

MATERIÁLY IV MEZINÁRODNÍ
VĚDECKO-PRAKTICKÁ KONFERENCE

MATERIÁLY

V MEZINÁRODNÍ VĚDECKO-PRAKTICKÁ KONFERENCE

«AKTUÁLNÍ VYMOŽENOSTI
VĚDY – 2009»



MATERIÁLY IV MEZINÁRODNÍ
VĚDECKO-PRAKTICKÁ KONFERENCE

Díl 11
Lekarství
Biologické vědy
Chemie a chemická
technologie
Ekologie
Zeměpis a geologie
Zemědělství



Praha
Publishing House
«Education and Science» s.r.o.



LOGICKÁ INŽINERIE A BIO – INFORMATIKA

Бугаенко Л.А.

РВУЗ «Крымский инженерно – педагогический университет»

Манушкина Т.Н.

Николаевский государственный аграрный университет

ОСОБЕННОСТИ МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ МЕРИСТЕМ ЛАВАНДЫ IN VITRO

В настоящее время одним из направлений биотехнологии является культура in vitro клеток, тканей и органов растений, которая широко используется в науке для создания экспериментальных биологических систем, а также в селекционной и растениеводческой практике.

Лаванда является одной из приоритетных культур в эфиромасличной отрасли Украины. Эфирное масло широко используется в парфюмерно-косметической, фармацевтической и пищевой промышленности. Выращивание лаванды и получение эфирного масла в нашей стране сосредоточено в Крыму (99,7 %). В условиях производства планируется до 2015 года увеличить площади под лавандой до 10 тыс. га, поскольку эта культура является прибыльной (чистая прибыль с 1 га составляет до 5 тыс. грн., рентабельность – 290 %). Для достижения указанных площадей необходимо ежегодно закладывать 600-700 га лаванды, что требует выращивания 18-21 млн. саженцев.

Наиболее эффективным для решения поставленных задач семеноводства может быть метод клонального микроразмножения на основе культуры изолированных меристем, который обеспечивает генетическую идентичность растений – регенерантов исходным формам и высокие коэффициенты размножения, оздоровление посадочного материала от грибной и бактериальной инфекции, а также освобождение от вирусов при сочетании с методами термотерапии и хемотерапии.

В литературе выявлено довольно ограниченное количество работ, связанных с биотехнологическими исследованиями рода *Lavandula* L. При этом, большая часть публикаций посвящена изучению процессов калусо- и морфогенеза, а также накоплению вторичных метаболитов в клеточных культурах in vitro лаванды. Ограниченное количество литературных данных касается и клонального микроразмножения лаванды на основе культуры изолированных меристем, которые в основном связаны с гормональной регуляцией морфогенеза апикальных меристем лаванды in vitro.

Цель данной работы – изучить теоретические основы микроразмножения и разработать биотехнологическую схему клонального микроразмножения лаванды в культуре in vitro.

Материалом для проведения исследований служили растения лаванды *Lavandula angustifolia* Mill, сортов Синева, Степная и перспективных селекционных образцов 337-9 и 310-17. В работе использовали общепринятые методы исследований по культуре тканей растений. В качестве эксплантов использовали апикальные меристемы высотой 0,2-1,0 мм, которые вычленили из верхушечных и пазушных почек стебля однолетних растений. Для культивирования изолированных меристем в качестве базовой питательной среды использовали среду Мурасиге и Скуга (МС).

На каждом из этапов микроразмножения изучали влияние комплекса эндогенных и экзогенных факторов на процессы морфогенеза лаванды в культуре *in vitro*, проводили модификацию гормонального состава питательных сред, дополняя их кинетином, бензиламинопурином (БАП), гибберелловой кислотой (ГК), нафтилукусной кислотой (НУК), индолилукусной кислотой (ИУК), индолилмасляной кислотой (ИМК). Экспланты культивировали в культуральной комнате при температуре 25-26 °С, освещении – 2-3 клк, относительной влажности воздуха – 60-70%

В результате проведенных исследований установлено, что для введения в культуру *in vitro* в качестве экспланта целесообразно использовать апикальные меристемы размером 0,2-1,0 мм с одной-двумя парами листовых примордиев. Известно, что одним из главных условий успешного культивирования растительных тканей *in vitro* является стерилизация эксплантов. В наших экспериментах стерилизацию растительного материала проводили путем последовательной обработки фрагментов побегов в 70 %-ном этаноле (40сек.) и 50%-ном растворе препарата «Брадофен» (12 мин.), а затем трижды промывали в стерильной дистиллированной воде. Указанный способ стерилизации обеспечивал выход 92,5-100,0% стерильных меристем. Наилучшими сроками изолирования меристем являются месяцы апрель и октябрь, которые календарно отвечают фазам весеннего и осеннего отрастания у донорных растений лаванды. При введении меристем в культуру *in vitro* в данные сроки происходило более интенсивное развитие микропобегов по сравнению с зимним и летним введением, при этом частота регенерации меристем была высокой во все сроки – 90,0-100,0 %.

Установлено, что для инициации развития изолированных меристем лаванды оптимальной является агаризованная питательная среда МС, дополненная кинетином (1,0 мг/л) и ГК (1,0 мг/л), на которой у всех изученных генотипов частота регенерации составляла 90,0-100,0 %. Особенностью морфогенеза меристем лаванды в культуре *in vitro* было то, что уже на первом этапе клонального микроразмножения происходило множественное побегообразование, в основном, за счет образования адвентивных побегов. Отмечены различия между исследуемыми генотипами по высоте основного побега и количеству дополнительных побегов на один эксплант, которые обуславливали разные коэффициенты размножения: у сорта Синева – 1:12,45, у сорта – Степная 1:10,06, у образца 337-9-1:8,55, у образца 310-17-1:7,18.

На этапе собственно микроразмножения в качестве экспланта использовали микрочеренки, которые получали при разделении основного побега меристемных растений на фрагменты длиной 4-8 мм с одной парой листьев или при отделении дополнительных побегов. Наиболее оптимальное развитие микропобегов лаванды было отмечено также на среде МС, дополненной кинетином (1,0 мг/л) и ГК (1,0 мг/л) – частота регенерации составила 85,7-100,0 %. На указанном этапе клонального микроразмножения происходил интенсивный рост основных побегов из латеральных почек микрочеренка, частота образования дополнительных побегов составляла 68,4%, в среднем образовывалось 2-4 боковых побега, а количество адвентивных побегов не превышало 4,1-7,9 % от их общего количества. Поэтому микроразмножение осуществлялось, в основном, за счет микрочеренкования основных побегов. Установлено, что генотипические особенности сортов и образцов обуславливали различную интенсивность ростовых процессов и, как следствие, разные коэффициенты размножения: у сорта Синева – 1:11,12, у сорта Степная – 1:10,42, у образца 337-9 – 1:11,83, у образца 310-17 – 1:6,72.

Проводилось также изучение особенностей развития микрорастений лаванды в течение десяти пассажей, поскольку уровень стабильности регенерационных процессов на протяжении нескольких циклов микрочеренкования является одним из важных факторов, от которых зависит эффективность клонального микроразмножения. Было показано, что эффективность размножения сохраняется на стабильном уровне у сорта Синева и образца 337-9 до 8-го пассажа (1:7,77-12,45 и 1:7,60-11,85 соответственно), у сорта Степная – до 7-го пассажа (1:6,10-11,81), у образца 310-17 – до 6-го пассажа (1:6,17-8,37).

В среднем за год можно провести шесть пассажей, за которые суммарный выход мериклонов из одного экспланта составляет у сорта Синева около 23 млн. шт., у сорта Степная – 6 млн. шт., у образца 337-9 – 9 млн. шт., у образца 310-17-1 млн. шт.

На этапе укоренения *in vitro* в качестве экспланта использовали верхушки микропобегов или микрочеренки длиной 4-8 мм с одной парой листьев. Оптимальной для укоренения определена питательная среда $\frac{1}{2}$ МС, дополненная ИМК (0,5 мг/л) и ИУК (0,5 мг/л), на которой частота укоренения составила 85,0-100,0 % и формировалось 3-5 корней длиной 32-60 см.

Для адаптации к условиям *in vivo* отбирали микрорастения с хорошо развитой корневой системой и высаживали в горшочки объемом 200 мл со стерильным субстратом. Горшочки помещали под пленочное укрытие и культивировали при температуре 18-20°C. Подкормку минеральными удобрениями (раствором Кнопа) проводили сразу после посадки растений в субстрат и через 14 дней. Наивысшая приживаемость микрорастений всех генотипов – 95,0-100,0 % обеспечивалась на субстрате, состоящем из торфа, перлита, почвы, песка в соотношении 2:1:1:1. Определено, что для адаптации достаточно периода 14 дней, за которые формируется 2-3 пары листьев. После периода адаптации пленочное

укрытие снимали и растения культивировали в обычных условиях еще 46 дней, а затем высадили в качестве маточных растений в условия закрытого грунта.

Таким образом, в результате проведенных исследований изучены особенности морфогенеза в культуре изолированных апикальных меристем *in vitro* и разработана биотехнологическая схема клонового микроразмножения и оздоровления растений лаванды.