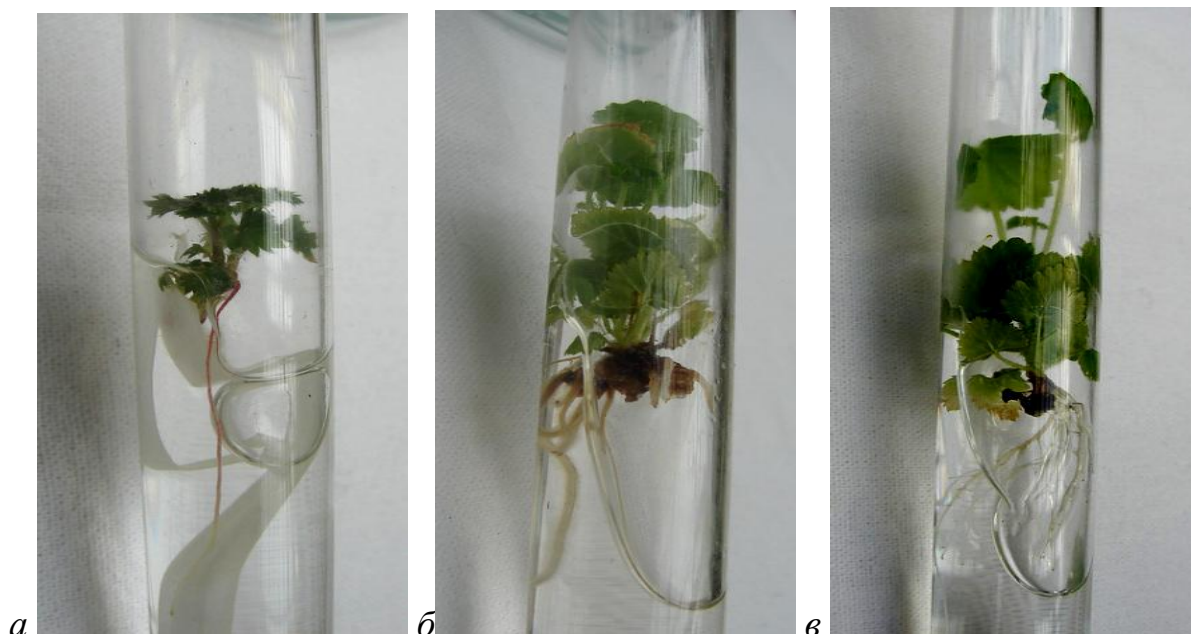


Рисунок 10 – Ризогенез микропобегов малины сорта Жёлтый гигант *in vitro*:

а – одиночный корень, *б* – несколько одиночных корней, *в* – несколько корней с боковыми корешками.

Укоренение микропобегов ежевики было более успешным (рисунок 11). На среде без ауксинов через 3-4 недели культивирования 90% регенерантов развивали корневую систему из 3-4 корешков длиной 10-15 мм. На средах с ИМК и с НУК отмечалось снижение частоты ризогенеза до 30-40% и формирование каллусной ткани в базальной части побега.



Рисунок 11 – Ризогенез микропобегов ежевики сорта Торнфри *in vitro*.

Таким образом, для укоренения микропобегов малины оптимальным является НУК, а для ризогенеза ежевики – среда без добавления ауксинов.

Растения-регенеранты, с хорошо развитой корневой системой (рисунок 12), пересаживали в почвенный субстрат и помещали в условия теплицы. Через 2 недели выращивания выжило 90% растений ежевики и 75% малины.



Рисунок 12 – Корнесобственные растения-регенеранты ежевики сорта Торнфри: *а* – перед высадкой в почву, *б* – через 2 недели выращивания в почве.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог данной исследовательской работы, можно сделать заключение, что в ходе эксперимента для таких представителей рода *Rubus*, как малина *Rubus idaeus* L. и ежевика *Rubus caesius* L. были выявлены основные особенности введения их в культуру *in vitro*: условия стерилизации (дезинфицирующие растворы, время экспозиции), тип экспланта, минеральные и гормональные компоненты питательной среды на разных этапах культивирования.

Несмотря на многоэтапность и рутинность клонального микроразмножения, метод очень продуктивный и компенсирует затраченные усилия. Мы полагаем, что исследования, проведённые на сорте малины Желтый гигант и сорте ежевики Торнфри, послужат нам стартом для дальнейших работ по оптимизации условий размножения *in vitro* новых, перспективных сортов ягодных культур семейства Rosaceae.

ВЫВОДЫ

1. Для стерилизации первичных эксплантов малины и ежевики оптимальной является обработка дезинфицирующим средством «Белизна» в разведении 1:2 (7% гипохлорита натрия) в течение 20 минут. В этом варианте доля стерильных жизнеспособных культур достигала 65%.

2. Растительный материал, выращиваемый в полевых условиях, характеризовался высокой степенью зараженностью патогенными микроорганизмами. На начальных этапах культивирования проявлялось инфицирование культур плесневыми и дрожжеподобными грибами, бактериями.

3. Среди двух типов изученных первичных эксплантов оптимальными являлись боковые вегетативные почки. В процессе культивирования генеративных почек *in vitro* наблюдается только появление бутонов - флоральный геммогенез.

4. При наличии в среде цитокинина 6-БАП в концентрации 0,5-1,0 мг/л в первичных эксплантах происходят активация ростовых процессов. На среде с высокой концентрацией 6-БАП (2.0 мг/л) экспланты останавливаются в развитии на длительное время.

5. Оптимальной для первичного культивирования пазушных почек малины сорта Жёлтый гигант и ежевики сорта Торнфри является среда МС, содержащая цитокинин 6-БАП в концентрации 0,5 мг/л.

Subject