

МИНОБРНАУКИ РОССИИ  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра генетики

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*  
ТРУДНОРАЗМНОЖАЮЩИХСЯ РАСТЕНИЙ  
СЕМЕЙСТВА *ROSACEAE* JUSS.

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2-го курса 241 группы

Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Слаутенко Татьяны Исломовны

Научный руководитель:

профессор, док. биол. наук

6.06.2023  О.И. Юдакова

Зав. кафедрой генетики:

профессор, док. биол. наук

6.06.2023  О.И. Юдакова

Саратов 2023

## ВВЕДЕНИЕ

Некоторые растения (такие как слива, ежевика, черешня и т.д.) относятся к трудно размножаемым культурам. Их довольно тяжело размножить традиционными методами (одревесневшими или зелеными черенками, отводками, прививками и др.), поэтому для работы с такими трудно размножающими культурами привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения - клонального микроразмножения.

Цель исследования - клональное микроразмножения *in vitro* трудноразмножающихся древесных растений (ежевика, малины желтой, сливы Писсарди, черешни взрослой и сеянцы).

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- 1) - подобрать оптимальные условия введения в культуру растительного материала;
- 2) подобрать оптимальный состав питательных сред для микроразмножения;
- 3) - определить наиболее эффективные индукторы морфогенеза на стадиях собственно микроразмножения и укоренения эксплантов.

Структура работы: Работа состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты исследования», выводов и списка использованных источников, проиллюстрирована 16 рисунками и 7 таблицами.

### **1 Обзор литературы**

Обзор литературы составлен на основе анализа 66 источников, в нем рассмотрены вопросы теоретического и прикладного значения культуры клеток и тканей растений, особенностей клонального микроразмножения растений, а также перспективы и достижения использования такого метода в селекции и генетике трудноразмножающихся древесных видов семейства Rosaceae (Бутенко, 1986; Шевелуха, 1998; Кастрицкая, 2018; Fawzia, 2020; Manisha, 2018; Wegayehu, 2016; Ying-Ning, 2010; Ildiko, 2013 и др.).

## 2 Материалы и методы исследования

Объектом исследования послужили 4 вида семейства *Rosaceae*: 1) ежевика; 2) малина желтая; 3) слива Писсарди и 4) черешня. У всех видов в качестве доноров растительного материала использовали растения на генеративной стадии развития, кроме этого у черешни также были использованы растения на ювенильной стадии развития (т.е. сеянцы). В работе использовались традиционные методы работы со стерильными культурами (Майорова, 2009; Фролова, 2009; Шахов, 2018; Wellander, 1985; Reeves, 1992; Yıldırım, 2009).

## 3 Результаты исследования

Оптимальная процедура стерилизации должна давать наименьшее количество инфицированного растительного материала и при этом не снижать его жизнеспособность. Было протестировано 2 варианта стерилизации эксплантов 0,5% раствором мертиолат 3 и 5 минут (табл. 4). Апробированный вариант стерилизации растительного материала 0,5% раствором мертиолат в 3 минуты был недостаточен, так как на 1 и 2-ой неделе культивирования объектов появлялись признаки инфекции (до 60% выживших эксплантов), поэтому для повышения эффективности стерилизации время обработки увеличили до 5 минут (до 95% выживших эксплантов) (рис. 5).

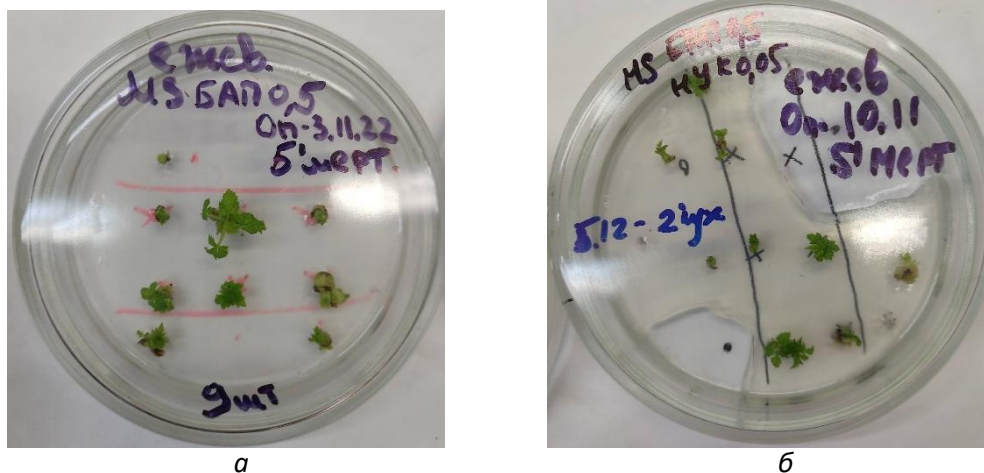
Таблица 4 - Эффективность разных вариантов стерилизации эксплантов через 7 суток после обработки

Объект	Вариант обработки эксплантов	Количество стерильных эксплантов, %
Ежевика	0,5% мертиолат, 3 мин	51,7
	0,5% мертиолат, 5 мин	95,4
Малина желтая	0,5% мертиолат, 3 мин	60,7
	0,5% мертиолат, 5 мин	92,6
Слива Писсарди	0,5% мертиолат, 3 мин	55,2
	0,5% мертиолат, 5 мин	90,1
Черешня взр.	0,5% мертиолат, 3 мин	57,3
	0,5% мертиолат, 5 мин	91,4
Черешня сеянцы	0,5% мертиолат, 3 мин	59,7
	0,5% мертиолат, 5 мин	90,8

Примечание: Определение оптимальных условий стерилизации почек проводили в 3 кратной повторности, в каждой повторности пассировали по 15 эксплантов.

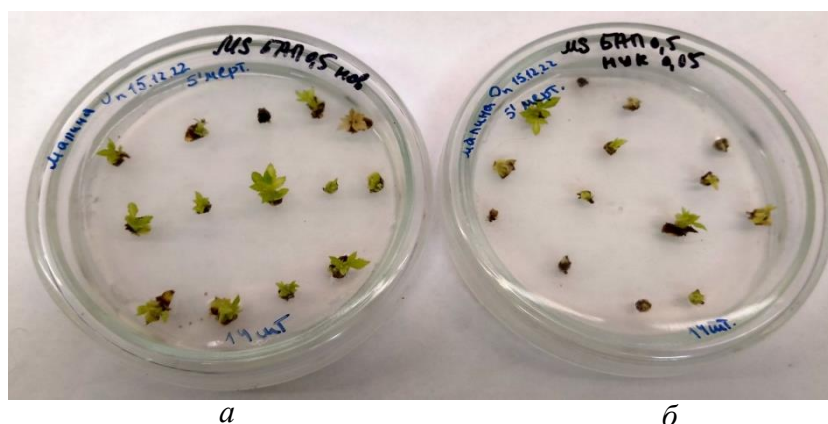
### 3.1 Инициации стерильной культуры

Для инициации почек было апробировано 2 варианта состава искусственных сред: 1) MS с добавлением БАП в концентрации 0,5 мг/л; 2) MS с добавлением БАП в концентрации 0,5 мг/л и НУК в концентрации 0,05 мг/л.



*a* – почки на среде MS с 0,5 мг/л БАП; *б* – почки на среде MS с 0,5 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК

Рисунок 5 – Экспланты ежевики на питательной среде с добавлением фитогормонов в различной концентрации



*a* – почки на среде MS с 0,5 мг/л БАП; *б* – почки на среде MS с 0,5 мг/л БАП и НУК 0,05 мг/л

Рисунок 6 – Экспланты малины желтой на питательной среде с добавлением фитогормонов в различной концентрации

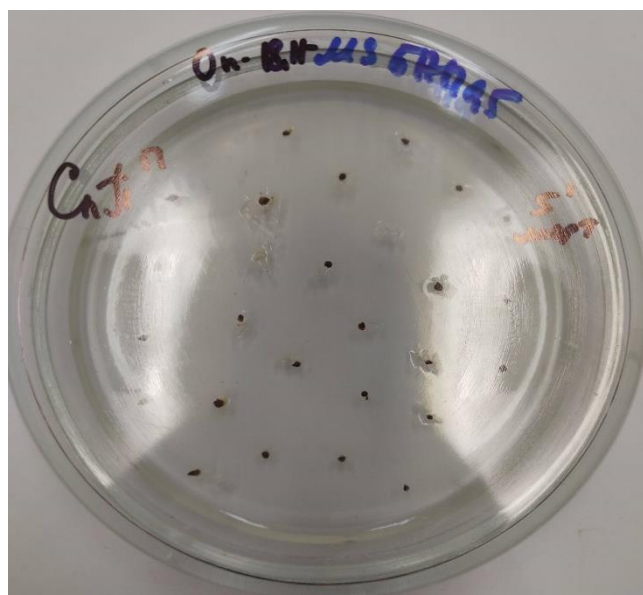
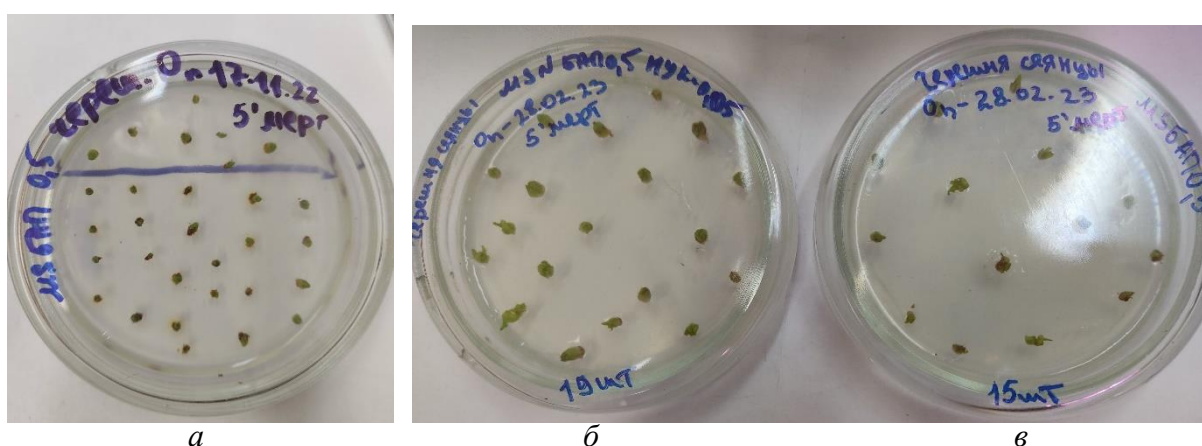


Рисунок 7 - Экспланты сливы Писсарди на питательной среде MS с добавлением 0,5 мг/л БАП



а – почки черешни взрослой на среде MS с БАП в концентрации 0,5 мг/л; б – почки черешни сеянцов на среде MS с БАП в концентрации 0,5 мг/л; в - почки черешни сеянцов на среде MS с БАП в концентрации 0,5 мг/л и НУК в концентрации 0,05 мг/л

Рисунок 8 – Экспланты черешни на питательной среде с MS с добавлением фитогормонов в различной концентрации

Таблица 5 – Количество прижившихся почек на средах для инициации

Объект (фактор В)	Количество прижившихся эксплантов на искусственной питательной среде (фактор А), %		Средняя по фактору В
	MS + 0,5 мг/л БАП	MS + 0,5 мг/л БАП + 0,05 мг/л НУК	
Ежевика	60	55,6	57,9b
Малина желтая	63,3	20,7	41,7b
Слива Писсарди	22,3	0	11,2a
Черешня взр.	39,65	35,0	37,2ab
Черешня сеянцы	49,9	41,0	45,3ab
Средняя по фактору А	42,7с	30,45с	

Примечание: Инициацию стерильной культуры проводили в 3 кратной повторности, в каждой повторности пассировали по 15 эксплантов. Варианты, сопровождаемые одинаковыми латинскими буквами, различаются незначимо по критерию Дункана

На этапе инициации морфогенетический потенциал изучаемых объектов определяли как способность эксплантов к росту и развитию в условиях *in vitro* – развитию побегов и разворачиванию листочков.

По количеству прижившихся эксплантов единственная культура, которая достоверно показала самые худшие результаты, была слива Писсарди, у которой на среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК все экспланты не прижились (табл. 5).

Но у всех растительных объектов наблюдались качественные различия на разных составах питательной среды MS.

У ежевики и малины желтой на среде MS с 0,5 мг/л БАП все экспланты прижились и больше тронулись в рост, развивался главный побег, на котором формировались пазушные побеги, на среде с добавлением 0,5 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК происходил более замедленный рост почек (рис. 5, 6).

Для эксплантов сливы Писсарди оптимальной являлась среда с добавлением 0,5 мг/л БАП, но при этом почки замерли и не тронулись в рост. На среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК происходило развитие каллуса все экспланты не прижились (рис. 7).

Почки черешни на генеративной и ювенильной стадиях развития на среде с добавлением 0,5 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК почки замерли, а на среде с добавлением только 0,5 мг/л БАП быстрее тронулись в рост и разворачивались листочки. При этом почки черешни на ювенильной стадии развития были крупнее и имели более выраженную окраску листьев (рис. 8).

### **3.2 Собственно размножение**

На этапе собственно размножение главной задачей является пролиферация побегов. Для увеличения эффекта размножения экспланты пересаживали на питательную среду MS с уменьшенным содержанием макросолей и различной концентрацией БАП и НУК.

Количественных различий у исследуемых видов на апробированных средах не наблюдалось. Меньше всего прижившихся эксплантов было у черешни на генеративной стадии развития на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 0,5 мг/л БАП (26,1%), БАП в концентрации 2,0 мг/л (17,8%) и 4,0 мг/л БАП (16,2 %), а также 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК (17,8%). Больше всего прижившихся эксплантов наблюдалось у ежевики с 2,0 мг/л БАП (80,6%) и 4,0 мг/л БАП (70,4 %), при этом на среде с 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК менее эффективное развитие (42,7 %) (табл. 6)

Таблица 6 – Количество прижившихся эксплантов на средах для собственно размножения через 1 месяц культивирования

Объект	Среднее количество прижившихся эксплантов на среде ½ MS с различным содержанием гормонов, %				
	0,5 мг/л БАП	2,0 мг/л БАП	4,0 мг/л БАП	6,0 мг/л БАП	2,0 мг/л БАП, 0,2 мг/л НУК
Ежевика	-	80,6	70,4	-	42,7*
Малина желтая	66,7 <sup>ns</sup>	52,1 <sup>ns</sup>	41,7 <sup>ns</sup>	40,5 <sup>ns</sup>	26,7 <sup>ns</sup>
Слива Писсарди	34,3 <sup>ns</sup>	21,9 <sup>ns</sup>	-	-	-
Черешня взр.	26,1 <sup>ns</sup>	17,8 <sup>ns</sup>	16,2 <sup>ns</sup>	-	17,8 <sup>ns</sup>
Черешня сеянцы	31,2 <sup>ns</sup>	30,8 <sup>ns</sup>	30 <sup>ns</sup>	26,1 <sup>ns</sup>	-

Примечание: Собственно размножение стерильной культуры проводили в 3 кратной повторности, в каждой повторности пассировали по 10 эксплантов. <sup>ns</sup> - отсутствие достоверных различий по результатам однофакторного анализа при  $p \geq 0,05$ , \* - достоверные различия присутствуют.

В тоже время наблюдались качественные различия эксплантов у исследуемых культур:

1. Так при концентрации 2,0 мг/л и 4,0 мг/л БАП у ежевики формировались крепкие и легко отделяющиеся конгломераты микропобегов, но при концентрации 4,0 мг/л БАП образовывались более вытянутые микропобеги. На среде с добавлением 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК у микропобегов происходило калусообразование (рис. 9).

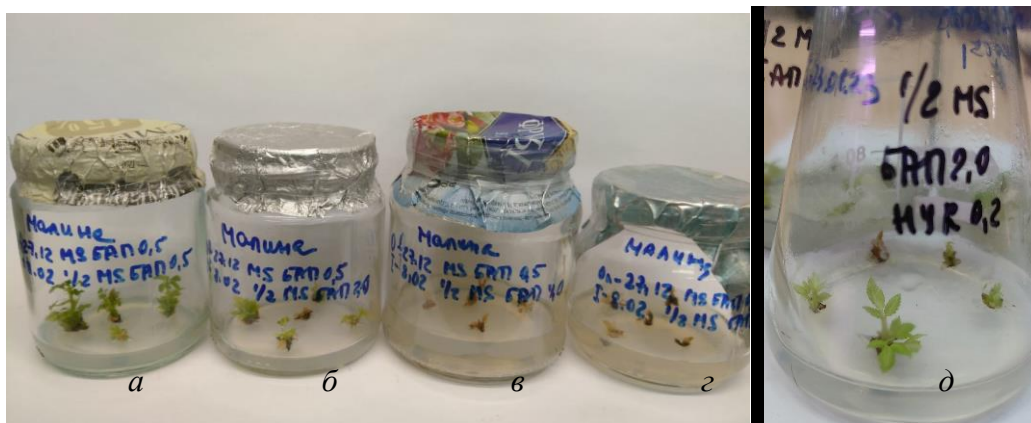




*а* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 2,0 мг/л БАП, 0,2 мг/л НУК; *б* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 4,0 мг/л БАП; *в* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 2,0 мг/л БАП

Рисунок 19 – Влияние состава питательной среды на развитие микропобегов ежевики через 1 месяц культивирования

2. У малины желтой на среде с добавлением БАП в концентрации 0,5 мг/л происходило быстрое развитие 2-3 микропобегов с выраженным главным побегом на эксплант, при концентрации 2,0 мг/л развивались укороченные микропобеги (меньше 0,5 см), концентрации 4,0 мг/л и 6,0 мг/л оказались критическими, экспланты не развивались. На среде  $\frac{1}{2}$  MS с добавлением 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК микропобеги были более крупными и вытянутыми (рис. 10).



*а* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 0,5 мг/л БАП; *б* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 2,0 мг/л БАП; *в* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 4,0 мг/л БАП; *г* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 6,0 мг/л БАП; *д* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК

Рисунок 10 – Влияние состава питательной среды на развитие микропобегов малины желтой через 1 месяц культивирования

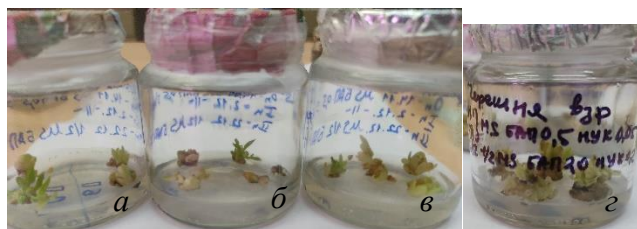
3. У сливы Писсарди происходил замедленный рост эксплантов из-за их размеров. После 3 месяцев культивирования и пересадки на свежую питательную среду с добавлением 2,0 мг/л БАП большинство (до 80%) микропобегов не прижились. Эффективной средой для размножения оказалась среда  $\frac{1}{2}$  MS с 0,5 мг/л БАП (рис. 11).



*a* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 2,0 мг/л БАП; *б* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 0,5 мг/л БАП

Рисунок 11 – Влияние состава питательной среды на развитие микропобегов сливы Писсарди через 1 месяц культивирования

4. Микропобеги черешни на генеративной стадии развития с добавлением 0,5 мг/л БАП формировались конгломераты микропобегов шаровидной формы, высота которых достигала 0,3-0,4 см. При концентрации 2,0 мг/л БАП микропобеги быстрее тронулись в рост, но на 2 месяце культивирования образовывался каллус. При добавлении и 4,0 мг/л БАП наблюдались различные морфозы (изменение формы листьев, закручивание). На среде  $\frac{1}{2}$  MS с 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК происходило калусообразование микропобегов и менее выраженную окраску листьев. Большинство эксплантов (90%) оказались цветочными (рис. 12).



*а* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 4,0 мг/л БАП; *б* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с БАП 2,0 мг/л; *в* – микропобеги  $\frac{1}{2}$  MS на среде с 0,5 мг/л БАП; *г* – микропобеги  $\frac{1}{2}$  MS на среде с 2,0 мг/л БАП, 0,2 мг/л НУК

Рисунок 12 – Влияние состава питательной среды на развитие микропобегов черешни взрослой через 1 месяц культивирования

5. У эксплантов черешни на ювенильной стадии развития на среде  $\frac{1}{2}$  MS с добавлением БАП в концентрации 0,5 и 2,0 мг/л были эффективными для получения наибольшего количества побегов, также происходило увеличение размеров листовой пластинки. При добавлении 4,0 мг/л БАП у эксплантов наблюдался более замедленный рост и образование каллуса, а концентрация 6,0 мг/л БАП была критическая и микропобеги не развивались (рис. 13).



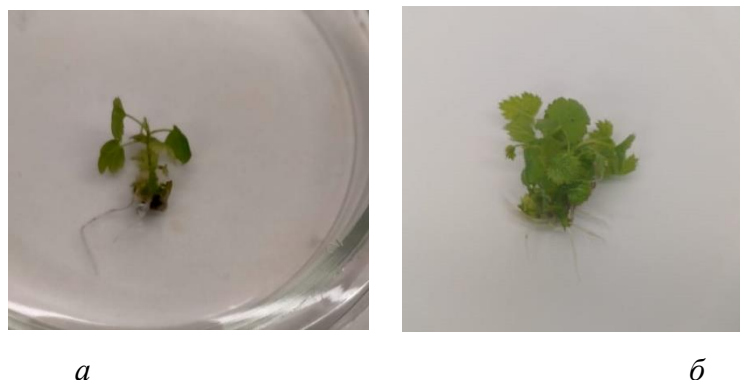
*а* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 0,5 мг/л БАП; *б* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 2,0 мг/л БАП; *в* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 4,0 мг/л БАП; *г* – микропобеги на среде  $\frac{1}{2}$  MS с 6,0 мг/л БАП

Рисунок 13 – Влияние состава питательной среды на развитие микропобегов черешни сеянцев через 1 месяц культивирования

### 3.2 Укоренение

Пучки микропобегов ежевики и малины желтой были пересажены на среду  $\frac{1}{2}$  MS с 0,5 мг/л БАП для их удлинения, где наблюдался спонтанный ризогенез (рис. 14).

У черешни и сливы Писсарди подобного явления не наблюдалось, поэтому микропобеги были пересажены на среду  $\frac{1}{4}$  MS с 0,5 мг/л НУК для укоренения, но все экспланты были инфицированы.



*a* – микропобеги ежевики; *б* – микропобеги малины желтой

Рисунок 14 – Спонтанный ризогенез ежевики и малины желтой

В процессе адаптации, укорененные регенеранты малины желтой и ежевики, помещали в пробирку с водой (рис. 15), после чего высаживали в смесь земли с песком (1:1) (рис. 16).



*a* – регенеранты малины желтой; *б* – регенеранты ежевики

Рисунок 15 – Адаптация укоренных регенерантов ежевики и малины к нестерильным условиям



Рисунок 16 – Адаптация укоренных регенерантов ежевики к нестерильным условиям

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для всех исследуемых видов самой эффективной средой для инициации оказалась среда MS, дополненная 0,5 мг/л БАП.

На этапе собственно размножение для ежевики лучшей средой была  $\frac{1}{2}$  MS, дополненная 2,0 и 4,0 мг/л БАП; для малины –  $\frac{1}{2}$  MS, дополненная 0,5 мг/л БАП и  $\frac{1}{2}$  MS с 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК; для сливы Писсарди, черешни на генеративной и ювенильной стадии развития –  $\frac{1}{2}$  MS, дополненная 0,5 мг/л БАП, а также подходящей средой для черешни на ювенильной стадии развития оказалась –  $\frac{1}{2}$  MS, дополненная 2,0 мг/л БАП (табл. 7).

Таблица 7 – Эффективные питательные среды на этапах культивирования

Объект	Лучший состав питательной среды		
	Инициация	Собственно размножение	Укоренение
1. Ежевика	MS + 0,5 мг/л БАП	$\frac{1}{2}$ MS + 2,0 мг/л БАП; $\frac{1}{2}$ MS + 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК	$\frac{1}{2}$ MS 0,1 мг/л БАП
2. Малина желтая	MS + 0,5 мг/л БАП	$\frac{1}{2}$ MS + 0,5 мг/л БАП; $\frac{1}{2}$ MS + 2,0 мг/л БАП и 0,2 мг/л НУК	$\frac{1}{2}$ MS 0,1 мг/л БАП
3. Слива Писсарди	MS + 0,5 мг/л БАП	$\frac{1}{2}$ MS + 0,5 мг/л БАП	-
4. Черешня взрослая	MS + 0,5 мг/л БАП	$\frac{1}{2}$ MS + 0,5 мг/л БАП	-
5. Черешня сеянцы	MS + 0,5 мг/л БАП	$\frac{1}{2}$ MS + 0,5 мг/л и 2,0 мг/л БАП	-

При клонировании древесных культур, а именно сливы Писсарди и черешни существует больше трудностей, чем у кустарниковых, они сложнее вводятся и размножаются в культуре *in vitro*.

Кустарниковые культуры (ежевика и малина желтая) были более отзывчивыми, лучше поддавались технологическим манипуляциям, быстрее росли, спонтанно укоренялись.

## ВЫВОДЫ

1. В экспериментах по клональному микроразмножению четырех представителей семейства Rosaceae (*Rubus fruticosus*, *Rubus idaeus*, *Prunus pissardii* и *Prunus avium*) с использованием в качестве первичных эксплантов пазушных почек эффективным способом стерилизации растительного материала была его обработка 0,5% раствором мертиолата в течение 5 минут.
2. У всех изученных представителей семейства Rosaceae этап инициации стерильной культуры от пазушных почек успешно проходил на среде MS, дополненной 0,5 мг/л БАП. Количество прижившихся эксплантов зависело от видовой принадлежности донорного растения и его жизненной формы. Экспланты *Rubus fruticosus* и *Rubus idaeus* (курстарники) приживались лучше на питательной среде (60,0 и 63,3%, соответственно), чем экспланты *Prunus pissardii* и *Prunus avium* (древесные формы) (39,65 и 22,3%, соответственно).
3. У *Rubus idaeus*, *Prunus pissardii* и *Prunus avium* собственно микроразмножение успешно проходило на среде  $\frac{1}{2}$  MS, дополненной 0,5 мг/л БАП, тогда как для *Rubus fruticosus* на данном этапе потребовалась более высокая концентрация гормона – 2,0 мг/л.
4. При снижении концентрации индуктора морфогенеза (БАП) в среде  $\frac{1}{2}$  MS до 0,1 мг/л происходило удлинение побегов у всех изученных видов, а у *Rubus fruticosus* и *Rubus idaeus* также наблюдался спонтанный ризогенез.

