

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет
имени К. И. Сатпаева

Институт химических и биологических технологий

Кафедра «Биотехнология»

Дмитриева Карина Анатольевна

Введение хризантем *Chrysantemum L.* в культуру клеток для получения
растений-регенерантов

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

Специальность 5В070100 – «Биотехнология»

Алматы 2019

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет
имени К. И. Сатпаева
Институт химических и биологических технологий
Кафедра «Биотехнология»



ДОПУЩЕН К ЗАЩИТЕ

Заведующий кафедрой «Биотехнология»

PhD, профессор

З.К. Туйебахова

2019 г.

05

ДИПЛОМНАЯ РАБОТА

На тему: " Введение хризантем *Chrysantemum L.* в культуру клеток для
получения растений-регенерантов"

по специальности 5В070100 – «Биотехнология»

Выполнила

Дмитриева К. А.

Научный руководитель
к.б.н, асоц. профессор, зав.
лабораторией биотехнологии
растений ИМББ им. М.А.
Айтхожина КН МОН РК

Малахова Н.П.
"29" 04 2019 г.

Алматы 2019

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет
имени К. И. Сатпаева

Институт химических и биологических технологий

Кафедра «Биотехнология»



УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой «Биотехнология»

PhD, профессор

З.К. Туйебахова

06 мая 2019 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение дипломной работы

Обучающейся Дмитриевой Карине Анатольевне

Тема: Введение хризантем *Chrysantemum L.* в культуру клеток для получения растений-регенерантов

Утверждена: приказом проректора по академической работе № 1163-б. от "16" октября 2018 года

Срок сдачи законченного проекта « 29 » 04 2019 года.

Исходные данные к дипломному проекту: Исследования проведены на базе лаборатории биоинженерии растений РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» КН МОН РК.

Краткое содержание дипломной работы:

а) Подбор растительных эксплантов из целых растений голландских и местных сортов хризантем

б) Подбор оптимальных условий для стерилизации эксплантов.

в) Подбор оптимального состава питательной среды для введения растений в культуру *in vitro*

г) Введение в культуру растений хризантем *Chrysantemum L.*

д) Получение растений-регенерантов

Перечень графического материала: представлены 28 слайдов презентации работы.


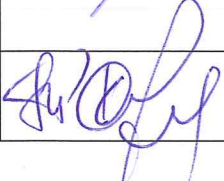
Рекомендуемая основная литература состоит из 22 наименований.

ГРАФИК
подготовки дипломной работы

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю и консультантам	Примечание
1. Технология микрклонального размножения и оборудование	05.01.19	
2. Ботаническая характеристика лилий	12.01.19	
3. Подбор оптимальных условий стерилизации эксплантов	15.01.19	
4. Подбор оптимальных питательных сред	10.03.19	
5. Особенности культивирования в условиях in vitro	01.05.19	

Подписи

консультантов и нормоконтролера на законченную дипломную работу с указанием относящихся к ним разделов работы

Наименования разделов	Консультанты, И.О.Ф. (уч. степень, звание)	Дата подписания	Подпись
Разделы 1-5 дипломной работы	Н. П. Малахова, к.б.н., ассоц. профессор	29.04.19	
Нормоконтролер	Тұрымбаева Қ. Қ. магистр наук	29.04.19	

Научный руководитель _____  Н. П. Малахова

Задание принял к исполнению обучающийся  К. А. Дмитриева

Дата _____ "29" 04 2019 г.

АННОТАЦИЯ

Проведена работа по введению в культуру *in vitro* растений хризантем (*Chrysanthemum L.*) двух голландских сортов Севан и Токио, и одного сорта местной селекции – сорта Инга. Подобраны и оптимизированы условия для введения в культуру *in vitro* различных типов эксплантов: листья, пазушные почки, цветочные лепестки. Проведено оздоровление растительного материала методами хемотерапии, с использованием различных химических агентов в различных вариантах. В качестве химических агентов были использованы: этиловый спирт 70%, «Твин-20», «Белизна», 3% раствор пероксида водорода (H_2O_2). Определен состав питательных сред, комбинаций фитогормонов и условий для введения в культуру, каллусообразования различных типов эксплантов. Подобраны условия для укоренения и регенерации растений – регенерантов, полученных из эксплантов пазушных почек.

АНДАТПА

Хризантема (*Chrysanthemum L.*) өсімдігінің екі голландық Севан, Токио және жергілікті селективті Инга сорттарын *in vitro* культурасына енгізу жұмыстары жүргізілді. Әр түрлі жапырақ, қолтық өркендерін, гүлдік қауыз экспланттарды *in vitro* культурасына енгізу жағдайлары таңдалынып және оңтайландырылды. Әр түрлі химиялық агенттерді қолданып өсімдік материалдарына хемотерапия әдісі арқылы сауықтыру жүргізілді. Химиялық агент ретінде: 70% этил спирті, «Твин-20», «Белизна», 3% сутек пероксиді (H_2O_2) қолданылды. Әр түрлі экспланттарды культурасына енгізу, каллус алу мақсатында фитогормондар қосылған қоректік орта құрамы анықталынды. Қолтық бүршіктен алынған өсімдік регенеранттарын тамырландыру жағдайы таңдалынды.

ABSTRACT

The work was done on inputting the *Chrysanthemum L.* of two hollands sorts “Sevan” and “Tokyo”, and also the sort “Inga” of the local selection into culture of *in vitro*. The conditions were chosen and optimized for inputting the different types of explants into *in vitro* culture: leaves, axillary buds, flower petals. The invigoration of the plant material was provided by chemotherapy method using different kinds of chemical agents in the various options. As the chemical agents were used ethanol 70%, “Twin 20”, “Belizna”, hydrogen peroxide 3% (H₂O₂). The composition of the nutrient medium, the compositions of phytohormons and the conditions of callus formation, on inputting into culture of the different explants were determined. The conditions for root induction and regeneration of the plants-regenerants received from the axillary buds explants were chosen.

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	9
1	Основная часть	10
1.1	Методы введения эксплантов в культуру <i>in vitro</i>	10
1.2	Микроклональное размножение растений	12
1.3	Биология и морфология растений хризантем	14
2	Результаты исследований и их обсуждение	17
2.1	Выбор экспланта	17
2.2	Выбор метода стерилизации	18
2.3	Подбор питательных сред для введения в культуру <i>in vitro</i>	21
2.3.1	Получение растений-регенерантов	21
2.3.2	Получение каллусных культур	22
2.4	Микроклональное размножение растений-регенерантов	24
	Заключение	27
	Перечень принятых сокращений	28
	Список использованной литературы	29

ВВЕДЕНИЕ

Хризантема (*Chrysanthemum L.*) – относится к роду однолетних и многолетних травянистых или полукустарниковых растений семейства Астровые или Сложноцветные. Эти декоративные цветы произрастают преимущественно в Азии и широко используются для озеленения городов [1]. Одним из преимуществ хризантем как декоративных культур, является их устойчивость к пониженным температурам воздуха, что обеспечивает возможность их высадки в начале весеннего сезона и долгое цветение, вплоть до конца ноября.

Большое разнообразие представителей этого рода растений в природе встречается в умеренных и субтропических областях Юго-Восточной части Азии (Китай и Япония) [2].

Имеющиеся в настоящее время гибридные садовые хризантемы по происхождению связаны с хризантемой мелкоцветной (*C.indicum*) и хризантемой шелковицелистной или крупноцветковой (*C. morifolium R.*). Кроме того в процессе селекции были использованы и другие виды [2].

В нашей стране, большинство культивируемых видов хризантем являются голландскими. Импортируемые в РК сорта этих растений часто не районированы, не имеют устойчивости к местным видам фитопатогенов, что приводит к значительным потерям растительного материала вследствие его заражения грибными и вирусными заболеваниями. Одним из подходов к решению данной проблемы может являться применение биотехнологических методов оздоровления, культивирования и размножения растений хризантем.

Цель данной работы заключалась в подборе оптимальных методов для введения в культуру клеток, оздоровлении и размножении голландских и местных сортов хризантем.

Задачами данной работы являются:

- Подбор растительных эксплантов из целых растений голландских и местных сортов хризантем
- Подобрать оптимальные условия для стерилизации эксплантов.
- Подбор оптимального состава питательной среды для введения растений в культуру *in vitro*
- Введение в культуру растений хризантем *Chrysanthemum L.*
- Получение растений-регенерантов

1 Основная часть

1.1 Методы введения эксплантов в культуру *in vitro*

Первые попытки по выращиванию изолированных частей растений в искусственных условиях были предприняты еще в конце XIX в. Кусочки изолированных тканей растений были культивированы на растворе сахарозы немецкими учеными Хаберландтом, Рехингером и Фехтингом. Хотя какое-то время экспланты оставались живыми, получить растущую культуру не удалось [3].

В последующее время неоднократно осуществлялись попытки выращивания отдельных частей растений в стеклянных колбах или чашках на искусственных питательных средах, то есть *in vitro*. Но возникали проблемы с подбором питательных сред, пригодных для выращивания изолированных тканей растений. И только в 1932-1934 годах французский ученый Готре смог ввести в культуру камбиальные ткани древесных растений и паренхиму мясистых корней моркови. А американскому ученому Уайту удалось разработать методы длительного выращивания в пересадочной культуре корневой меристемы. С этого момента началось развитие методов культуры тканей растений. С тех пор, в течении следующих двадцати лет последователи этих ученых смогли ввести в культуру *in vitro* десятки видов растений [3].

В настоящее время наиболее перспективные направления биотехнологии связаны с изучением биологии культивируемых клеток на молекулярном уровне. Большое внимание исследователей в области биотехнологии уделяется изучению генетической изменчивости и механизмам регуляции морфогенеза [3].

Выращивание изолированных клеток, тканей и органов растений на искусственной питательной среде в асептических условиях принято называть культурой клеток растений [4].

Для обеспечения асептических условий изолирование тканей из целых растений и их высадку на питательные среды осуществляют в ламинарном боксе. Фрагмент стерильной растительной ткани помещают в чашку Петри или пробирку на питательную среду. Далее в ткани начинается процесс деления клеток. Увеличиваясь, клеточная масса, образует каллус [5]. Каллус или каллусная ткань представляет собой неорганизованную массу клеток возникших в результате процесса пролиферации. В свою очередь пролиферация это процесс новообразования клеток путем деления [3].

По мере роста каллусной ткани происходит истощение элементов питательной среды. Поэтому для поддержания его роста каллус периодически переносят на новую питательную среду. Такой каллус, который постоянно находится в культуре *in vitro* называется пассируемым [5].

Процесс получения и дальнейшего культивирования каллуса требует строго асептических условий. Для этого изолированные части растений, то есть

экспланты, стерилизуют. В качестве стерилизующих веществ обычно используют растворы содержащие активный хлор или ртуть, совместно с детергентами для лучшего смачивания [5].

Кроме того, также проводят стерилизацию питательных сред и посуды под горячим паром в автоклавах. Вещества, не выдерживающие высоких температур, стерилизуют путем фильтрации через фильтры, с размером пор не больше 0,2 мкм.

При культивировании эксплантов растений особое внимание уделяется составу питательных сред. В состав питательных сред включены элементы необходимые для жизнедеятельности растений: магний, фосфор, сера, калий, кальций, азот. Кроме того, компонентами питательных сред являются микроэлементы: железо, бор, медь, марганец, цинк, кобальт и другие. Также в питательные среды добавляют углеводы, так как культивируемые клетки растений не способны к фотосинтезу. В качестве углеводов обычно используют глюкозу или сахарозу. Помимо этого для успешного культивирования клеточных культур, необходимо присутствие в средах витаминов группы В, таких как: рибофлавин (В₂), пиридоксин (В₆), тиамин (В₁) [5]. Наибольшую важность среди компонентов питательных сред представляют природные фитогормоны – 3-индолилуксусная кислота (ИУК), индолил-3-масляная кислота (ИМК), зеатин. А также синтетические регуляторы с гормональной активностью: ауксиновой – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-D), нафтилуксусная кислота (НУК), цитокининовой – кинетин, 6-бензиламиноптерин (6-БАП) и другие [5].

Существуют различные варианты стандартных питательных сред. Наиболее универсальной питательной средой для культивирования клеток растений является среда Мурасиге-Скуга. Однако, существуют и другие питательные среды: среда Нича-Нича, которая используется для индукции андрогенеза в культуре пыльников, и среда Гамборга-Эвелега для культивирования тканей бобовых. Известная среда Уайта обычно применяется для укоренения и дальнейшего выращивания побегов после регенерации растений.

В настоящее время многими компаниями создаются готовые питательные среды Мурасиге-Скуга, Уайта, Хильдебрандта. Они имеют вид сухих порошков, куда входят все необходимые элементы, кроме фитогормонов, углеводов и уплотнителя среды. Однако, при работе с новым объектом, исследователи могут менять концентрацию и набор органических компонентов [3].

Для нормального роста и развития растений *in vitro* как на твердых, так и на жидких питательных средах особо важное значение имеет рН среды. Значения рН оказывают влияние на усваиваемость компонентов питательной среды, и в первую очередь витаминов и фитогормонов. При низких значениях рН желатинизируется агар. Оптимальное значение рН среды для роста клеток растений находится чаще всего в интервале 5,6 - 5,8. Значения рН обычно регулируется путем добавления в среду щелочей и кислот [3].

Клетки растений очень чувствительны к физическим условиям культивирования. Так, температура влияет на процессы метаболизма растений. Существует общепринятое представление о том, что температура культивирования клеток и тканей растений должна находиться в пределах 25-27°C. Однако, как выяснилось на практике, для некоторых видов растений существуют исключения. Поэтому очень важным моментом при работе с растениями является знание биологии данного вида растений.

Таким образом, во всем мире для решения вопросов связанных с биологией растений широко применяют метод культуры клеток, тканей и органов.

1.2 Микрклональное размножение растений

Существует два способа размножения для семенных растений: семенной и вегетативный. Каждый из этих способов имеет как плюсы, так и минусы. Одним из недостатков семенного способа размножения является генетическая неоднородность посадочного материала, а также длительное продолжение ювенильного периода. Эти недостатки могут быть решены с помощью вегетативного размножения. С помощью этого способа можно получить генетически однородный посадочный материал и значительно сократить длительность ювенильного периода [5].

Однако вегетативное размножение растений не может решить всех вопросов. Причинами этого являются:

- Из-за возможности накопления инфекции не всегда удается получить стандартный посадочный материал;
- Древесные растения старше 10-15 лет трудно размножать черенкованием, почти невозможно;
- Некоторые древесные породы не могут размножаться вегетативным способом с нужной эффективностью. К таким растениям относятся ель, сосна, некоторые орехоплодные, дуб;
- Несовершенство имеющихся технологий с помощью которых возможно получать генетически однородный материал в течении всего года;
- Процесс размножения взрослых древесных растений с помощью прививок является сложным и достаточно трудоемким [3].

С помощью метода культуры клеток, тканей и органов растений удалось разработать совершенно новый способ вегетативного размножения – микрклональное размножение. Микрклональное размножение – это получение растений, неполовым путем в условиях *in vitro*, генетически сходных с материнским растением. Этот процесс осуществляется благодаря уникальному свойству растительной клетки – тотипотентности. Тотипотентность – это способность клетки давать начало новому организму под влиянием определенных факторов [5].

Метод микроклонального размножения имеет существенные преимущества:

- При микроклональном размножении обычно используют меристемную культуру, что способствует освобождению посадочного материала от вирусов;
- Можно получить генетически однородный посадочный материал;
- Время перехода растений от ювенильной фазы к репродуктивной сокращается;
- Возможность экономии площадей необходимых для выращивания посадочного материала;
- Проводить работу можно в течение всего года;
- Возможность размножать растения, которые трудно размножаются традиционными способами;
- Сокращается время селекционного процесса;
- Коэффициент размножения растений достаточно высок. Например, для кустарниковых древесных – 10^4 - 10^5 , а для хвойных – 10^4 .

Микроклональное размножение состоит из 4 этапов. На первом этапе необходимо правильно выбрать растение-донор, подобрать эксплант и получить стерильную хорошо растущую культуру.

Важным моментом на первом этапе является подбор экспланта. Необходимо, чтобы эксплант обладал хорошей выживаемостью и тотипотентностью. К таким эксплантам обычно относят меристематические ткани – кончики корней, верхушки стебля и пазушные почки [6].

У некоторых древесных растений наблюдается накопление внутренней инфекции. Поэтому в питательные среды обычно добавляют антибиотик. Обычно на первом этапе используют питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением различных биологически активных веществ и регуляторов роста – фитогормонов. Некоторые растения могут выделять в питательную среду вещества, которые ингибируют рост культуры. В таких случаях в питательную среду добавляют антиоксиданты, например аскорбиновую кислоту или древесный активированный уголь в качестве адсорбента. Первый этап может проходить с продолжительностью 1-2 месяца [3].

На втором этапе осуществляется сам процесс микроразмножения. Главной задачей на этом этапе является получение максимального количества микроклонов. На этом этапе, так же как и на первом, используют питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением различных концентраций регуляторов роста. Из ауксинов обычно используют ИУК или НУК, а из цитокининов 6-БАП [5].

Особенно трудоемкий процесс микроклонального размножения осуществляется на третьем и четвертом этапе, от которых зависит успех всего процесса. На этих этапах производится укоренение побегов, адаптация их к почвенным условиям и условиям окружающей среды, а также высадка в поле. На третьем этапе обычно меняется состав питательной среды. Количество

минеральных солей входящих в состав питательной среды МС уменьшают, также уменьшают содержание углеводов и полностью исключают цитокинины. Из ауксинов, для индукции корнеобразования, обычно применяют ИУК, НУК или ИМК [5].

На четвертом этапе осуществляют пересадку растений-регенерантов в субстрат. Этот этап является завершающим. Лучшим временем для этого этапа является весна или лето. Полученные растения-регенеранты с хорошо развитой корневой системой вынимают из пробирок или колб, корни очищают от агара и переносят в стерильный субстрат. Обычно в качестве субстрата используют торф, перлит, песок, дерновую почву в различных комбинациях и соотношениях [5].

Посаженные растения переносят в теплицы с освещенностью 3000-5000 лк., влажностью 70-90% и температурой 20-22⁰С.

По прошествии месяца растения подкармливают минеральными удобрениями или комплексом минеральных солей.

1.3 Биология и морфология растений хризантем

Хризантема (*Chrysanthemum L.*) – широко распространенная декоративная травянистая культура. Род *Chrysanthemum L.* относится к семейству сложноцветных или астровых (*Asteraceae, Compositae*). Представители данного рода растений в природе широко распространены в умеренных и субтропических областях Юго-Восточной части Азии. В частности, к районам широкого распространения хризантем можно отнести Китай и Японию [7].

Родовое название хризантемы происходит от греческого языка и состоит из двух слов – «*chrysos*», что значит золотой и «*anthesis*» - цветок. Впервые оно было предложено в 1753 году Карлом Линнеем [7].

Как декоративное растение хризантема является одной из ведущих культур в промышленном цветоводстве. Во-первых, хризантемы обладают своеобразной декоративностью. Во-вторых, имеют некоторые биологические особенности, которые выделяют ее из всех других культур. Хризантема - растение короткого дня, в результате чего, регулируя длину дня, эти растения можно выращивать круглый год, при этом получая по три урожая в год с одной и той же площади [8].

Хризантемы имеют утолщенное, более или менее разветвленное корневище и столоны. Стебли прямостоячие, их высота может достигать 25-120 см. Иногда стебли могут быть сильно разветвленные. Листья имеют очередное расположение и значительно варьируют по форме. Верхняя поверхность листьев ярко-зеленая, имеет небольшое опушение, нижняя сторона листьев - серовато-зеленая [8].

Соцветие махровой хризантемы имеет язычковые цветки. А у полумахровой язычковые цветки занимают обычно пять крайних рядов,

остальные цветки — трубчатые. У немахровой хризантемы только 1-4 крайних ряда — язычковые цветки, а весь диск состоит из трубчатых цветков [9].

В зависимости от размера соцветий сорта хризантемы принято делить на мелкоцветковые и крупноцветковые. У мелкоцветковых сортов диаметр соцветий обычно составляет порядка 2-9 сантиметров. Таких соцветий на кусте может быть от 10 до 20, они собраны в щитковидную метелку или рыхлый сложный щиток. У крупноцветковых сортов обычно имеется от одного до восьми соцветий на кусте, диаметр которых достигает 10-25 сантиметров [9].

Имеющиеся в настоящее время садовые хризантемы являются гибридами хризантемы мелкоцветной (*C. indicum* L.) и хризантемы шелковицелистной или крупноцветковой (*C. morifolium* R.) [9].

Впервые селекцией садовых хризантем стали заниматься в древнем Китае. В прошлом столетии началось распространение хризантем в районах, где климатические условия способствуют созреванию семян у хризантем. К таким районам относятся юг Франции, юг Англии, Калифорния (США), Япония. Именно селекционерами этих стран были выведены большинство современных сортов. В настоящее время усовершенствованные методы селекции позволяют выращивать хризантемы и в более северных районах [12].

Хризантемы являются светолюбивыми растениями. В условиях хорошей солнечной освещенности они хорошо развиваются с самого начала вегетации и до поры цветения. Длительность и интенсивность света имеет важное значение при выращивании хризантем, так как влияет на правильное развитие побегов. При его недостатке побеги вытягиваются и образуются неправильные соцветия в виде трубчатых цветков с желтым диском на слабых цветоносах. Небольшое затенение допустимо в первую неделю после пересадки, а также в период укоренения черенков [9].

Также большое влияние на интенсивность развития хризантем влияет температура. При высадке хризантем в грунт оптимальная температура – 17-18⁰С, а в период вегетации 15-17⁰С. В период вегетации в течение первого месяца температура не должна быть ниже 15⁰С. В противном случае нарушается рост и закладка бутонов [10].

Хризантемы также являются влаголюбивыми растениями. При своевременном и достаточно обильном поливе, в период вегетативного роста и в начале развития цветков, хризантемы быстро растут и формируют большую листовую поверхность [10].

Необходимость классификации хризантем возникла в результате появления большого морфологического разнообразия сортов. В 1104 году в Китае была сделана первая попытка классифицировать хризантемы по сортам. Именно в этом году была написана книга «Цзюйцу» - Перечень наименований хризантем. В этой книге было описано 36 сортов хризантем. Некоторые описанные в этой книге сорта культивируются до сих пор, например сорт «Фотоцзюй» [11].

В Юго-Восточной Азии в настоящее время принято несколько классификаций, включающих китайские и японские сорта. В основе

классификации этих сортов лежат такие признаки, как форма венчика язычковых цветков, а также размер и форма соцветий. В настоящее время в Китае выращивается около 3000 сортов этих растений [11].

Существует также японская классификация императорского парка «Синдзюку», согласно которой хризантемы подразделяют на дикорастущие и культурные. Культурные подразделяются на декоративные и пищевые, которые используют для салатов. Декоративные, в свою очередь, классифицируют по времени цветения на летние, осенние и зимние. Наиболее широко распространена и многочисленна группа осеннего цветения. В зависимости от размера соцветий растения этой группы подразделяют на мелкоцветковые, средние и крупноцветковые [11].

Принятая в Европе и США классификация Скота основана на различиях форм соцветий, размеров, направлении и формы венчиков язычковых цветков. Эта классификация включает в себя 15 классов хризантем [11].

Классификация основанная на морфолого-систематическом принципе была разработана в СССР ботаником В. С. Ябровой-Колаковской в Сухумском ботаническом саду. Эта классификация широко применялась во время научно-исследовательских работ по интродукции и селекции [11].

В настоящее время благодаря длительной работе селекционеров разных стран имеется огромное число сортов хризантем, которые отличаются высотой куста, формой соцветий, их окраской и размером, а также сроками цветения. В каждой стране имеется своя специфика в работе селекционеров. Так, например, в Америке распространены сорта с анемоновидными соцветиями, в Японии и Китае - с пауковидными или лучевидными соцветиями, а в Германии и Англии - с шаровидными и полушаровидными. В Англии и Америке большинство цветов хризантем используются на срез, а во Франции хризантемы выращиваются в горшках [12].

Таким образом, подводя итог можно сказать, что хризантема имеет много преимуществ как декоративное растение используемое для озеленения и коммерческих целях.

2 Результаты исследований и их обсуждение

2.1 Выбор экспланта

На первом этапе выполнения экспериментальной части работы нами проведен выбор объекта исследований, а также выбор эксплантов из целых растений.

В данной работе были использованы хризантемы голландских сортов Севан и Токио, и сорт казахстанской селекции Инга.

Токио – относится к голландскому сорту хризантем. Данный сорт принадлежит к классу крупноцветковых, полумахровых хризантем (Рис.1а). Имеет тонкие и длинные лепестковые язычки, которые сворачиваются в трубочку и поэтому внешне похожи на иголки. Лепестковые Язычки часто закручиваются вверх. Высота цветка может достигать 120 сантиметров, а диаметр соцветия 12-14 сантиметров. Используется в основном для срезки [7].

Севан – также относится к голландским сортам хризантем. Имеет насыщенный цвет, чаще всего темно-фиолетовый (Рис. 1б). Высота стебля достигает 130 сантиметров, а диаметр цветка 13-16 сантиметров. Относится к классу крупноцветковых хризантем. Также используется для срезки [7].

Инга – сорт высокорослых хризантем, высота стебля которых достигает 30-50 сантиметров, а диаметр соцветия 10 сантиметров. По внешнему виду данный вид хризантемы напоминает ромашку с ярко выраженной сердцевинной желтого цвета (Рис. 1в). Широко используется для озеленения участков [7].



1 Рисунок - Сорта хризантем

а - хризантема сорта Токио

б - хризантема сорта Севан

в - хризантема сорта Инга

Важное значение имеет этап выбора эксплантов. Необходимо, чтобы клетки экспланта обладали хорошей скоростью роста, тотипотентностью и выживаемостью. Лучше всего использовать меристематические ткани [13].

В качестве растительных эксплантов для введения в культуру *in vitro* в исследовании были использованы междузлия, листовые пластинки и цветочные лепестки (Рис. 2) [14].



2 Рисунок - Изолированные из растений хризантем экспланты.

Было установлено, что наилучшим вариантом эксплантов для введения в культуру растений хризантем, являются междузлия с пазушными почками. Это объясняется наличием апикальной меристемы, клетки которой активно делятся.

2.2 Выбор метода стерилизации

При работе с культурой изолированных клеток и тканей необходимым условием является соблюдение строгой стерильности. Изолированные из растений экспланты могут быть подвержены заражению микроорганизмами. Обычно стерилизацию эксплантов проводят различными стерилизующими агентами, с последующим промыванием растительных частей стерильной водой для предотвращения повреждения клеток химическими агентами.

В данной работе нами было опробовано три варианта стерилизации эксплантов (Таблица 1.).

1 Таблица - Варианты стерилизации эксплантов

Вариант	Проточная вода	Этиловый спирт	Белизна	«Твин-20»	Перекись водорода 3%	Дистиллированная вода (x 4 кратно)
I	30 мин	3 мин	10мин (10%)	10мин	-	4мин
II	30 мин	3 мин	20мин (10%)	4мин	-	4мин
III	30 мин	-	7мин (5%)	-	15мин	4мин

В первом варианте стерилизации экспланты промывали под проточной водой в течение 30 минут, затем обрабатывали раствором «Белизны» 10% в сочетании с «Твин-20» 0,1% в течение 10 минут, этиловым спиртом в течение 3 минут, с последующим четырехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 5 минут.

Во втором варианте стерилизации экспланты промывали под проточной водой в течение 30 минут, затем обрабатывали этиловым спиртом 70% в течение 3 минут, 10% раствором «Белизны» в течение 20 минут, 0.1% «Твин-20», с последующим четырехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 4 минут.

В третьем варианте стерилизации экспланты промывали под проточной водой в течение 30 минут, затем обрабатывали 5% раствором «Белизна» в течение 7 минут, 3% перекисью водорода в течение 15 минут, с последующим четырехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 4 минут.

Для оценки каждого из вариантов стерилизации были использованы экспланты междоузлий, листовых пластинок, цветочных лепестков растений хризантем сорта Инга.

В эксперименте №1 было взято 13 междоузлий, 4 листовых пластинки и 10 цветочных лепестков. В эксперименте №2 было использовано 19 междоузлий, 10 листовых пластинок и 9 цветочных лепестков. В эксперименте №3 было взято 4 междоузлия, 11 цветочных лепестков и 9 листовых пластинок.

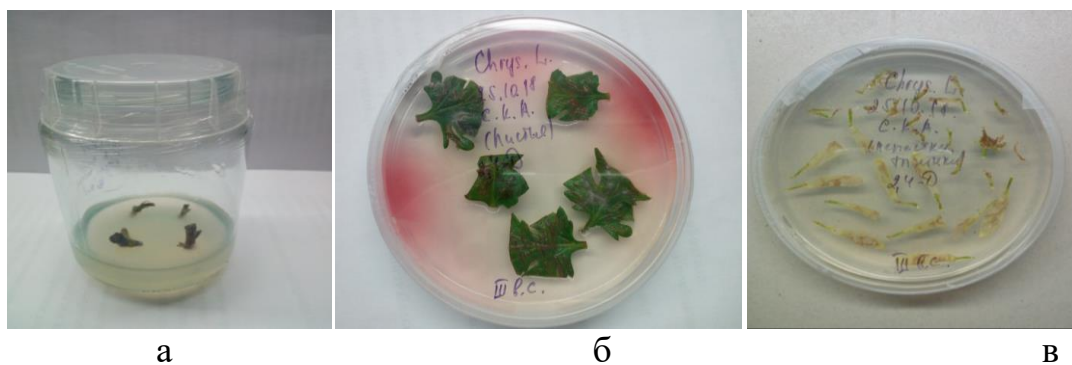
Как видно из представленных на рисунке 3-а результатов, при проведении стерилизации эксплантов междоузлий способом №1, все экспланты были поражены. Для других объектов - листовых пластинок и цветочных лепестков, данный способ стерилизации также оказался не подходящим, так как пораженными оказались все экспланты, как видно на рисунке 3-б.



а - междоузлия и листовые пластинки после первого варианта стерилизации
б - цветочные лепестки и листовые пластинки после первого варианта стерилизации

3 Рисунок - Результат стерилизации №1

Анализ результатов, полученных при использовании метода №3 показал, что заразились все 25 эксплантов, среди которых было 4 междоузлия, 11 цветочных лепестков, 9 листовых пластинок. То есть выживаемость составила 0 % (Рис.4).



а - междоузлия после третьего варианта стерилизации
 б - листовые пластинки после третьего варианта стерилизации
 в - цветочные лепестки после третьего варианта стерилизации

4 Рисунок - Результат стерилизации № 3

Из всех проведенных экспериментов по подбору условий стерилизации, трех вариантов эксплантов хризантем сорта Инга, Севан и Токио, вариант № 2 показал наилучший результат. Данный вариант стерилизации состоял из следующих этапов: экспланты промывали под проточной водой в течение 30 минут, затем обрабатывали этиловым спиртом 70% в течение 3 минут, 10% раствором «Белизны» в течение 20 минут, 0.1% «Твин-20», с последующим четырехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 4 минут.



а - междоузлия после стерилизации II
 б - листовые пластинки после стерилизации II
 в - цветочные лепестки после стерилизации II

5 Рисунок - Результат стерилизации № 2

Выживаемость после данного варианта стерилизации составила 37% (Рис.5).

2.3 Подбор питательных сред для введения в культуру *in vitro*

После выбора метода стерилизации, нами был проведен подбор питательной среды и оптимизации условий культивирования для каждого вида экспланта.

Для введения в культуру эксплантов из междоузлий, стеблевых сегментов, листовых пластинок и цветочных лепестков было использовано пять вариантов питательных сред:

1 вариант – МС – 4,33 г/л; витамины – 5 мл/л (В₁, В₂, В₆, РР); сахара – 30 г/л; агар – 7 г/л; рН= 5,6 – 5,7.

2 вариант – МС – 4,33 г/л; витамины – 5 мл/л (В₁, В₂, В₆, РР); сахара – 30 г/л; 2,4-D – 0,6 мг/л; агар – 7 г/л; рН= 5,6 – 5,7 [15].

3 вариант – МС – 4,33 г/л; витамины – 5 мл/л (В₁, В₂, В₆, РР); сахара – 30 г/л; кинетин – 0,6 мг/л; агар – 7 г/л; рН= 5,6 – 5,7 [16].

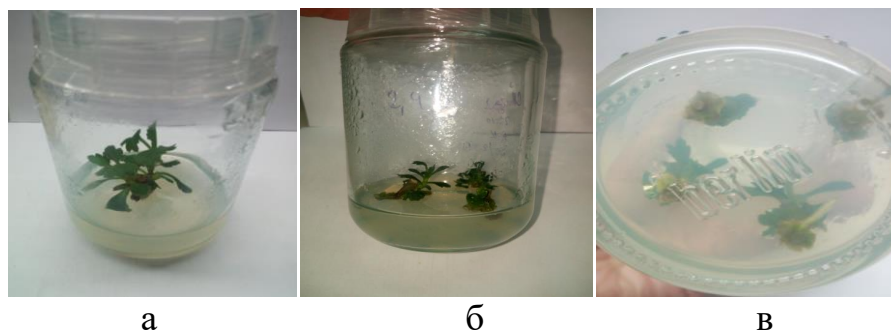
4 вариант – МС – 4,33 г/л; витамины – 5 мл/л (В₁, В₂, В₆, РР); сахара – 30 г/л; 6-БАП – 0,6 мг/л; агар – 7 г/л; рН= 5,6-5,7 [17].

5 вариант – МС – 4,33 г/л; витамины – 5 мл/л (В₁, В₂, В₆, РР); сахара – 30 г/л; 2,4-D – 0,8 мг/л; агар – 7 г/0.5л; рН= 5,6 – 5,7 [18].

В качестве базовой среды для модификаций была использована питательная среда Мурасиге-Скуга [19]. Эта питательная среда является наиболее универсальной средой. Добавление различных концентраций регуляторов роста в питательную среду приводило к различным морфофизиологическим процессам. В частности, при добавлении в среду ауксинов начиналось образование каллусной ткани тканями экспланта, а также корнеобразование. Добавление в среду цитокининов приводило к регенерации растения непосредственно из клеток первичного экспланта. Так как клетки экспланта не способны фотосинтезировать в питательную среду добавляют углеводы. В данной работе в качестве источника углевода была использована 3% сахара. Экспланты были посажены на твердую питательную среду. В качестве уплотнителя среды применялся агар.

2.3.1 Получение растений-регенерантов

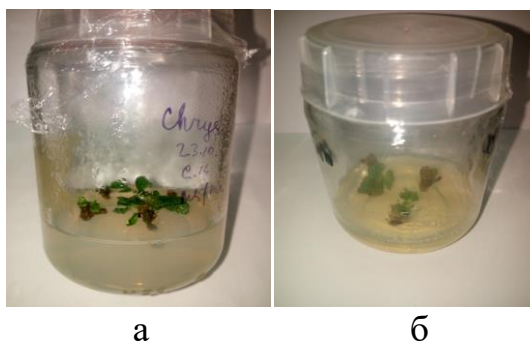
Было установлено, что культивирование изолированных сегментов междоузлий на безгормональной среде МС приводит к регенерации растения на 6 день (Рис.6). Культивирование эксплантов изолированных междоузлий, на среде № 2, которая содержала 2,4 – D в концентрации 0,6 мг/л, приводило к регенерации растения на 5 день. Кроме того на данном варианте среды также наблюдалось корнеобразование на 10-13 день (Рис.6).



- а - регенерация растений на безгормональной среде
 б - регенерация растений на среде содержащей 2,4-D в концентрации 0,6 мг/л
 в - корнеобразование на среде содержащей 2,4-D в концентрации 0,6 мг/л.

6 Рисунок - Регенерация растений тканями экспланта

На питательной среде № 3, а также на среде № 4 наблюдалась регенерация растений из сегментов междоузлий на 4-5 день (Рис.7).



- а - Регенерация растений сегментами междоузлий на среде МС содержащей кинетин
 б - регенерация растений на среде МС содержащей 6-БАП

7 Рисунок - Результат применения различных питательных сред

Таким образом, из полученных данных можно сделать вывод, что наиболее оптимальной средой для получения растений-регенерантов является среда МС, содержащая цитокинины в качестве регуляторов роста.

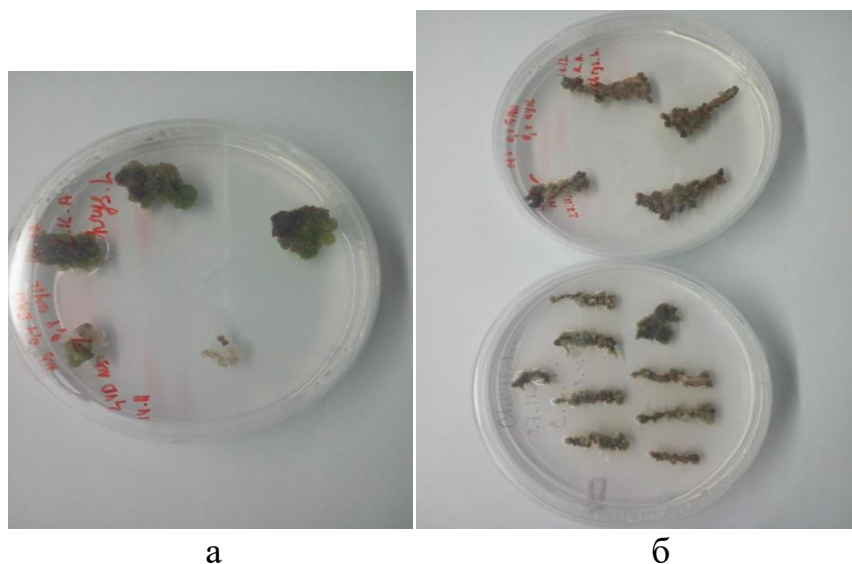
2.3.2 Получение калусных культур

Культивирование междоузлий на среде № 1 не привело к образованию каллуса. Однако на среде № 2 образование каллуса происходило на 7-9 день. Каллус образовывался плотный, зеленого цвета. На питательной среде № 3 и № 4 каллусообразования из междоузлий не наблюдалось (Рис.8).



8 Рисунок - Образование каллуса сегментами междуузлий на среде содержащей 2,4-D в концентрации 0,6 мг/л

Образование каллуса из сегментов листовых пластинок и цветочных лепестков началось на питательной среде № 5 на 10-12 день (Рис.9).



а - каллусообразование сегментами листовых пластинок
б - каллусообразование сегментами цветочных лепестков

9 Рисунок - Каллусообразование тканями экспланта

Таким образом, как показывает исследование, для введения в культуру эксплантов междуузлий наилучшим вариантом питательной среды является среда содержащая 2,4-D в концентрации 0,6мг/л и среда содержащая 6-БАП и кинетин в концентрации 0,6 мг/л. А для введения в культуру эксплантов листовых пластинок и цветочных лепестков наилучшим вариантом является среда содержащая 2,4-D в концентрации 0,8 мг/л. При этом также можно сделать вывод, что содержание в питательной среде ауксинов приводит к образованию каллусов, а также к укоренению. А содержание в питательной среде цитокининов приводит к регенерации растений.

2.4 Микрклональное размножение растений-регенерантов

Следующим этапом данной работы являлось проведение микрклонального размножения полученных растений-регенерантов. На данном этапе производилось черенкование полученных побегов, а также подбор питательных сред для укоренения этих побегов. Для этого была использована питательная среда Мурасиге-Скуга в различных вариантах:

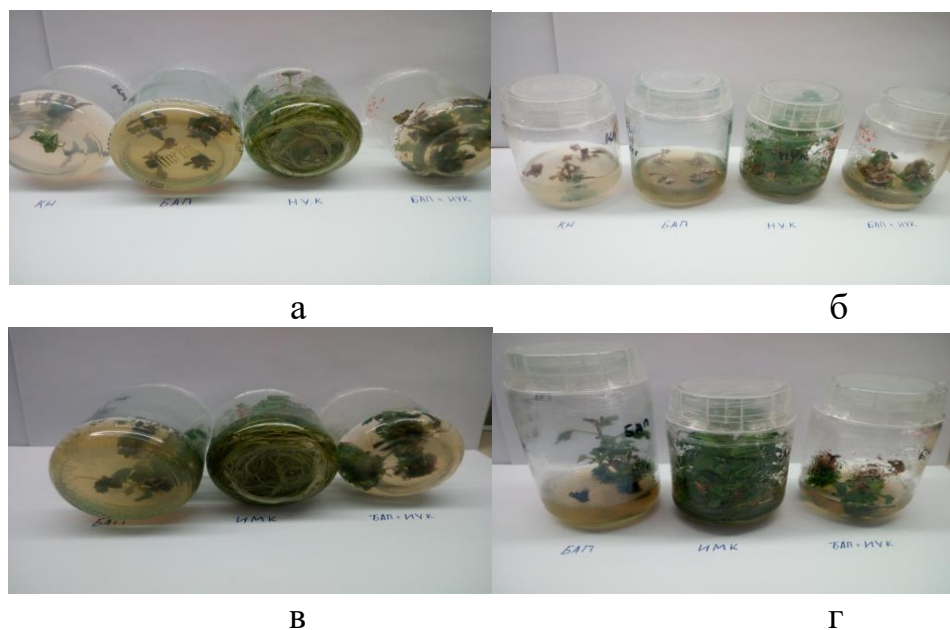
1 вариант – МС – 4,33 г/л; витамины – 5 мл/л (В₁,В₂,В₆,РР); сахара – 30 г/0.5л; 6-БАП – 0,6 мг/ л; агар – 7 г/л; рН= 5,6 – 5,7.

2 вариант– МС – 4,33 г/л; витамины – 5 мл/л (В₁,В₂,В₆,РР); сахара – 30 г/л; 6-БАП – 1мг/л совместно с ИУК – 0,1мг/л; агар – 7г/л; рН= 5,6 – 5,7 [20].

3 вариант - МС – 4,33 г/л; витамины – 5 мл/л (В₁,В₂,В₆,РР); сахара – 30 г/л;ИМК – 0,5мг/л; агар – 7г/л; рН= 5,6 – 5,7 [21].

4 вариант - МС – 4,33 г/л; витамины – 5 мл/л (В₁,В₂,В₆,РР); сахара – 30 г/л; НУК – 0,2мг/л; агар – 7г/л; рН= 5,6 – 5,7 [22].

В результате исследований установлено, что наиболее оптимальной для дальнейшего укоренения растений средой оказалась среда № 3, содержащая ИМК в концентрации 0,5 мг/л и № 4, которая содержала НУК в концентрации 0,2 мг/л. Образование корней на этих средах отмечалось уже на 5-7 день. Культивирование микропобегов на среде № 1 и № 2 приводило к образованию слабых побегов, корнеобразование не наблюдалось вовсе (Рис. 10).



- а – укоренение на средах с кинетином, БАП, ИМК, БАП+ИУК
б – растения-регенеранты на средах с кинетином, БАП, ИМК, БАП+ИУК
в – укоренение на средах с БАП, ИМК, БАП+ИУК
г – растения-регенеранты на средах с БАП, ИМК, БАП+ИУК

10 Рисунок - Растения регенеранты на среде МС с различными фитогормонами в сравнении

Далее после появления корней у растений-регенерантов, производилась их пересадка в грунт. Для этого растения вынимались из баночек пинцетом, корни промывались в растворе марганцовки для удаления агара и сахарозы. После этого растения переносились в грунт (Рис.11).



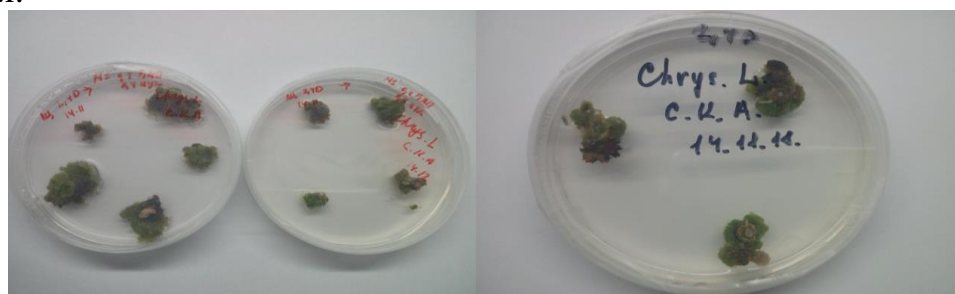
11 Рисунок – Перенос растений-регенерантов в грунт

Так как со временем компоненты питательной среды истощаются, необходимо проводить пересадку каллусов, то есть пассирование. Для этого использовалось два варианта питательных сред (Таблица 2).

2 Таблица – Варианты питательных сред для пересадки каллуса

Вариант	Минеральная основа MS, г/л	Сахароза, г/л	Витамины, мл/л	2,4-D, мг/л	6-БАП, мг/л	ИУК, мг/л	Агар	pH
I	4,33	30	5	0,6	-	-	7	5,6-5,7
II	4,33	30	5	-	0,4	0,4	7	5,6-5,7

Пересаживание каллусов осуществлялось на среды № 2 и № 3. Регенерации пока не наблюдалось, но работа находится на стадии исследования.



а

б

а – каллусы на среде MS с 0,4μM/л 6-БАП совместно с 0,4μM/л ИУК
 б – каллусы на среде MS с 0,6μM/л 2,4-D.

12 Рисунок - Пересаживание каллуса

Так как хризантемы выделяют в питательную среду фенолы, пассирование желательно проводить раз в две-три недели.

В результате данной работы были использованы различные типы эксплантов, среди которых наилучшим вариантом для введения в культуру оказались междоузлия с пазушными почками. Также был подобран оптимальный вариант стерилизации (№ 2) и подобрана оптимальная среда для введения в культуру растений хризантем. Наилучшим вариантом для введения в культуру стала среда МС, содержащая 2,4-D в концентрации 0,6 мг/л. На данной среде наблюдалась индукция образования каллуса, также как и на средах содержащих кинетин в концентрации 0,6 мг/л и 6-БАП в аналогичной концентрации, где происходила регенерация растений. Кроме того, были подобраны среды для микроклонального размножения и пересаживания каллуса. Для лучшего укоренения растений-регенерантов оптимальной средой оказалась среда МС, содержащая ИМК в концентрации 0,5 мг/л и НУК в концентрации 0,2 мг/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, все поставленные в работе цели были достигнуты, задачи выполнены. Растения хризантем трех сортов Инга, Токио и Севан были введены в культуру, получены растения регенеранты, проведено микроклональное растений – регенерантов с последующей высадкой в грунт.

Полученные результаты:

1. Подобраны способы стерилизации эксплантов, взятых из разных частей растений хризантем. Установлено, что оптимальным способом стерилизации эксплантов междоузлий, листовых пластинок и цветочных лепестков является вариант стерилизации № 2: экспланты промывали под проточной водой в течение 30 минут, затем обрабатывали этиловым спиртом 70% в течение 3 минут, 10% раствором «Белизны» в течение 20 минут, 0.1% «Твин-20», с последующим четырехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 4 минут.

2. Подобраны среды для введения в культуру растений хризантем. Установлено, что оптимальной средой для образования каллуса из эксплантов междоузлий является среда МС, содержащая 0,6 мг/л 2,4-D. Для образования каллуса эксплантами листовых пластинок и цветочных лепестков оптимальной средой служит среда МС, с 0,8 мг/л 2,4-D. Для регенерации растений из эксплантов междоузлий оптимальной является среда, содержащая 0,6 мг/л кинетина и 0,6 мг/л 6-БАП.

3. Подобраны среды для микроклонального размножения. Установлено, что для клонального микроразмножения оптимальной средой является питательная среда МС, содержащая ИМК (0,5 мг/л) и НУК (0,2 мг/л).

4. Подобраны среды для пассирования. Для пересадки каллуса оптимальными являются питательные среды, содержащие 2,4-D (0,6 мг/л) и комбинацию 6-БАП и ИУК по 0,4 мг/л.

Работа с хризантемами также продолжается и возможно через несколько лет в Казахстане начнется производство данных растений.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

МС – питательная среда Мурасиге – Скуга
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота
ИУК – индолилуксусная кислота
НУК – α -нафтилуксусная кислота
ИМК – индолил-3-масляная кислота
6-БАП – 6-бензиламинопурин
В₁ – тиамин
В₂ – рибофлавин
В₆ – пиридоксин
РР – никотиновая кислота

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Грандо Р. Микроклональное размножение хризантем. Известие ТСХА, 2009, 1:146-148
- 2 Адрианов В.Н., Хризантемы.-М.: Агропромиздат, 1990. – 110с.
- 3 Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений: учебное пособие / Г.Ж.Валиханова – Павлодар: Кереку, 2009. – 272 с.
- 4 O. M. Oseni, V. Pande, T. K. Nailwal. A Review on Plant Tissue Culture, A Technique for Propagation and Conservation of Endangered Plant Species. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. ISSN: 2319-7706, Volume 7, Number 07 (2018).
- 5 Назаренко Л.В., Долгих Ю.И., Загоскина Н.В., Ралдугина Г.Н. Биотехнология растений: учебник и практикум для бакалавриата и магистратуры / 2-е изд., испр. и доп. – М.: Издательство Юрайт, 2018. – 161с.
- 6 Y. Sidhu. *In vitro* micropropagation of medicinal plants by tissue culture. The Plymouth Student Scientist, 2010, 4, (1): 432-449.
- 7 Адрианов В.Н. Хризантемы. – М.: Агропродукт, 1990. - 110 с.
- 8 Шмыгун В.Н. Хризантемы. – «Наука», 1972. – 116 с.
- 9 Звирзгдыня В.Я. Хризантемы в Латвийской ССР (интродукция и агротехника). – Рига «Зинатне», 1973. – 188 с.
- 10 Дворянинова К.Ф. Хризантемы (интродукция, биология и агротехника). – Кишинев «Штиинца», 1982. – 167.
- 11 Висящева Л.В., Соколова Т.А. Хризантема / Промышленное цветоводство. – М.: Агропромиздат, 1991. – С.136-156.
- 12 Кабанцева И. Н. Хризантемы. — М.: АСТ:Артель, 2005. — 191 с.
- 13 Nalin R., Anjana J.M., Arathy C.S., Aswathy M., Ayana B., Bhuvanewari R. Effect of growth regulators on micropropagation of *Chrysanthemum* L. SIRJ-APBBP Volume 3 Issue 4 (August 2016).
- 14 Chalinee T., Kamnoon K. Regeneration of *Chrysanthemum* plants (*Chrysanthemum* × *Grandiflorum* (ramat.) kitam.) by callus derived from ray floret explants. Propagation of Ornamental Plants Vol. 11, № 4, 2011: 204-209.
- 15 Nasri F., Zakizadeh H., Vafae Y., Mozafari A.A. *In vitro* propagation of *Chrysanthemum*: an Overview on its Utility in Mutagenesis and Genetic Transformation Techniques. Agricultural Research & Technology Open Access Journal, April 25, 2018.
- 16 Waseem K., Jilani M. S., Khan M.S., Kiran M., Khan G. Efficient *in vitro* regeneration of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum moriflorum* L.) plantlets from nodal segments. African Journal of Biotechnology Vol. 10(8), pp. 1477-1484, 21 February, 2011.
- 17 Waseem K., Jilani M. S., Khan M.S. Rapid plant regeneration of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium* L.) through shoot tip culture. African Journal of Biotechnology Vol. 8(9), pp. 1871-1877, 4 May, 2009.
- 18 Labade G.B., Dale N.S., Umbarkar R.B., Gadhe S.K., Rote Y.N. *In vitro* regeneration of *Chrysanthemum* (*Chrysanthemum morifolium* L.) International

Journal of Information Research and Review, Vol. 03, Issue 11, pp. 3043-3045, November 2016

19 Murashige, T. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Plant Physiol. – 1962. – V. 15. - № 95. – P. 473-497.

20 Keresa S., Mihovilovic A., Baric M., Zidovec V., Skelin M. The micropropagation of Chrysanthemum via axillary shoot proliferation and highly efficient plant regeneration by somatic embryogenesis. African Journal of Biotechnology Vol. 11(22), pp. 6027-6033, 15 March, 2012.

21 Jin L., Yang Y., Gao W., Gong M., Wang J., Anderson N.O., He M. Establishment of callus induction and cell suspension cultures of *Dendrathera Indicum* var. *Aromaticum* a scented Chrysanthemum. Journal of plant studies. Vol. 6, № 2, 2017.

22 Yesmin S., Hashem A., Das K.S., Hasan M.M., Islam M.S. Efficient in vitro regeneration of Chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* R .) through nodal explants culture. Nuclear science and applications. Vol. 23, № 1&2. 2014.

Краткий отчет



Университет:	Satbayev University
Название:	Введение хризантем <i>Chrysanthemum L.</i> в культуру клеток для получения растений-регенерантов
Автор:	Дмитриева Карина Анатольевна
Координатор:	Наталья Малахова
Дата отчета:	2019-04-29 10:33:34
Коэффициент подобия № 1: ?	3,6%
Коэффициент подобия № 2: ?	0,0%
Длина фразы для коэффициента подобия № 2: ?	25
Количество слов:	6 282
Число знаков:	45 425
Адреса пропущенные при проверке:	
Количество завершенных проверок: ?	20



К вашему сведению, некоторые слова в этом документе содержат буквы из других алфавитов. Возможно - это попытка скрыть позаимствованный текст. Документ был проверен путем замещения этих букв латинским эквивалентом. Пожалуйста, уделите особое внимание этим частям отчета. Они выделены соответственно.

Количество выделенных слов 4