

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

Кафедра генетики

**ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА
АБРИКОСА СИБИРСКОГО В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 424 группы
Направление 06.03.01 Биология
Биологического факультета
Соколовой Веры Владимировны

Научный руководитель

Зав. кафедрой генетики,

д. б. н., доцент

10.06.2016 г.



О.И. Юдакова

Зав. кафедрой генетики,

д. б. н., доцент

10.06.2016 г.



О.И. Юдакова

Саратов 2016

Введение. Дикорастущие сородичи культурных растений являются ценным материалом для селекции. Они могут служить источниками таких полезных признаков, как устойчивость к болезням, вредителям, засухе, морозам, засолению почвы и др. Кроме того, увеличить ассортимент сельскохозяйственных культур можно за счет непосредственного введения в культуру новых видов дикорастущих сородичей.

Для селекции плодовых культур одним из перспективных дикорастущих видов является абрикос сибирский (*Prunus sibirica* L.). Он широко распространен в горных районах северного и северо-восточного Китая, Восточной Сибири и Монголии (Hua-Bo Liu et.al., 2013; Ming Li et. al., 2014). Он способен расти в условиях низкой температуры, сильных ветров, низкого уровня осадков и на скудных почвах. В северном Китае абрикос сибирский используют для создания лесополос. Семена служат сырьем для получения биодизельного топлива, для приготовления белковых напитков и масла, применяемого в косметологии и традиционной китайской медицине для лечения кашля, астмы, пневмонии, сердечно-сосудистых заболеваний, снижения уровня холестерина.

В условиях Нижнего Поволжья абрикос сибирский хорошо вегетирует, цветет и завязывает плоды. Однако семена этого растения требуют длительной стратификации, что значительно осложняет получение посадочного материала. В последние годы для решения проблем репродукции растений, трудно размножающихся традиционными способами (семенами, черенками) используют методы клонального микроразмножения.

Регенерация растений в культуре *in vitro* может происходить как за счет активации уже существующих меристем экспланта (апекса стебля, пазушных и спящих почек), так и за счет инициации регенерации побегов или эмбриоидов *de novo*.

Разные пути морфогенеза определяют и конечный результат клонирования. Регенерация через каллусные культуры способствует появлению самоклональной изменчивости. Возникновение соматических

изменений может быть вызвано проявлением генетических (хромосомные нарушения, изменение ploидности) и эпигенетических (связанных с изменением экспрессии генов) изменений. Проявление самоклональной изменчивости может быть как недостатком, если требуется сохранить ценные генотипы, так и преимуществом, поскольку в этом случае происходит увеличение генетического разнообразия.

Накопленный к настоящему времени опыт размножения растений в культуре *in vitro*, свидетельствует о невозможности создания одной универсальной технологии клонирования. В каждом конкретном случае необходимо не только разрабатывать специфические методики, но и определять пути морфогенеза растений-регенрантов.

Целью настоящей работы явилось определение путей морфогенеза при клональном микроразмножении побегов абрикоса сибирского.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) осуществить темпоральную фиксацию эксплантов на разных стадиях развития;
- 2) провести гистологический анализ эксплантов.

Донором растительного материала служило дерево абрикоса сибирского, 2-2,5 м высотой, в генеративной стадии развития, из коллекции отдела дендрологии НИИСХ Юго-Востока (г. Саратов). В качестве первичных эксплантов использовали пазушные почки.

Работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Основная часть работы включает 3 главы: Обзор литературы, материал и методы и результаты исследования.

Основное содержание работы. В данном разделе бакалаврской работы приводится анализ современной литературы по вопросам прикладного и теоретического значения культуры тканей и органов растений (Альферманн, 1987; Цыренов, 2003; Дитченко, 2007), основных принципов культивирования клеток и тканей растений (Бутенко, 1999; Артаманов, 1989), приготовления питательных сред, особенностям клонального микроразмножения древесных растений в культуре *in vitro* (Калинин и др., 1980; Бутова, 1987; Муромцев и др., 1990; Царев, 2003; Шевелухина и др., 2003; Ахметова, 2006).

В разделе «Материал и методы» приводится систематическое положение абрикоса сибирского, его ботаническая характеристика и хозяйственное значение. Описываются использованные для проведения исследования методы культивирования побегов абрикоса сибирского на искусственной питательной среде (Lloyd, 1980), методы гистологического исследования морфогенеза (Юдакова и др., 2012).

Инициацию стерильной культуры и дальнейшее микроразмножение проводили на среде WPM, дополненной 0,25мг/л 6-бензиламинопурина (БАП). Пазушные почки стерилизовали и помещали в чашки Петри на питательную среду, после появления первичного и пазушных побегов их верхушки отсекали и переносили на среду для размножения. Развившиеся боковые и первичный побеги срезали и вновь помещали на свежую среду для размножения. Культуры выращивали в ростовой комнате при температуре $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ при 14 ч фотопериоде, используя Osram Fluora лампы (3 klux).

Для изучения гистологических аспектов морфогенеза экспланты фиксировали ацетоалкоголем (3:1) темпорально через 1, 2, 3, 4 и 5 месяцев после переноса экспланта на среду для размножения. Гистологические срезы приготавливали с использованием метода просветления растительных тканей (Юдакова и др., 2012). Приготовленный препарат анализировали с помощью стереомикроскопа «Discovery» (C. Zeiss, Германия). Фотографирование

препарата осуществляли с использованием фотоадаптера Canon и программы визуализации изображения Zoombrauser.

Культивирование почек абрикоса сибирского на питательной среде WPM, дополненной 0,25 г/л БАП, приводило к выходу их из состояния покоя (рис. 1, 2 а). Сначала развивался главный побег, и после того, как он достигал 1,5 см, развивались 2-3 пазушных побега. Главный и пазушные побеги отсекали и переносили на среду для размножения.

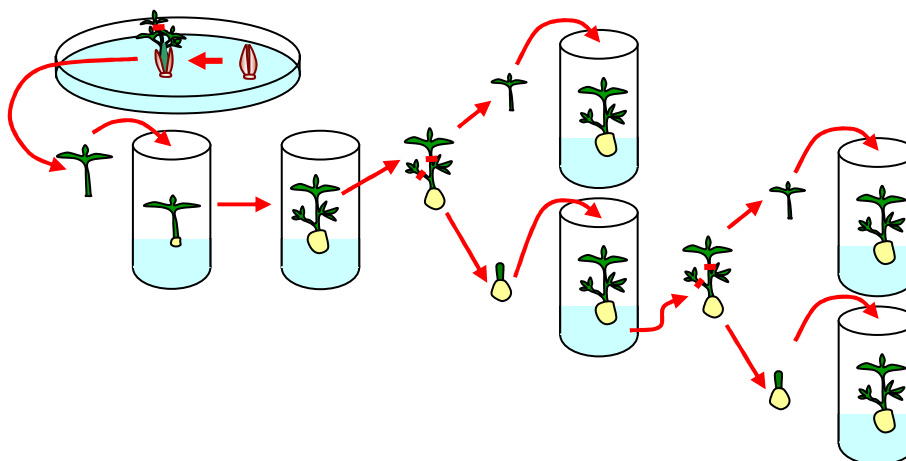


Рисунок 1 – Схема клонального микроразмножения побегов абрикоса сибирского

На среде для размножения происходил интенсивный рост первичного побега. Активизация пазушных меристем приводила к массовому образованию боковых побегов. В это же время в зоне базального среза экспланта формировался небольшой каллус светло-желтого цвета. Через месяц культивирования главный и пазушные побеги отсекали и переносили на свежую питательную среду аналогичного состава (рис. 2 г). Нижнюю часть экспланта вместе с каллусом переносили в отдельную колбу с питательной средой. На свежей питательной среде каллус увеличивался в объеме, в апикальной части срезанного побега развивалось несколько пазушных побегов. Через месяц культивирования всю процедуру повторяли: отделенные друг от друга вновь развившиеся побеги и нижняя часть экспланта с каллусом пассировалась на свежую питательную среду (рис. 1).



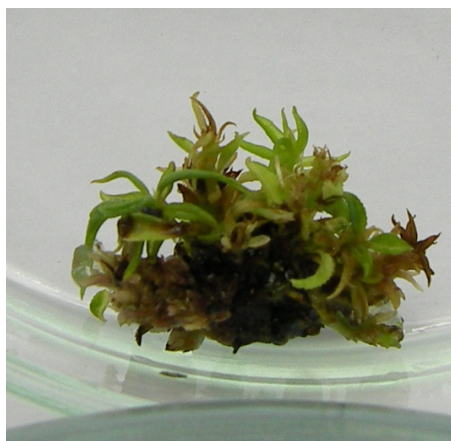
а



б



в



г

а – почки (инициация культуры); *б* – пассивирование отсеченных вновь развившихся побегов на свежую питательную среду; развитие нижней части побега и каллуса в стерильной культуре через 1 месяц (*в*) и 9 месяцев (*г*) культивирования

Рисунок 2 – Культура побегов абрикоса сибирского

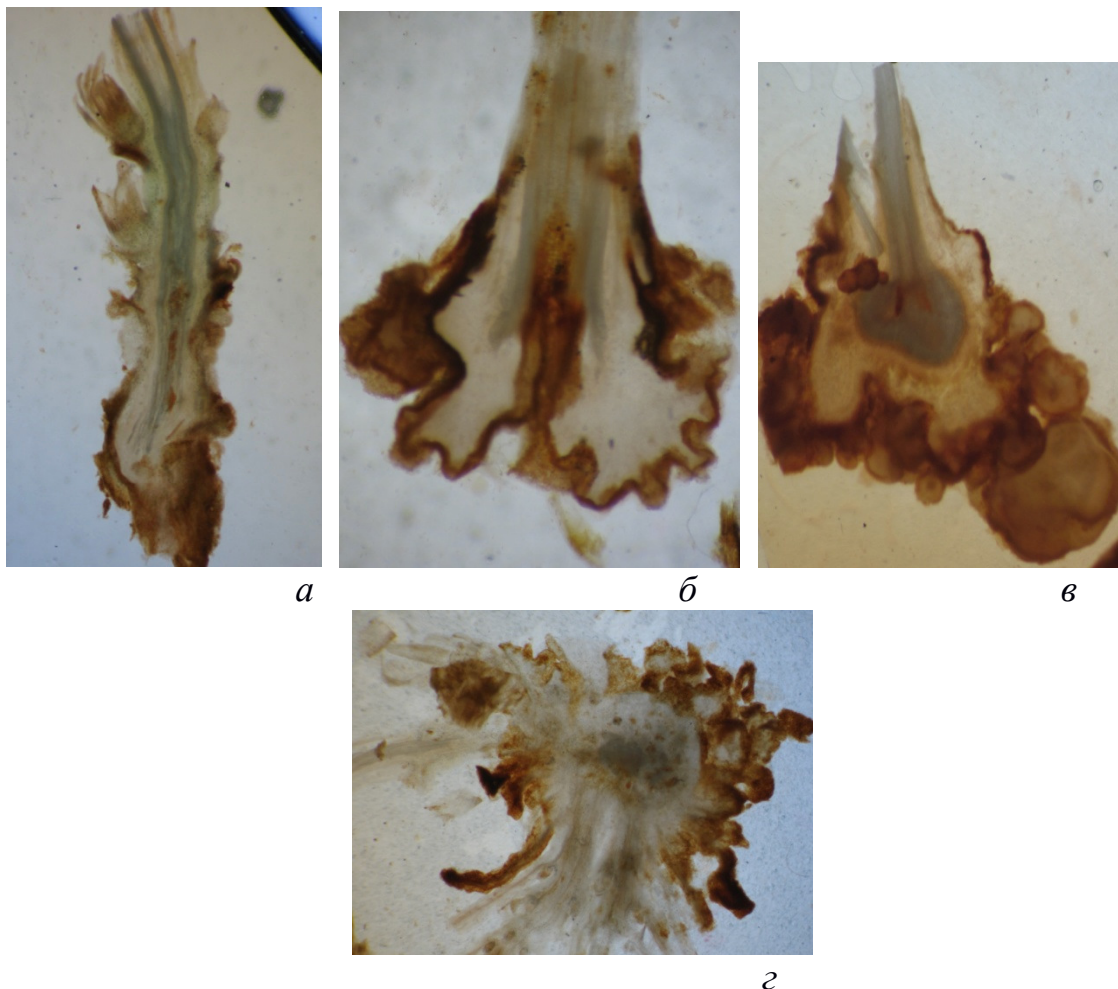
Нижнюю часть побега с каллусом культивировали на протяжении 6 месяцев. Постепенно морфогенетический потенциал культуры снижался. Сначала уменьшилось количество развивающихся побегов, затем наблюдался активный рост только одного из побегов и, наконец, побеги стали коричневеть, листья побегов желтели и засыхали. Несмотря на это каллус продолжал расти. На нем формировались глобулярные структуры,

характерные для морфогенных каллусов (рис. 2 в). Однако дальнейшего развития этих структур длительное время не происходило, побеги из каллуса не развивались. Только через 9 месяцев культивирования на месте каллусной ткани образовалось множество побегов (рис. 2 г). Направление их роста было самым разнообразным. Побеги росли не только вверх, но и в стороны от главного побега и даже вниз, врастая в питательную среду. Каллусная ткань при этом выглядела дегенерировавшей. Она имела темно коричневую окраску, глобулярные структуры на ней отсутствовали.

Гистологический анализ продольных срезов эксплантов, зафиксированных через 1 месяц культивирования, показал, что в зоне базального среза побега происходит частичная дегенерация клеток сердцевин. Каллус неравномерно окружает базальную часть побега, отсутствуя в области сердцевин. Такое расположение каллусной ткани позволяет констатировать, что ее формирование происходило в основном за счет пролиферативной активности феллогена (рис. 3 а,б).

Через 3 месяца культивирования каллус увеличивался в размерах. На нем формировались глобулярные структуры разного размера. В основном каллус, как и на более ранних стадиях развития, продолжал состоять из однородных недифференцированных клеток.

Через 4 месяца культивирования в некоторых крупных глобулярных структурах появились очаги меристематической активности. Она были представлены более мелкими клетками с густой цитоплазмой. На срезах отчетливо видно, что проводящие пучки первичного побега заканчиваются в зоне среза, их роста и дифференциации в каллусной ткани не происходит.



а – первичный побег с развивающимися пазушными почками (1 месяц культивирования); *б* – каллус в зоне базального среза побега через 1 месяц и 5 месяцев (*в*) культивирования; *г* – развивающиеся побеги и дегенерирующая каллусная ткань (9 месяцев культивирования)

Рисунок 3 – Культура побегов абрикоса сибирского

Через 5 и 6 месяцев культивирования количество глобулярных структур на каллусе продолжало увеличиваться, в некоторых из них наблюдались очаги меристематической активности, но их дальнейшего развития не происходило. На экспланте продолжали формироваться пазушные побеги, которые располагались пучком (рис. 3 *в*). Это может быть обусловлено угнетением роста первичного побега, из-за чего междоузлия оказывались сильно сближенными друг с другом.

Развившиеся через 9-10 месяцев культивирования побеги, как показал гистологический анализ, также были результатом пролиферативной активности пазушных меристем. На поперечных срезах отчетливо видна связь проводящей системы вновь развившихся побегов с проводящей системой первичного побега (рис. 3 з). Каллусная ткань к этому времени дегенерировала.

Заключение. При длительном культивировании в течение 9-10 месяцев каллуса и нижней части побега абрикоса сибирского в стерильной культуре происходит постепенное снижение морфогенетического потенциала экспланта. Количество вновь образующихся пазушных побегов постепенно снижается, но через 9-10 месяцев происходит массовое образование побегов, прорастающих из каллуса.

Проведенный гистологический анализ морфогенеза в культуре *in vitro* побегов абрикоса сибирского свидетельствует о том, что в базальной части побега формируется неморфогенный каллус. Несмотря на его активный рост, образование глобулярных структур и наличия очагов меристематической активности в некоторых из них, развития адвентивных побегов из каллусной ткани не происходит. Развивающиеся на протяжении всего длительного периода культивирования побеги являются результатом пролиферативной активности меристематических тканей первичного экспланта и связаны с ним через проводящую систему. Данный путь морфогенеза обеспечивает генетическую однородность вновь развившихся побегов исходному экспланту. Это позволяет рекомендовать разработанный метод клонального микроразмножения абрикоса сибирского для получения высококачественного посадочного генетически однородного материала.

Выводы:

1. Культивирование побегов абрикоса сибирского на среде для размножения (WPM, дополненной 0,25 г/л БАП) приводит к развитию большого количества (более 10) пазушных побегов. В базальной части побега формируется небольшой неморфогенный каллус светло-желтого цвета.

При длительном культивировании на искусственной питательной среде каллуса и базальной части первичного побега происходит постепенное снижение морфогенетического потенциала экспланта: уменьшается длина междоузлий первичного побега и количество вновь развивающихся пазушных побегов.

2. Развитие новых побегов в культуре *in vitro* осуществлялся за счет активизации пазушных меристем экспланта. Через 4-5 месяцев культивирования в каллусе происходит формирование зон повышенной пролиферативной активности, но их дальнейшего развития в адвентивные побеги не происходит.
3. Формирующиеся побеги генетически соответствуют исходному экспланту, поскольку являются результатом пролиферативной активности его меристематических тканей и связаны с ним через проводящую систему. Это позволяет рекомендовать разработанный метод клонального микроразмножения абрикоса сибирского для получения высококачественного посадочного генетически однородного материала.