

Размножение растений микрклональным способом

Введение

Проблема исчезновения растений, очень остро стоит в современном мире. По подсчётам специалистов Всемирного союза охраны природы, за последние 500 лет во Владимирской области, навсегда исчезло 844 вида растений.

Уничтожение отдельных видов растений ведет к оскудению всего генофонда флоры. Если истребляется хотя бы один вид, то кардинально меняется вся экосистема. Так растения являются кормом для травоядных животных, и в случае уничтожения растительного покрова, вымрут и эти звери, а затем и хищники.

Основные проблемы

Если говорить о конкретике, то сокращение количества видов флоры происходит по следующим причинам: вырубка лесов; осушение водоемов; сельскохозяйственная деятельность; радиоактивное загрязнение; промышленные выбросы; истощение почвы.

На просторах России произрастает огромное количество видов флоры. Это деревья, кустарники, травы и цветы. Несмотря на то, что есть большое количество зеленых зон, таких как леса, луга, степи, в стране огромное количество видов растений находится на грани вымирания. Такие крупные организации как ООН, ЮНЕСКО и WWF биоразнообразию растений в дикой природе. Создаются Красные книги, в которые вносится информация об исчезающих видах.

В последние годы для восстановлений природных популяций исчезающих растений активно используется метод микрклонального размножения.

Микроклональное размножение – это использование техники *in vitro* для быстрого получения неполовым способом растений, идентичных исходному.

Первые достижения в области микроклонального размножения были получены в конце 50-х годов XX столетия французским ученым Жоржем Морелем, которому удалось получить первые растения-регенеранты орхидей. Успеху Ж. Мореля в микроразмножении способствовала уже разработанная к тому времени техника культивирования апикальной меристемы растений в условиях *in vitro*. Как правило, исследователи в качестве первичного экспланта использовали верхушечные меристемы травянистых растений: гвоздики, хризантемы, подсолнечника, гороха, кукурузы, одуванчика, салата и изучали влияние состава питательной среды на процессы регенерации и формирования растений. Ж. Морель в своих работах также использовал верхушку цимбидиума (сем. орхидные) состоящую из конуса нарастания и двух-трех листовых зачатков, из которой при определенных условиях наблюдал образование сферических сфер — протокормов. Сформировавшиеся протокормы можно было делить и затем культивировать самостоятельно на вновь приготовленной питательной среде до образования листовых примордиев и корней. В результате им было обнаружено, что этот процесс бесконечен и можно было получать в большом количестве высококачественный и генетически однородный, безвирусный посадочный материал.

В России работы по клональному микроразмножению были начаты в 60-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза **Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН**. Под руководством чл.-корр. РАН, академика РАСХН **Бутенко Р. Г.** были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы, фрезии и некоторых других растений и предложены промышленные технологии. Таким образом, первые успехи в клональном микроразмножении связаны с культивированием апикальных меристем травянистых растений на

соответствующих питательных средах, обеспечивающих в конечном итоге получение растений-регенерантов.

Цель данной работы Разработать способ восстановления морошки (лат. *Rubus chamaemorus*) на охраняемых территориях.

Задачи данной работы:

1. Изучить методику введения растения в стерильные условия.
2. Подобрать питательную среду для морошки (лат. *Rubus chamaemorus*).
3. Ввести растение в специальные условия, используя различные способы стерилизации растительного материала для микрклонального размножения.
4. Использовать культуры ткани растения морошка (лат. *Rubus chamaemorus*) *in vitro* для самообучения методике выведения из стерильных условий растительных побегов с целью дальнейшего высаживания в открытый и закрытый грунт.
5. Оценить использование выращенной *in vitro* морошки (лат. *Rubus chamaemorus*) для восстановления генофонда редких и исчезающих видов растений на территории Владимирской области

Преимущества и недостатки микроклонального размножения

Использование методов микроклонального размножения растений дает возможность:

- ускорять селекционный процесс, в результате этого сроки
- получения товарной продукции сокращаются до 2–3 лет вместо 10–12 лет
- получать за короткий срок большое количество оздоровленного, безвирусного материала, генетически идентичного материнскому растению
- работать в лабораторных условиях и поддерживать активно растущие растения круглый год
- размножать растения практически без контакта с внешней средой, что исключает воздействие неблагоприятных абиотических и биотических факторов
- получать максимальное число растений с единицы площади
- в короткий срок получать большое число растений трудноразмножаемых или вегетативно неразмножаемых
- при выращивании растений с длительной ювенильной фазой можно ускорять переход от ювенильной к репродуктивной фазе развития
- длительно (в течение 1–3 лет) сохранять растительный материал в условиях *in vitro* (без пассирования на свежую среду)
- создавать банки длительного хранения ценных форм растений и отдельных их органов
- разрабатывать методы криосохранения оздоровленного *in vitro* материала.

Есть и недостатки:

- не все породы, даже на ювенильной стадии, могут размножаться вегетативным способом с требуемой эффективностью (дуб, сосна, ель, орехоплодные и др.);
- практически невозможно с помощью черенкования размножать многие виды древесных пород в возрасте старше 10-15 лет;
- не всегда удается получать стандартный посадочный материал (возможность накопления и передачи инфекции);
- трудоемкостью и сложностью операций при размножении взрослых (древесных) растений с помощью прививок;
- неэффективностью разработанных технологий для получения достаточного количества генетически однородного материала в течение года.

Хоть есть не мало недостатков, но преимуществ всё равно больше. Поэтому методика микроклонального размножения оправдывает себя и даёт свои плоды.

Собственные исследования

Сначала мы изучили и проанализировали литературу по данной теме, подобрали составы питательных сред для проращивания побегов, осваиваем методику работы с микроклонами на модельном объекте. В нашем исследовании модельный объект являются ростки фасоли, так как она быстро прорастает, имеет низкую стоимость, не токсична и редко инфицирована, широко распространена. На данный момент мы находимся на стадии отработки всех навыков.

Для микроклонального размножения чаще всего используют твердофазные среды на основе агар-агар, поэтому важным этапом является подбор концентрации агарозы. Для работы с ростовой средой осуществили практический подбор концентрации агарозы. Нами были исследованы 3 образца: 5% -ая, 3%-ая и 1,5%-ая. Чтобы получить твердофазную среду на основе агар-агара мы добавляем в 70 мл воды (объем чашки Петри) агар-агар в пральном соотношении (для 5%-ой - 3.5гр; для 3%-ой - 2.1гр; для 1.5%-ой - 1.05гр). Далее нагреваем нашу будущую питательную среду на нагревательной плите до полного растворения агар-агара. Потом разливаем по чашкам Петри. Наиболее оптимальным вариантом является 3% агарозная среда, так как 5%-ая среда оказалась очень плотной и мягкие ткани не получается посадить в неё. А 1.5%-ая среда получила очень жидкая и даже не застыла.

Так же был отработан навык посева тканей растений в питательную агарозную среду. Для лучшего развития и проростания часть растения нужно сажать в среду под углом 45°.

В абактериальной среде осуществляли внесение тканей растений различной плотности. Мы сажали как плотные ткани (семена овса), так и достаточно мягкие (черенки плюща).

Отработан навык формирования работы с меристемными тканями.

Меристемные ткани- ткани, клетки которых непрерывно делятся. Мы искали их на корнях растения каланхоэ.

Мы получили навык стерилизации посадочного материала. Этот процесс происходит при помощи белизны и этилового спирта.

Так же мы научились готовить и стерилизовать простые безгормональные агарозные среды с добавлением агарозы и минеральных веществ. В одну из таких входили: агароза, сахароза, аскорбиновая кислота, аммоний, магний.

В всероссийском-научном исследовательском институте сельскохозяйственных биотехнологий мы прошли практическую стажировку у старшего научного сотрудника Гарибян Цовинар Саркисовны по микрклональному размножению растений. На этом мастер-классе мы научились сажать черенки в питательную среду и узнали все тонкости этого процесса.

Во ВНИИСБ мы так же участвовали в научно-практической конференции, где заняли призовое место.

В перспективе мы планируем использовать две более сложные среды - среду ЧииПула и среду МакКауна, которые выбрали исходя из литературных данных, и провести в них высадку черенков.

Список литературы

<https://fb.ru/article/452129/mikroklonalnoe-razmnojenie-tehnologiya-primenenie>

<https://akulovka.com/blog/moroshka-yagoda-poleznye-svoystva-i-protivopokazaniya/>

http://alliumallium.narod.ru/olderfiles/1/095_Rubus_chamaemorus.pdf

<https://www.booksite.ru/fulltext/1/001/008/064/220.htm>

<http://edoopt.ru/>

<https://ecoportal-info.turbopages.org/ecoportal.info/s/krasnaya-kniga-vladimirskoj-oblasti/>

<https://www.booksite.ru/fulltext/1/001/008/064/220.htm>