

УДК: 634.739.3:736(476)

## РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ МИКРОКЛОНАЛЬНЫМ СПОСОБОМ

Удалова Юлия Валерьевна [udalova1971@mail.ru](mailto:udalova1971@mail.ru)

Фунтова Варвара Андреевна [varvara-funtova11@mail.ru](mailto:varvara-funtova11@mail.ru)

Детский технопарк "Кванториум-33", ГАОУ ДПО ВО "Владимирский институт  
развития образования им. Л.И. Новиковой"

г. Владимир, Владимирская область, Россия

**Анотация:** Статья посвящена нахождению способа восстановления естественной популяции морошки на охраняемых территориях Владимирской области

**Ключевые слова:** морошка, микроклональное размножение, питательные среды

## Udalova Julia, Funtova Varvara(Russia). PROPAGATION OF PLANTS BY MICROCLONAL METHOD

**Abstract:** The article is devoted to finding a way to restore the natural cloudberry population in the protected areas of the Vladimir region

**Keywords:** cloudberry, microclonal reproduction, breeding ground

### Введение

Проблема исчезновения растений, очень остро стоит в современном мире. Специалисты Всемирного союза охраны природы подсчитали, что во Владимирской области за последние пятьсот лет, исчезло 844 вида растений. Исчезновение отдельных видов растений ведет к вырождению всей флоры, а вся экосистема может измениться, если истребить хотя бы один вид. Так растения являются кормом для травоядных животных, и в случае уничтожения растительного покрова, вымрут и эти звери, а затем и хищники.

### Основные проблемы

Просторы России богаты огромным количеством видов флоры. Это травы, цветы, кустарники и деревья. Есть большое количество зеленых зон, таких как луга, леса, степи. Но несмотря на это, в нашей стране огромное количество видов растений находится на грани исчезновения. Крупнейшие организации такие как - ООН, ЮНЕСКО и WWF защищают биоразнообразие растений в дикой природе, а информация об исчезающих видах вносится в Красные книги.

Для восстановлений природных популяций исчезающих растений в последние годы активно используется метод микроклонального 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. Разработанное к тому времени техника культивирования апикальной меристемы растений в условиях *in vitro* способствовало успеху Ж. Мореля в микроклонировании. Чаще всего, исследователи в качестве первичного экспланта использовали верхушечные меристемы травянистых растений: гвоздики, астры, подсолнечника, фасоли, кукурузы, одуванчика, салата и изучали влияние состава питательной среды на процессы регенерации и развития растений. В своих работах учёный Ж. Морель 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 проростки можно было делить и затем выращивать самостоятельно на вновь приготовленной питательной среде до образования листовых наростов и корней. Ж. Морель сделал вывод, что этот процесс бесконечен. Можно в большом количестве качественный и генетически однородный, безвирусный посадочный материал.

**Цель данной работы:** найти способ восстановления естественной популяции морошки на охраняемых территориях Владимирской области..

**Задачи данной работы:**

1. Изучить методику введения растения в стерильные условия.

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

### **Обзор литературы по теме проекта**

Относится морошка к виду многолетних довольно редко встречаемых травянистых растений. Латинское название — *Rubuschamaemorus*. Употребляют морошку в пищу как в сыром виде, так и в переработанном состоянии.

Растёт морошка на севере. Встречается она на болотах и в горных районах, а также в заболоченных лесах. У нас ягода растёт преимущественно в Европейской части РФ. Временами проводится культивация. Также морошку можно встретить в Сибири, ещё — на дальнем востоке России. Владимирская область является южной границей её ареала.

Морошка — ягода ценная. Её законом охраняют в Польше, а в Беларуси, она занесена в Красную Книгу. С древних времён её называли: болотный янтарь; очи болота; болотный стражник. На севере за морошкой закрепилось название, которое полностью характеризует её плоды — «Царская ягода».

В лечебных целях морошку применяют в диетическом питании, а также для комплексного оздоровления. Эта ягода может помочь в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, желудочно-кишечных расстройств, заболеваний кожи.

Из-за своих полезных свойств морошка попала под вымирание и была занесена в Красную книгу.

### Этапы микроклонального размножения

Процесс микроклонального размножения состоит из 4 этапов:

1. Подбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение отлично растущей стерильной культуры.

2. Микроклональное размножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов.

3. Укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2°C - +10°C).

4. Выращивание и адаптирование растений в условиях теплицы и подготовка их к посадке в открытом или закрытом грунте.

### Питательные среды для микроклонального размножения

В технике *in vitro* применяют жидкие и агаризованные (плотные) среды. Жидкие среды используют для выращивания суспензий, каллусов, изолированных органов и тканей, растений-регенерантов. Для поддержания эксплантов в пробирки со средой помещают специальные мостики-поддержки из фильтровальной бумаги или синтетических пористых материалов.

В зависимости от вида растений используют как плотные (агаризованные), так и жидкие питательные среды. Иногда жидкие среды имеют преимущество, так как обеспечивают большую подвижность трофических элементов.

На эффективность размножения могут также влиять расположение экспланта (горизонтальное или вертикальное), тип пробок (ватные, пластмассовые,

стеклянные, металлические и т. д.), а также соотношение объема эксплантов и количества питательной среды для оптимального освещения и газообмена эксплантов. Для каждого вида растений подбирается свой состав питательной среды. Также в питательную среду добавляются гормоны, минеральные соли, витамины и углеводы. Часто используют среды Мурасига и Скуга, Гамборга, Хеллера и другие. Обычно используют среду Мурасига и Скуга, которая содержит много неорганического азота, что улучшает процессы роста и развития. Вопрос оптимального соотношения  $\text{NH}_4$   $\text{NO}_3$  остается открытым, так как литературные данные весьма противоречивы и универсального рецепта для всех видов растений нет.

В качестве источника питания используют углеводы типа сахарозы, глюкозы, фруктозы, галактозы. Разные культуры требуют различной концентрации углеводов на разных этапах микроклонального размножения. Компоненты среды для выращивания растительных клеток и тканей можно разделить на 6 основных групп: макроэлементы, микроэлементы, источники железа, витамины, источники углерода, фитогормоны. Основой для всех питательных сред является смесь минеральных солей. Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора - в виде фосфатов; серы - в виде сульфатов; а также растворимых солей  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ . Железо используется в виде хелатов  $[\text{Fe}_2\text{SO}_4$  или  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 + \text{ЭДТА}$  (этилендиаминтетрауксусная кислота) или её натриевая соль  $\text{Na ЭДТА}$  (трилон Б)] наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями.

Азот, фосфор, сера входят в состав органических соединений: белков, жиров, нуклеиновых кислот. Железо, цинк, марганец, молибден, кобальт в сочетании с порфиринами образуют макромолекулы пигментов фотосинтеза (хлорофилла), окислительно-восстановительных ферментов (каталазы, пероксидазы, полифенолоксидазы). Следовательно, все эти соединения выполняют в клетках и тканях структурную функцию. В то же время ионы  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{H}^+$  необходимы для регуляции pH среды и поддержания физиологических градиентов клеток (тургора, осмотического давления, полярности).

В качестве источника углерода для биологических макромолекул, а также при культивировании гетеротрофных тканей (каллусов и суспензий) в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 20-60 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза), моносахариды (гексозы: глюкоза и фруктоза, пентозы: ксилоза и другие). Полисахариды в питательных средах практически не используются.

Для стимуляции биохимических реакций в клетке используют витамины группы В (В1, В6, В12), С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит.

Чтобы управлять процессами формообразования в культуре тканей, необходимы биологические регуляторы роста и развития - фитогормоны. Эти вещества влияют на различие и сходство клеток и тканей, инициируют рост, скорость деления и растяжения клеток, участвуют в процессах старения и созревания, либо стимулируют, либо тормозят процесс роста и развития клеточных культур, обуславливают формирование пола. В биотехнологических исследованиях чаще используют гормоны, стимулирующие рост и развитие: ауксины, цитокинины, гиббереллины.

### Методы микрклонального размножения растений *in vitro*

Выделяют два различных типа микрклонального размножения:

1. Активация уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля).

2. Индукция возникновения почек или эмбриоидов *denovo*:

а) образование адвентивных побегов непосредственно тканями экспланта;

б) индукция соматического эмбриогенеза;

Основной метод, использующийся при клональном микроразмножении растений - активация развития уже существующих в растении меристем. Он основан на снятии апикального доминирования. Этого можно достичь двумя путями:

а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* (в пробирке) на безгормональной среде;

б) добавлением в питательную среду веществ, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов.

Как правило, в качестве цитокининов используют  $\beta$ -бензиламинопури (БАП) или 6-фурфуриламинопури (кинетин) и зеатин. Полученные побеги отделяют от первичного экспланта и снова самостоятельно культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей разрастание пазушных меристем и появление побегов более высоких порядков. Часто в роли экспланта берут верхушечные или пазушные почки, которые изолируют из побега и помещают на питательную среду с цитокининами. Образующиеся пучки побегов делят, если необходимо черенкуют и переносят на свежеприготовленную питательную среду. После нескольких пассажей, добавляя в питательную среду ауксины, побеги укореняют *in vitro*, а затем переносят в почву, где создают условия, способствующие адаптации растений.

Второй метод - образование адвентивных почек непосредственно тканями донора. Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и таким образом регенерировать целые растения. Можно добиться образования адвентивных почек почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковиц, сегментов корней и зачатков соцветий). Этот процесс происходит на питательных средах, содержащих цитокинины в соотношении с ауксинами 10:1 или 100:1. В качестве ауксина используют ИУК или НУК. Таким способом были размножены многие представители семейства лилейных, пасленовых, древесные растения (из зрелых и незрелых зародышей). Практикуемый при микроклональном размножении, третий метод основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название соматического эмбриогенеза. В отличие от развития *in vivo* (в естественных условиях), соматические зародыши развиваются вне зародышевого мешка и по своему внешнему виду напоминают биполярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апикальных меристем

стебля и корня. Соматические зародыши проходят 3 стадии развития: сердцевидную, торпедовидную, глобулярную и в конечном итоге имеют тенденцию развития в проросток. Культивирование черенков *in vitro* также невозможно. Было решено получить каллусы (скопления клеток недифференцированной ткани) путем дедифференцировки специфических тканей, а затем культивировать их до регенерации целых проростков. В первой культуральной среде каллусы из фрагментов листьев развивались в течение 90 дней, при переносе во вторую и третью культуральные среды превращались в "эмбриониды". Эмбриониды самопроизвольно размножались. За месяц число эмбрионидов возрастало втрое, а за год из 10 эмбрионов можно было получить потомство численностью 500000 растений

Формирование эмбрионидов в культуре тканей осуществляется в несколько этапов. Сначала происходит дифференциация клеток под влиянием ауксинов, добавленных в питательную среду (2,4-Д) и превращение их в эмбриональные. Получить эмбриониды из этих клеток можно уменьшая концентрацию ауксинов или исключая их из питательной среды. Соматические зародыши представляют собой полностью сформированные зародыши, из которых путем соответствующего капсулирования можно получить искусственные семена.

## **Материалы и методы**

В нашей научно-исследовательской работе мы будем размножать морошку методом черенкования. Черенкование - это вегетативный способ размножения растений при помощи укоренения черенков. Этим способом достаточно часто размножают как декоративные, так и плодовые растения.

Существует 4 вида черенкования:

- Листовое черенкование - укоренение листа с черешком
- Корневое черенкование - использование отрезков корней
- Черенкование одревесневших побегов - укоренение полностью вызревших, прошлогодних побегов

- Зелёное черенкование - укоренение молодых побегов, которые находятся в стадии роста

Если говорить конкретно, то мы будем использовать зелёное черенкование.

### **Результаты и их обсуждение**

Сначала мы изучили и проанализировали литературу по данной теме, выбрали составы питательных сред для проращивания побегов, осваиваем методику работы с микроклонами на модельном объекте. В нашем исследовании модельный объект является 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 (объём чашки Петри) агар-агар в правильном 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 получилась 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).

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 микроклональному 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 сентябре 2022 года, мы решили изменить модельный объект. Мы взяли малину, т.к. она относится к тому же роду и семейству, как и морошка. Перед тем, как посадить нашу малину в питательную среду, мы отобрали черенки. После этого мы стали варить 3% агарозную питательную среду, в которую входили агароза, калий, магний, амоний, сахароза. После этого, черенки нужно простерилизовать. Мы обрабатывали их раствором белезны и воды в пропорциях 1:3 и 1:4. Сразу же после стерилизации нужно сажать черенки в среду. Процессы стерилизации и посадка черенков в питательную среду проходят в ламинаре.

Из-за того, что сейчас малина ушла в зимнюю спячку и её развитие пока прекращён, мы решили посадить малину в горшочки, чтобы она росла и развивалась в тепле. Сначала мы отобрали черенки малины и поставили их в воду с ауксином, чтобы малина быстрее дала корни. После того, как появились корни, мы уже пересадили их в горшки с землей.

В областной научной библиотеке нами был осуществлён патентный поиск, в результате которого мы выяснили, что микроклональное размножение использовалось множество раз, но работ по микроклонированию морошки ещё не было.

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.