

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

Кафедра генетики

**ОСОБЕННОСТИ РЕПРОДУКЦИИ**  
***LABURNUM ANAGYROIDES* MEDIK. В УСЛОВИЯХ**  
***IN VIVO И IN VITRO***

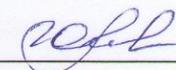
АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы  
Направления 06.04.01 Биология  
Биологического факультета  
Степановой Анны Игоревны

Научный руководитель  
зав. кафедрой генетики,  
д.б.н., доцент

19.06.2017  О.И.Юдакова

Зав. кафедрой генетики,  
д.б.н., доцент

19.06.2017  О.И.Юдакова

Саратов 2017

**Введение.** Зеленые насаждения являются важным элементом благоустройства урботерриторий. Они выполняют как комплекс важных экологических функций, так и являются органической частью планировочной структуры города. В связи с этим при выборе ассортимента для озеленения городов важно учитывать не только эколого-физиологические особенности растений, но их эстетические характеристики. Расширение ассортимента декоративных древесных культур возможно путем интродукции видов из других климатических и географических зон. Одним из таких растений для озеленения городов европейской части России, и в том числе Нижнего Поволжья, может стать бобовник анагировидный (Золотой дождь). Это древесное растение обладает ценными декоративными показателями, хорошо переносит зиму в средней полосе России, достаточно устойчив к дыму и газам, растет быстро и рано вступает в пору цветения и плодоношения (в возрасте 3 лет).

Бобовник анагировидный культивируется как декоративное растение с 1560 года. Однако в нашей стране он до сих пор встречается главным образом в ботанических садах и не используется для массового озеленения. Во многом это связано с трудностями получения посадочного материала. Растение плохо размножается вегетативно, семена характеризуются сложным комбинированным физическим покоем, технология преодоления которого сложна и слабо разработана. В последние годы для решения проблем трудно размножающихся древесных форм используют метод клонального микроразмножения. В его основе лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, то есть под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму.

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 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. Сохранение исходных признаков (генетическая стабильность) полученных клонов – одна из основных задач биотехнологии. Таким образом, используя небольшое количество исходного материала можно получить высококачественный посадочный материал в неограниченных количествах независимо от времени года.

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-регенерантов.

В отделе генетики и репродуктивной биологии УНЦ «Ботанический сад СГУ» была разработана технология клонального микроразмножения бобовника анагировидного с использованием культуры побегов. На искусственной питательной среде из первичного побега формировались боковые побеги, в каллусе – многочисленные адвентивные. Однако в целях сохранения генетического однообразия потомства адвентивные побеги не использовали для дальнейшего микроразмножения. В связи с этим коэффициент размножения при использовании разработанного метода был достаточно низким и не превышал 2-4 побега на эксплант. Использование адвентивных побегов для клонального микроразмножения допускается только в случае доказанного генетического соответствия их исходному

донорному растительному материалу. В противном случае возрастает риск самоклональной изменчивости.

Целью настоящей работы явилось изучение особенностей репродукции *Laburnum anagyroides* L. *in vivo* и *in vitro* при интродукции в условия Нижнего Поволжья.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие задачи:

- 1) провести темпоральную фиксацию соцветий и изучить особенности развития и строения генеративных структур и органов;
- 2) осуществить темпоральную фиксацию эксплантов, культивируемых на питательных средах с разным содержанием цитокининов;
- 3) провести гистологический анализ роста и развития регенерантов;
- 4) определить пути морфогенеза при клональном микроразмножении побегов бобовника анагировидного на питательной среде с разным содержанием цитокининов.

**Основное содержание работы.** В данном разделе магистерской работы приводится анализ литературы по вопросам теоретических и прикладных аспектов культуры клеток, тканей и органов растений *in vitro* (Murashige, 1974; Mikkelsen, 1978; Тиссера, 1989); технологии стерильной культуры клеток, тканей и органов растений (Evans, 1981; Flick, 1983; Holdgate, 1975; Ammirato, 1983; Durbin, 1986; Gamborg, 1981) цитогенетических особенностей культивируемых клеток (Дитченко, 2007; Першина, 2000); проблемы и достижения в области культуры *in vitro* древесных форм растений (George, 2008; Джонс, 1987; Калинин, 1992).

В разделе «Материал и методы» приводится систематическое положение бобовника анагировидного, его ботаническая характеристика и хозяйственное значение. Описываются использованные для проведения исследования методы цитоэмбриологического исследования репродуктивных структур бобовника анагировидного, методы культивирования побегов на искусственной питательной среде (Murashige, 1962), методы

гистологического исследования морфогенеза (Herr, 1971; Юдакова и др., 2012).

Проведенное исследование показало, что в условиях Нижнего Поволжья экземпляр *L. anagyroides*, культивируемый с 1974 г. на территории дендрария УНЦ «Ботанический сад» Саратовского госуниверситета (51°32'26"с.ш. и 46°00'30"в.д.), в целом достаточно хорошо перезимовывало, лишь в особо морозные зимы наблюдалось обмерзание однолетних побегов. Тем не менее, весной растение быстро восстанавливалось. Ежегодно оно обильно цвело и завязывало семена. Однако на протяжении многих лет попытки размножить это растение традиционными методами оказывались безуспешными: единичные всходы от самосева быстро погибали, корневая поросль отсутствовала, размножение черенками и интактными семенами было мало эффективным (2-10%).

Как известно, причинами неэффективности семенного размножения могут быть как аномалии развития генеративных органов и структур, так и нарушения процессов опыления, оплодотворения, завязываемости семян и созревания плодов. В связи с этим нами было проведено цитоэмбриологическое исследование мужской и женской генеративных сфер *L. anagyroides* на разных стадиях развития.

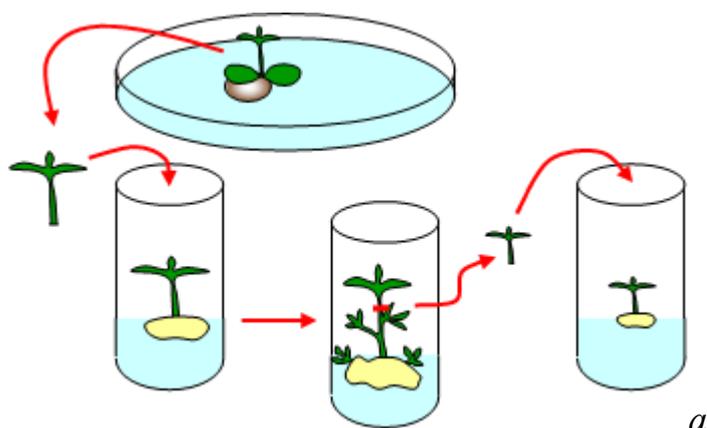
Проведенное исследование показало, что в условиях интродукции генеративные органы и структуры *L. anagyroides* развивались без каких-либо отклонений от нормы. Цветки мотылькового типа, собраны в поникающие многоцветковые кисти длиной 18-22 см. Тычинок десять, они сросшиеся. Пестик с шиловидным столбиком и головчатым рыльцем, завязь на ножке. В завязях формируется в среднем  $4.9 \pm 0.1$  кампилотропных семязачатков (рис.3). Соотношение количества пыльцевых зерен к количеству семязачатков (P/O ratio) составляет 1440, что характерно для факультативных аллогамов [34]. Зародышевые мешки Polygonum-типа. Зародыш и эндосперм развиваются в результате оплодотворения. Нарушений постсингамных процессов и цитоэмбриологических признаков апомиксиса не обнаружено.

Плоды – бобы, линейные, неясно перетянутые, длиной 2-5 см. В плодах формируется в среднем  $1.5 \pm 0.1$  семян на 1 боб. Семена гладкие, почковидные, размером 3-4 мм, цвет их варьирует от светло-желтого до светло-коричневого.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в условиях Нижнего Поволжья генеративные структуры *L. anagyroides* развиваются нормально, однако реальная семенная продуктивность ( $1.5 \pm 0.1$  семян на 1 боб) составила лишь около 30% от потенциальной продуктивности ( $4.9 \pm 0.1$  семязачатков на одну завязь). Это может быть связано с тем, что часть семязачатков остались не оплодотворенными. Соотношение количества пыльцевых зерен к семязачаткам свидетельствует о том, что данный вид является перекрестно опыляемым, а в нашем случае в Ботаническом саду СГУ культивируется единственный экземпляр.

Завязавшиеся семена были полностью сформированными с нормально развитым зародышем и эндоспермом. Это дает основание полагать, что отсутствие прорастания семян не является следствием нарушения эмбриологических процессов, а обусловлено другими причинами. Одной из таких причин может быть свойственное Бобовым явление глубокого физического покоя семян.

При введении в стерильную культуру сухие семена бобовника анагировидного замачивали на 30 мин в горячей воде, после чего их стерилизовали 0,1% раствором  $HgCl_2$  (15 мин), промывали 3-5 порциями стерильной дистиллированной воды и помещали на питательную среду по MS с добавлением 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина, БАП для получения проростков. После появления проростков корень отсекали, а оставшуюся часть помещали на среду для размножения (см. рисунок).



*a*



*б*



*в*

*a* – схема клонального микроразмножения; *б* – первичные и боковые побеги, развившиеся через 4 недели культивирования; *в* – первичные и адвентивные побеги, развившиеся через 4 месяца культивирования

Рисунок – Культура побегов бобовника анагировидного

Развивающиеся боковые и первичный побеги срезали и вновь помещали на среду для размножения. Такие пассажи можно было проводить неоднократно. Для мультипликации побегов использовали среду MS. В качестве индукторов морфогенеза был использован БАП в концентрации 0,5, 2,0 и 4,0 мг/л. Все среды содержали витамины по прописи соответствующей среды, 20 г/л сахарозы, 7 г/л агара. Среда автоклавировали 20 мин при 120°C. Культуры выращивали при температуре 24±2°C, 14-часовом фотопериоде и

освещенности 3000 лк. Продолжительность каждого пассажа составляла 8 недель.

Исследование морфологии полученных регенерантов проводили с помощью стереомикроскопа Stemi 200 (C.Zeiss, Германия) и программы визуализации изображения Zoombrauser. Пути морфогенеза и локализацию его начальных этапов в тканях экспланта определяли с помощью гистологического анализа.

При помещении побега на питательную среду для размножения в зоне среза через 4-5 недель культивирования формировалась каллусная ткань светло-желтого цвета, которая активно росла одновременно с ростом и развитием первичного побега.

Через 6 недель наблюдали развитие боковых побегов из пазушных меристем первичного побега. Одновременно с этим в каллусе формировались небольшие плотные округлые структуры, из которых затем развивались адвентивные побеги. Мультипликация побегов приводила к тому, что через 8 недель регенерант представлял собой пучок побегов разной длины, возраста и стадий развития.

Таким образом, морфогенез побегов бобовника анагировидного в культуре *in vitro* осуществлялся посредством вегетативного геммогенеза.

Микроскопический анализ продольных срезов регенерантов на среде содержащий 0,5 мг/л БАП показал, что через 4 недели культивирования появилась гистологическая неоднородность каллуса. Верхняя часть его состояла из недифференцированных клеток. Центральную область занимала разросшаяся в зоне среза базальная часть побега. Она состояла из паренхимных клеток сердцевины и проводящих пучков.

Форма и анатомическое строение гипертрофированной части побега свидетельствуют о том, что разрастание могло быть результатом пролиферативной активности как клеток камбия, так и клеток феллогена, перимедуллярной зоны сердцевины и лучевой паренхимы. Нижняя часть каллусной подушки была представлена двумя слоями клеток:

темноокрашенными клетками феллемы и светлоокрашенными клетками феллодермы.

На поперечных срезах каллусной ткани в зоне формирования адвентивного побега отчетливо видна связь его проводящих пучков с проводящими пучками первичного побега.

Гистологическое исследование регенерантов показало, что через 6-7 недель культивирования базальная часть первичного побега продолжает разрастаться за счет увеличения объема формирующихся проводящих пучков. Через 7-8 недель культивирования на проводящих пучках формируются глобулярные структуры. Они представляют собой очаги повышенной пролиферативной активности, где дифференцируются апикальные меристемы, дающие начало адвентивным побегам.

Через 3-4 месяца культивирования количество зон повышенной пролиферативной активности, способных дать начало адвентивным побегам, продолжает возрастать и достигает нескольких десятков, что свидетельствует о повышении морфогенетического потенциала культур.

Гистологический анализ убедительно показал, что адвентивные побеги, развившиеся из каллуса, связаны общей проводящей системой с первичным побегом. Это может свидетельствовать о генетическом соответствии исходному материалу не только боковых (пазушных) побегов, но и адвентивных побегов, которые формируются из каллуса. Таким образом, использование адвентивного гомогенеза в целях клонального микроразмножения бобвника анагировидного позволит получить большее количество побегов, пригодных для дальнейшего укоренения, что значительно увеличит эффективность разработанной ранее технологии.

На среде, содержащей 2 мг/л БАП, также наблюдалось разрастание побега в зоне среза и дифференциация проводящих пучков в каллусной ткани. Однако в отличие от первого варианта рост проводящих пучков проходил в основном в вертикальном направлении (снизу-вверх). Через 5 недель культивирования внутренняя часть каллуса представляла собой

сложную систему из проводящих пучков. На них происходила дифференциация очагов вторичной дифференциации. Через 7 недель в верхней части каллуса наблюдалось формирование адвентивных побегов, которые были связаны с первичным побегом общей проводящей системой.

На среде, содержащей 4 мг/л БАП, первые этапы формирования каллуса и дифференциации тканей в нем происходили сходно с предыдущими вариантами. Однако на 6 неделе культивирования в верхней части каллуса появлялись очаги меристематической активности за счет деления самих каллусных клеток. Из них развивались автономные не связанные с первичным эксплантом адвентивные побеги.

**Заключение.** Проведенный гистологический анализ морфогенеза в культуре *in vitro* побегов бобовника анагировидного свидетельствует о том, что содержание БАП в среде для размножения оказывает значительное влияние на пути морфогенеза. На питательной среде, дополненной 0,5 мг/л БАП пролиферативная активность клеток феллогена, камбия, перимедуллярной зоны сердцевины, клеток лучевой паренхимы приводила к формированию каллусной подушки, нижняя часть которой подвергалась опробковению за счет дифференциации клеток феллемы. В каллусе происходила инициация проводящих пучков, перемежающихся клетками склеренхимы, где присутствовали волокна, склереиды и промежуточные формы между ними. На них образовывались очаги с повышенной пролиферативной активностью, где дифференцировались апикальные меристемы, дающие начало адвентивным побегам. Проводящие пучки адвентивных побегов и первичного побега образовывали единую систему. Все это свидетельствует о том, что формирование адвентивных побегов является результатом меристематической активности клеток исходного экспланта. Данный путь морфогенеза позволяет получать генетически стабильные клоны.

При концентрации в среде БАП 2 мг/л адвентивные побеги также являются результатом пролиферативной активности меристем первичного

побега и связаны с ним общей проводящей системой. Увеличение концентрации БАП в среде до 4 мг/л адвентивные побеги развиваются не только за счет пролиферативной активности меристем первичного побега, но и за счет пролиферативной активности клеток каллусной ткани, что не гарантирует их генетического соответствия с исходным материалом из-за свойственной каллусным клеткам самоклональной изменчивости.

Исходя из полученных результатов, можно констатировать, что для повышения эффективности метода клонального микроразмножения бобовника анагировидного использование адвентивных побегов допустимо только при концентрациях БАП в среде для размножения 0,5 и 2 мг/л.

Размножение на среде, содержащей 4 мг/л БАП можно рекомендовать для селекции бобовника анагировидного с целью получения новых форм.

#### **Выводы:**

1. В условиях Нижнего Поволжья генеративные структуры *L. anagyroides* развиваются без отклонений от нормы. Однако большая часть семязачатков остается не оплодотворенной, в результате чего реальная семенная продуктивность ( $1.5 \pm 0.1$  семян на 1 боб) составляет только 30% от потенциальной продуктивности ( $4.9 \pm 0.1$  семязачатков на одну завязь). Завязавшиеся семена содержат нормально развитые структуры, но в полевых условиях не всходят вследствие глубокого физического покоя.
2. Морфогенез побегов бобовника анагировидного в культуре *in vitro* осуществлялся посредством вегетативного геммогенеза. При культивировании первичного экспланта развиваются первичный побег, пазушные и адвентивные побеги.
3. Первичные и пазушные побеги на питательных средах, дополненных 0,5 и 2 мг/л БАП, за счет активизации уже существующих меристем экспланта. Развитие адвентивных побегов происходит следующим образом. Пролиферативная активность клеток меристем первичного побега приводит к образованию каллусной подушки. В формирующихся внутри каллуса проводящих пучках образуются зоны повышенной

пролиферативной активности, которые дают начало апикальным меристемам адвентивных побегов. Длительное культивирование экспланта (3-4 месяца) увеличивает его морфогенетический потенциал за счет формирования множественных зон повышенной пролиферативной активности.

4. Увеличение в питательной среде концентрации БАП до 4 мг/л приводит к формированию дополнительных очагов меристематической активности в калусных тканях, из которых развиваются адвентивные побеги, не связанные проводящей системой с первичным побегом. Данный путь морфогенеза не гарантирует генетическую идентичность всех вновь развившихся побегов.
5. Для повышения эффективности метода клонального микроразмножения бобовника анагировидного использование адвентивных побегов допустимо только при концентрациях в питательной среде 0,5 и 2 мг/л БАП. Клональное микроразмножение на питательной среде, содержащей 4 мг/л БАП можно рекомендовать для селекции бобовника анагировидного с целью получения новых форм.

