

Мизанбекова А.¹
Преподаватель¹

Назым Э.²

Коробов Д.³

студенты 3 - курса специальности «Биотехнология»,
кафедры химии и химические технологии^{2,3}

Карагандинский технический университет (Караганда), Казахстан

МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

Аннотация. В данной научной статье рассматривается методика микроклонального размножения растений. Исследованы технологические процессы вегетативного размножения хвойных растений передовыми биотехнологическими методами для нужд лесного и садово-паркового хозяйства. В культуру *in vitro* внедрены сосна веймутова (*Pinus strobus*) и ель европейская (*Picea abies*), с дальнейшим микроклональным размножением полученных регенерантов. Установлено влияние состава питательной среды на продолжительность культивирования и скорость образования каллуса у эксплантов ели. Зафиксирована зависимость частоты пересадки эксплантов сосны на выживаемость растений в культуре *in vitro*.

Ключевые слова: микроклональное размножение, экспланты, *in vitro*, регенеранты.

Mizanbekova A.¹

Teacher of the Department of
Chemistry and Chemical Technologies¹

Nazim A.²

Korobov D.³

Students of 3 course specialty Biotechnology^{2,3},
Department of Chemistry and Chemical Technologies,
Karaganda technical university (Karaganda), Kazakhstan

MICROCLONAL PROPAGATION OF PLANTS

Abstract. This scientific article discusses the technique of microclonal propagation of plants. Technological processes of vegetative propagation of coniferous plants by advanced biotechnological methods for the needs of forestry and gardening are studied. Weimut pine (*Pinus strobus*) and European spruce (*Picea abies*) were intro-

duced into the culture in vitro, with further microclonal propagation of the obtained regen-rants. The influence of the nutrient medium composition on the duration of cultivation and the rate of callus formation in spruce explants was established. The dependence of the frequency of transplanting pine explants on the survival of plants in culture in vitro was recorded.

Keywords: *microclonal propagation, explants, in vitro, regenerants.*

Микроклональное размножение- это практика быстрого размножения исходного растительного материала для получения многих потомственных растений с использованием современных методов культивирования растительных тканей [1].

Микроклональное размножение используется для размножения растений, таких как те, которые были генетически модифицированы или выведены с помощью традиционных методов селекции растений. Также используется для обеспечения достаточного количества проростков для посадки из основного растения, которое не дает семян или плохо реагирует на вегетативное размножение [2].

Микроклональное размножение начинается с выбора растительного материала для размножения. Растительные ткани удаляются из неповрежденного растения в стерильном состоянии. Чистые материалы, не содержащие вирусов и грибков, важны для производства самых здоровых растений [3].

Как только растительный материал выбран для культивирования, начинается сбор эксплантата (-ов), и он зависит от типа ткани, которая будет использоваться; включая кончики стеблей, пыльники, лепестки, пыльцу и другие растительные ткани. Затем материал для эксплантации стерилизуют на поверхности, как правило, несколькими способами, с использованием отбеливателя и спирта, и, наконец, промывают в стерилизованной воде. Эта небольшая часть растительной ткани, иногда только одна клетка, помещается в питательную среду, обычно содержащую сахарозу в качестве источника энергии и одного или нескольких регуляторов роста растений (гормонов растений). Обычно среда сгущается с агаром, чтобы создать гель, который поддерживает эксплантат во время роста [4].

Некоторые растения легко выращиваются на простых средах, но другие требуют более сложных сред для успешного роста; растительная ткань растет и дифференцируется в новые ткани в зависимости от среды. Например, носители, содержащие цитокинин, используются для создания разветвленных побегов из почек растений. Умножение - это взятие образцов тканей, произведенных на первом этапе, и увеличение их количества [5].

После успешного введения и роста растительной ткани стадия создания сопровождается умножением. Благодаря повторяющимся циклам этого процесса, один образец эксплантата может быть увеличен с одного до сотен и тысяч растений. В зависимости от типа выращенной ткани, умножение может включать различные методы и среды [6].

Если выращенный растительный материал представляет собой каллусную ткань, его можно поместить в блендер и разрезать на более мелкие кусочки и повторно культивировать на культуральной среде того же типа для выращивания большего количества каллусной ткани. Если ткань выращивается в виде небольших растений, называемых проростками, часто добавляются гормоны, которые заставляют проростки производить много мелких побегов. После формирования нескольких побегов, эти побеги переносят в корневую среду с высоким соотношением ауксин / цитокинин. После развития корней всходы можно использовать для закаливания [7].

Микроклональное размножение растений считается одним из перспективных направлений развития науки XXI столетия. Из числа положительных сторон микроклонального размножения перед классическим вегетативным методом считается высокий показатель размножения, увеличение сезонности выполняемых работ и выпуск растений к определенному сроку, возможность размножать и укоренять те растения, которые не размножаются или затруднительно размножаются обычными способами, например, быстрое клональное размножение взрослых лесных деревьев, в особенности хвойных [8].

Использование техники культивирования тканей для микроклонального размножения было впервые начато Морелом (1960) для размножения орхидей, и в настоящее время применяется к нескольким растениям. Микроклональное размножение - это удобный метод быстрого размножения растений. [9].

Минусом этого способа является наличие регулируемого опыления для получения чистых линий. Строго предусматриваются сроки взятия образцов – семена собирают в предсемядольной стадии развития зародыша [10].

Цель исследования – выявить более действенный метод ускоренного размножения хвойных пород для нужд лесного и садово-паркового хозяйства. В работе применен метод микроклонального размножения растений *in vitro*, базирующийся на вычленении точки роста сеянцев и меристематических тканей вегетативных частей средневозрастных древесных растений хвойных пород.

Ключевая задача для реализации установленной цели – введение в культуру *in vitro* разновидностей хвойных растений с последующим микроклональным размножением полученных регенерантов.

Объектом исследования служили маловозрастные растения сосна веймутова (*Pinus strobus*) и ель европейская (*Picea abies*) произрастающие в естественных условиях.

В ходе работы по микроклональному размножению хвойных растений использовалась питательная среда Мурасиге-Скуга с добавлением в ее состав сахарозы, активированного угля, ИУК (ауксины), а также антибиотика. Верхушечные, боковые почки и части побегов использовались в качестве эксплантов.

Все исследования с культурой клеток и тканей *in vitro* проводились в биотехнологической лаборатории, при стерильных условиях. Растительный материал был стерилизован погружением побегов в 5 % раствор гипохлорита натрия (NaOCl) в течении 30 минут. Далее, после стерилизации растительный материал промыли дистиллированной водой, 3-4 раза. Очистили точки роста от почечных чешуй и стеблей от коры, экспланты окунули в 96° этанол на 30 секунд.

Простерилизованные апикальные почки, освобожденные от почечных чешуй, поместили на питательную среду. Молодые побеги, разрезанные на более мелкие участки длиной около 1 см, также поместили на питательную среду.

Освобожденные от чешуй, стерильные апикальные почки поместили в питательную среду. Также в питательную среду поместили, мелко разрезанные молодые побеги длиной около 1 см.

Пробирки с эксплантами в течение двух недель культивировали в комнате без доступа света при температуре 22-25 °С и влажности 70%. Дальнейшее культивирование проводили при +26 °С, световом периоде 16 ч и освещенности 4–5 тыс. люкс.

В течении 2-ух недель, пробирки с эксплантами культивировали при 22-25 °С, влажности 70% и без доступа света. Далее культивирование проводилось в освещенности 5 тыс. люкс, в световом периоде 17 часов и при температуре +26 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При введении растительных материалов в культуру *in vitro*, а именно вегетативных частей сосны веймутова и ели европейской, оказалось, что данный метод размножения маловозрастных хвойных пород требует строгого соблюдения стерилизации и условий культивирования. После посадки, на четвертый день было выявлено приобретение бурового оттенка большинства эксплантов и заражение бактериальной микрофлорой. Позже, уже на десятые сутки, всего 80% почек ели европейской оставались жизнеспособными. Основной причиной гибели было заражение. На 17-й день культивирования было зафиксировано начало образования каллуса на почках. В этот же день, всего 33% эксплантов были жизнеспособными, их в дальнейшем пересаживали на свежую питательную

среду, в которой не было активированного угля. Доказано, что уголь поглощает действие активных веществ в питательной среде и уменьшает исходную концентрацию, в следствии чего замедляется каллусообразование. Исходя из этого из состава питательной среды был убран активированный уголь. При дальнейшем культивировании эксплантов увеличилась скорость нарастания каллусной массы. Деление эксплантов по продольной оси было произведено перед третьим посажем.

Также на питательную среду, содержащую в своем составе активированный уголь были посажены черенки ели европейской. На 14-ый день 40% эксплантов были заражены бактериальной микрофлорой, а 60% проросли на 0,4-0,7 см. Спустя день побеги были поделены на мелкие черенки, осуществлялась их пересадка на питательную среду, не содержащую в своем составе активированный уголь, отмечено, что большая часть растений начала наращивать новые побеги. Каждые 2 недели производились пересадки черенков ели европейской, на свежую питательную среду. Доказано, что при культивировании побегов ели европейской, на питательной среде без добавления активированного угля, отсутствует корнеобразование, а экспланты которые не пересаживались каждые 2 недели на свежую среду, приобретали бурый оттенок и отмирали.

В отличие от травянистых культур, многие из которых размножаются *in vitro* в коммерческом масштабе распространение многих видов деревьев, особенно хвойных, все еще в значительной степени экспериментальное. Среди лиственных пород в коммерческом масштабе теперь можно размножить ряд фруктовых и декоративных деревьев и несколько видов леса. Однако крупномасштабное размножение в настоящее время возможно только с одним или двумя видами хвойных. Одной из причин отсутствия коммерциализации хвойных пород является их стоимость. В течение последнего десятилетия «биотехнология» стала мощной дисциплиной для манипулирования жизненными формами. Биотехнология растений, в частности, вызывает большой интерес как в развитых, так и в развивающихся странах из-за ее широкого распространения в сельском хозяйстве. Потенциал биотехнологии растений основан на тотипотентности регенерации растительных клеток целыми растениями из культивируемых клеток и производстве генетических вариантов с полезными признаками.

Результаты исследований показали, что введение в культуру *in vitro* вегетативных частей взрослых растений хвойных пород кропотливый и ответственный процесс, требующий специфического подхода к каждому этапу культивирования. Хвойные растения наиболее сложные объекты для культуры *in vitro*. Все типы тканей и органов у них сильно заражены грибами и бактериями, что значительно затрудняет обеспечение асептики эксплантов [10]. Успешно прове-

дено введение в культуру *in vitro* вегетативных частей растений ели европейской и сосны вермута, позволяющее при дальнейшем культивировании и размножении получить посадочный материал. Необходимо на основе полученных данных продолжить изучение этого вопроса и подобрать наиболее оптимальные составы питательных сред и групп регуляторов роста растений. Десять лет назад основным методом получения растений хвойных пород для лесовосстановления было выращивание рассады. Только *Cryptomeria japonica*, *Thuja* sp. и *Cupressocyparis leylandii* и некоторые другие декоративные виды размножались корневыми черенками. Однако развитие методов вегетативного размножения древесных растений изменило ситуацию. Сегодня многочисленные виды хвойных деревьев размножаются корневыми черенками, среди них: *Picea abies*, *Picea glauca*, *Picea sitchensis*, *Larix* sp., *Sequoia sempervirens*, *Sequoiadendron giganteum* и т.д. Часто исходным материалом является отбор ювенильных саженцев, но в некоторых случаях (*Sequoia sempervirens*, *Pinus radiata* и т. д.) возможен отбор и вегетативное размножение взрослых деревьев. Трудности, связанные с вегетативным размножением генотипов взрослых, связаны с созреванием деревьев. Это особенно актуально для хвойных пород. Как правило, черенки, взятые из саженцев или молодых растений, легко укореняются и проявляют характерные для роста особенности и силу растений, полученных из семян. Тем не менее, у некоторых видов даже на этой очень молодой стадии возникают проблемы с вегетативным размножением. Классическими примерами являются *Pseudotsuga menziesii*, *Abies* sp. Когда черенки взяты из взрослого материала и укоренились, энергия этих растений слабая, и они часто плагиотропны. У некоторых видов с определенными обработками (например, обрезка) в конечном итоге можно восстановить привычку к ортотропному росту.

Список литературных источников

1. Aitken-Christie J and Singh AP (1987) Cold storage of tissue cultures. In: Bonga JM and Durzan DJ (Eds.) Cell and Tissue Culture in Forestry: Volume 2, Specific Principles and Methods: Growth and Developments, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp. 285–304.
2. Armson KA, Fung M, and Bunting WR (1980) Operational rooting of black spruce cuttings. *J for* 78:341–343
3. Attree SM, Bekkaoui F, Dunstan DI, and Fowke LC (1987) Regeneration of somatic embryos from protoplasts isolated from an embryogenic suspension culture of white spruce (*Picea glauca*). *Plant Cell Rep* 6:480–483.
4. Bekkaoui F, Pilon M, Laine E, Raju DSS, Crosby WL, and Dunstan DI (1988) Transient gene expression in electroporated *Picea glauca* protoplasts. *Plant Cell Rep* 7:481–484.
5. Bishir J and Namkoong G (1987) Unsound seeds in conifers: Estimation of numbers of lethal alleles and of magnitudes of effects associated with the maternal parent. *Silvae Genet* 36:180–185.
6. Bonga JM, von Aderkas P, and James D (1988) Potential application of haploid cultures of tree species. In: Hanover JW and Keathley DE (Eds.) Genetic Manipulation of Woody Plants, Plenum Publishing Corporation, New York. pp. 57–77.
7. Bonga JM and von Aderkas P (1992) Rejuvenation of tissues from mature conifers and its implications for propagation *in vitro*. In: Ahuja MR and Libby WJ (Eds.) Clonal Forestry: Genetics, Biotechnology, and Application, Springer Verlag (in press).
8. Cannell MGR, Sheppard LJ, and Cahalan CM (1988) c-Effects and second generation clone performance in *Picea sitchensis* and *Pinus conforta*. *Silvae Genet* 37:15–19.
9. Durzan DJ (1988) Somatic polyembryogenesis for the multiplication of tree crops. In: Russell GE (Ed.) Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, Volume 6, Intercept, Wimborne, Dorset. pp. 341–378.
10. Farnum P, Timmis R, and Kulp JL (1983) Biotechnology of forest yield. *Science* 219: 694–702.