

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

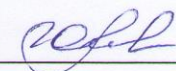
АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

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.

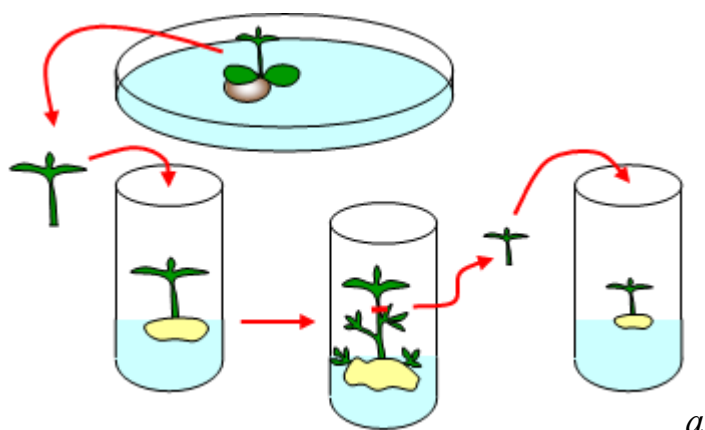
Проведенное исследование показало, что в условиях интродукции генеративные органы и структуры *L. anagyroides* развивались без каких-либо отклонений от нормы. Цветки мотылькового типа, собраны в поникающие многоцветковые кисти длиной 18-22 см. Тычинок десять, они сросшиеся. Пестик с шиловидным столбиком и головчатым рыльцем, завязь на ножке. В завязях формируется в среднем 4.9 ± 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 ± 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 ± 0.1 семян на 1 боб) составила лишь около 30% от потенциальной продуктивности (4.9 ± 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 ± 0.1 семян на 1 боб) составляет только 30% от потенциальной продуктивности (4.9 ± 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.

