

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН

Казахский национальный исследовательский технический университет
имени К. И. Сатпаева

Институт химических и биологических технологий

Кафедра «Биотехнология»

Марюхина Лилия Александровна

Размножение лилий в культуре *in vitro*

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»



УТВЕРЖДАЮ

Заведующая кафедрой «Биотехнология»
PhD, профессор

З.К. Туйебахова

2019 г.

ЗАДАНИЕ

на выполнение дипломной работы

Обучающейся *Марюхиной Лилии Александровны*

Тема: *Размножение лилий в культуре in vitro*

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

Срок сдачи законченного проекта *«24» апреля 2019 г.*

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 оптимальных условий стерилизации растительного материала;*
- б) подбор оптимальных питательных сред и условий культивирования эксплантов;*
- в) изучение особенностей роста и развития растений в ходе процесса культивирования;*

Перечень графического материала: *представлены 16 слайдов презентации работы.*

Рекомендуемая основная литература *состоит из 25 наименований.*

ГРАФИК
подготовки дипломной работы

Наименование разделов, перечень разрабатываемых вопросов	Сроки представления научному руководителю и консультантам	Примечание
1. Технология микрклонального размножения и оборудование	08.01.19	
2. Ботаническая характеристика лилий	11.01.19	
3. Подбор оптимальных условий стерилизации эксплантов	15.01.19	
4. Подбор оптимальных питательных сред	10.02.19	
5. Особенности культивирования в условиях <i>in vitro</i>	16.04.19	

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	24.04.19	
Нормоконтролер	А. М. Сагимбаева, магистр технических наук	24.04.19	

Научный руководитель _____  Н. П. Малахова

Задание приняла к исполнению обучающаяся _____  Л.А. Марюхина

Дата _____ "29" апреля 2019 г.

АННОТАЦИЯ

В данной дипломной работе представлены теоретические основы микроклонального размножения и результаты экспериментов по введению в культуру и размножению двух сортов лилий (*Lilium L.*), сорта Nepal и Lollypop, в условиях *in vitro*. На основе проведенных опытов были определены оптимальные условия микроклонального размножения лилий исследуемых сортов. Наиболее результативным для введения в культуру *in vitro* оказались экспланты из частей луковичных чешуек и пестика, стерилизованных антисептиками: 70% этанол, 50% раствор гипохлорита натрия, 3% раствор перекиси водорода. Наилучшими по эффективности питательными средами являются среды: МС с содержанием 0,1 НУК и сахарозы- 30 г/л и МС с содержанием 0,5 НУК и сахарозы- 60 г/л.

АНДАТПА

Бұл дипломдық жұмыста лилияның Neral және Lollypop сорттарын микроклональды көбейтуінің теориялық негіздері мен *in vitro* жағдайында культураға енгізу және көбейту бойынша жүргізілген тәжірбие нәтижелері келтірілген. Жүргізілген тәжірбие негізінде лилия өсімдігін микроклональды көбейтудің оңтайлы әдістері жасалды. Экспланттарды культивирлеуде антисептикалық заттармен зарарсыздандырудың ең тиімдісі: 70% этанол, 50% натрий гипохлориті ерітіндісі, 3% сутек асқын тотығы болып табылды. Ал ең тиімді коректік орталар - 0,1 НУК және 30 г / л сахарозасы бар МС - және 0,5 НУК және 60 г/л сахароза құрайтын МС.

ABSTRACT

Theoretical basis and results of the experiments on *in vitro* introduction into culture and reproduction of two varieties of lilies (Lilium L. Nepal and Lollypop) are presented by this thesis work. On the basis of the carried out experiments, optimal conditions for microclonal reproduction of lilies (Lilium L.) were developed. The most effective for cultivation explants are parts of scales and pistils, when they are sterilized by antiseptics: 70% ethanol, 50% sodium hypochlorite solution, 3% hydrogen peroxide solution. Also, the most effective nutrient medias are MS containing 0.1 NAA and sucrose - 30 g/l and MS containing 0.5 NAA and sucrose - 60 g/l.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	9
1 Технология микрклонального размножения и оборудование	11
1.1 Этапы микрклонального размножения	12
1.2 Методы микрклонального размножения	14
1.3 Факторы, влияющие на микрклональное размножение растений	16
1.3.1 Подготовка и стерилизация эксплантов	16
1.3.2 Состав питательных сред	17
1.3.3 Условия культивирования растений-регенерантов	19
1.4 Оборудование биотехнологической лаборатории	20
2 Ботаническая характеристика лилий	22
3 Результаты исследований и их обсуждение	24
3.1 Материалы и методы	24
3.2 Подбор оптимальных условий стерилизации эксплантов	24
3.3 Подбор оптимальных питательных сред	28
3.4 Особенности культивирования в условиях <i>in vitro</i>	29
Заключение	32
Перечень принятых сокращений	33
Список использованной литературы	34

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология представляет собой область науки и техники, которая направлена на производство необходимых для человека продуктов и материалов с помощью живых организмов, продуктов их жизнедеятельности и биологических процессов.

Для биотехнологии в свое время теоретической базой стала наука генетика, в то время как практическую базу дала микробиологическая промышленность.

Объектами для биотехнологии служат живые организмы, а именно микроорганизмы (вирусы и бактерии), растения, животные и изолированные из них органоиды и клетки. Очень важными для биотехнологии считаются и процессы, происходящие в данных живых организмах (выделение энергии, расщепление продуктов метаболизма, синтез и другие).

Возможности биотехнологии невероятно велики. На сегодняшний день она играет важную роль во многих отраслях. Ее основными направлениями являются: 1) производство биологически активных веществ (витамины, ферменты и гормональные препараты), аминокислот, белков (применяемых в качестве кормовых добавок) и лекарственных препаратов (вакцины, сыворотки, антибиотики и другие) с помощью микроорганизмов и культивируемых клеток эукариот; 2) борьба с загрязнением окружающей среды за счет биологических методов; 3) создание новых полезных штаммов микроорганизмов, сортов растений и пород животных.

Вся современная биотехнология основывается на сочетании важнейших достижений биохимии с возможностями генной и клеточной инженерии.

Биохимия является наукой, изучающей химический состав клеток и целых организмов, а также химических процессов, которые в них протекают.

Одним из наиболее важных разделов молекулярной биологии, который занимается изучением генов, их выделением из клеток живых организмов и последующей манипуляцией с ними, является генная инженерия. В генной инженерии главными «инструментами» служат векторы и ферменты.

Базовыми процессами клеточной инженерии являются различные процессы выращивания в условиях *in vitro* клеток бактерий, растений и животных, которые подвергаются известным манипуляциям в виде их извлечения, пересадки или же комбинирования клеток разных организмов.

В настоящее время именно клеточная инженерия растений считается самой успешной отраслью в биотехнологии. Именно благодаря ее развитию появилась возможность проведения ускоренной селекции и получения абсолютно новых сортов растений.

Микроклональное размножение ценных сортов различных декоративных культур является одним из наиболее перспективных направлений в практической биотехнологии, и на сегодняшний день, тема культивирования в условиях *in vitro* и тиражирования перспективных сортов лилий голландского происхождения для коммерческого воспроизводства представляет собой одну из актуальных биотехнологических задач.

В естественной среде насчитывается более 100 видов лилий, в последующем от которых в результате культивирования произошло большое количество гибридов и сортов. Местом обитания известных культивируемых сортов лилий являются большая часть территорий азиатских стран, а также значительная доля европейского и северная часть американского континента.

Лилии являются многолетними луковичными растениями, которые широко используются в ландшафтном растениеводстве. Азиатские гибриды лилий имеют собственные особенные декоративные и качественные преимущества, отличаются повышенной зимостойкостью, неприхотливостью культивирования вследствие чего имеют большой спрос и считаются ценным материалом для селекции. Одним из существенных недостатков их традиционного вегетативного размножения является проблема получения большого количества качественного луковичного посадочного материала и длительный срок культивирования растений из семенного материала.

Для решения проблемы ускоренного размножения отдельных сортов лилий в развитых странах в основном применяют методы и подходы современной биотехнологии. Одним из таких подходов является использование метода микроклонального размножения, который за счет своих преимуществ, по сравнению с традиционными методами, позволяет за минимальный промежуток времени, в течение круглого года, получать большое количество высококачественного оздоровленного луковичного материала лилий, свободного от бактериальных, грибных, и вирусных болезней.

Цель данной работы заключается в подборе и оптимизации методов для введения голландских сортов *Lilium Nepal* и *Lilium Lollypop* в клеточную культуру и их размножение в условиях *in vitro*.

Задачи:

- 1) Подбор оптимальных условий стерилизации растительного материала.
- 2) Подбор оптимальных питательных сред и условий культивирования эксплантов.
- 3) Изучить особенности роста и развития растений в ходе процесса культивирования.

1 Технология микрклонального размножения и оборудование

Метод культуры клеток и тканей считается основной базой биотехнологии растений. Культурой клеток, тканей и органов растений именуют выращивание единичных клеток, а также тканей и органов на искусственных питательных средах в стерильных условиях. Процесс регенерации растительных клеток происходит благодаря их свойству тотипотентности. Культура клеток, тканей и органов растений применяется также и в микрклональном размножении.

Микрклональным размножением именуется процесс выращивания *in vitro* на особых питательных средах новых полноценных дочерних растений из частей растения-донора, которые в последующем адаптируют к натуральным климатическим условиям. При сопоставлении с классическим способом размножения микрклональное размножение содержит ряд достоинств.

К данным достоинствам относятся:

- получение освобожденных от вирусов клонов, которые считаются совершенной генетической копией начального родительского растения-донора;
- получение большого числа потомков от 1-го растения; более быстрый рост, развитие и переход к репродуктивной фазе;
- отсутствие зависимости от времени года и погодных условий;
- наименьшие издержки на посадочную площадь;
- возможность размножать растения, сложно размножаемых классическими методами.

С помощью микрклонального размножения процесс выращивания и тиражирования растений возможно автоматизировать и осуществлять в промышленных масштабах [1].

Родоначальником микрклонального размножения считается французский ученый Жан Морель, который в 50-х годах XX века получил первые растения - регенеранты орхидей. В то же время была успешно разработана технология культивирования апикальных меристем в искусственных условиях [2].

В 60-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева РАН, ученым Бутенко Р.Г. были исследованы технологии микрклонального размножения сахарной свеклы, картофеля, фрезии, герберы, гвоздики и некоторых других растений [3].

В 20-х годах XX века были замечены первые работы французского научного работника Готре, связанные с культурой тканей древесных растений. В данных работах рассказывалось о возможности камбиальных тканей конкретных видов сосны и вяза к образованию каллуса *in vitro*. В середине 60-х годов ученому Матесу удалось получить первые растения-регенеранты осины, которые в последующем были доведены до почвенной культуры. Древесные растения характеризуются довольно продолжительным ростом, непростым укоренением, содержанием в большом количестве вторичных соединений многих веществ (терпены, фенолы и другие), которые окисляются разными фенолазами в изолированных тканях. Продукты окисления фенолов ингибируют деление и дальнейший рост клеток, собственно, что приводит к гибели

первичного экспланта и к сокращению способности тканей к регенерации адвентивных почек. На сегодняшний день насчитывается уже более 200 видов древесных растений, которые были получены в искусственных условиях с помощью микроклонального размножения [4].

1.1 Этапы микроклонального размножения

Процесс микроклонального размножения растений включает в себя четыре этапа:

1) Выбор растения-донора, изолирование и стерилизация эксплантов с последующим получением хорошо растущей культуры.

2) Само микроклональное размножение, при котором идет получение меристематических клонов в наибольшем количестве.

3) Укоренение полученных при размножении побегов с дальнейшей их адаптацией к почвенным условиям, а в случае если есть надобность, то еще проводится депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре.

4) Выращивание растений-регенерантов в оранжерейных условиях и их подготовка к реализации или же посадке в поле.

На любом из этапов для культивирования тканей нужно использовать питательные среды с конкретным составом.

На первом этапе нужно получить хорошо растущую стерильную культуру. В случаях, когда появляется трудность при получении стерильной культуры экспланта, рекомендовано включать в состав питательной среды лекарственные вещества-антибиотики (бензилпенициллин, тетрациклин, цефотаксим и др.), которые предотвращают скопление внутренней инфекции. Вдобавок на первом этапе как правило применяют питательную среду, содержащую минеральные соли по рецепту Мурасиге и Скуга, а также добавляют витамины и фитогормоны (цитокинины, ауксины) во всевозможных сочетаниях в зависимости от объекта изучения. В случае если происходит ингибирование роста первичного экспланта по причине выделения у него в питательную среду ядовитых веществ (терпенов, фенолов и других вторичных соединений), то подавление роста можно устранить, для чего используют антиоксиданты. Это возможно сделать двумя методами: промывкой экспланта слабым раствором антиоксиданта, или его добавлением в питательную среду. В качестве антиоксидантов используют обычно такие вещества, как глутатион, аскорбиновую кислоту, дитиотриэтол и другие. Первый этап может длиться на протяжении от одного до двух месяцев, при этом можно наблюдать рост тканей и формирование первичных побегов [5].

На втором этапе необходимо получить максимальное количество меристематических клонов, но необходимо учитывать возможное образование растений-мутантов. На этом этапе также используют питательную среду Мурасиге – Скуга, которая содержит различные витамины, а также регуляторы роста - фитогормоны. При разработке оптимальных условий культивирования эксплантов очень важно в каком соотношении и в какой концентрации идет

внесение в питательную среду фитогормонов. Из ауксинов чаще всего используют НУК и ИУК в концентрациях от 0,1 до 0,5 мг/л, а из цитокининов – БАП в концентрациях от 1 до 10 мг/л.

Третьим этапом считается укоренение микропобегов, с их дальнейшей адаптацией к почвенным условиям и посадкой в поле. Эти этапы в процессе микроклонального размножения считаются более трудоемкими и от них зависит его конечный успех. На третьем этапе происходит замена состава питательной среды путем сокращения в несколько раз концентрации минеральных солей по рецепту Мурасига и Скуга, либо путем замены данной питательной среды на среду Уайта, сокращением концентрации сахара и исключением цитокининов. Для образования корней используют такие стимуляторы как НУК, ИМК или же ИУК [6].

Укоренение микропобегов осуществляется тремя способами:

1) микропобеги выдерживают в стерильном растворе ауксина в течение нескольких часов и проводят их культивирование на агаризованной безгормональной среде;

2) культивирование микропобегов в течение нескольких недель на питательной среде, которая имеет в своем составе невысокую концентрацию ауксина.

3) укоренение пробирочных растений в условиях гидропоники. Благодаря данному способу упрощается период укоренения, к тому же получают растения уже приспособленные к естественным условиям. Данный способ осуществляется методом затенения непроницаемой темной материей нижних частей культуральных сосудов или благодаря внесения в питательную среду активированного угля, который благоприятствует укоренению микропобегов.

Завершающим этапом микроклонального размножения считается пересадка растений-регенерантов в субстрат. Весна или начало лета являются более подходящими периодами для пересадки пробирочных растений.

Процесс пересадки происходит следующим образом: 1) растения с листьями и развитой корневой системой достают из пробирок при помощи пинцета; 2) отмывают корешки от агара; 3) высаживают в почвенный субстрат, который изначально был простерилизован при температуре 85-90°C в течении нескольких часов. В качестве субстратов растений используют торф, песок, перлит и дерновую почву в различных сочетаниях и соотношениях.

Растения-регенеранты выращивают в торфяных горшочках, заполненных почвенным субстратом. Горшочки с растениями-регенерантами переносят в теплицы, где они располагаются в особых регулируемых условиях: температура настраивается от 20 до 22°C; влажность от 70 до 90%; освещение не больше 5 тыс. лк; искусственный туман.

Через месяц после проведения посадки растений необходимо провести подкормку смесями минеральных солей или при помощи комплекса минеральных удобрений на выбор в зависимости от вида растения. По мере роста и развития растений их нужно пересаживать в большие горшки или же емкости,

заполненные новым субстратом. Дальнейшее выращивание приспособленных растений в почве для каждого вида растений реализуется персонально [7].

1.2 Методы микроклонального размножения

Микроклональное размножение базируется на уникальной способности растений – тотипотентности, то есть умении регенерироваться из клетки, ткани либо органа. Тотипотентность проявляется у меристемальных клеток путем формирования побегов, корней и зародышей за счет влияния на них состава питательной среды и индукторов дифференцирования. Данные клетки активно делятся и находятся в недифференцированной ткани апикальных меристем, в меристеме пазушных, спящих почек, стеблей и других. Меристемальные клетки обладают такими отличительными признаками, как крупное размером ядро, густая по консистенции цитоплазма и небольшая по размеру вакуоль [8].

Методы микроклонального размножения:

1. Активация развития уже существующих в растениях меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля).
2. Индукция образования эмбриоидов или же новых стеблевых почек непосредственно на тканях экспланта.
3. Возникновение эмбриоидов либо почек из первичного и пересадочного каллуса, суспензионной культуры клеток или же протопластов.

Базовым методом микроклонального размножения является активация развития уже существующих в растениях меристем. Этот метод основан на снятии эффекта апикального доминирования. В том случае, если удалить верхушечную точку роста, в пазушных почках будет наблюдаться повышение содержания цитокининов и снижение содержания ауксинов, также активизируется клеточное деление и рост пазушных почек. Добавив в питательную среду цитокинины, можно также снять эффект апикального доминирования. Благодаря действию цитокининов идет омоложение тканей, которые будут обладать наибольшей способностью к росту и регенерации корней и побегов.

В работе Р. Л. Пиерик [9] выделяет метод придаточных почек и метод однопочковых черенков. Первый метод базируется на добавлении цитокининов в питательную среду и используется для культивирования плодовых (слива, яблоня, вишня и других), ягодных (малина, ежевика, смородина и других), лесных (тополь, береза, туя и других), декоративных (розы, гвоздика, гербера и других) растений. Вторым методом не нуждается в добавлении цитокининов и применяется для культивирования огурцов, томатов, картофеля и других культур.

Метод индукции образования эмбриоидов либо новых стеблевых почек непосредственно на тканях экспланта является вторым методом микроклонального размножения. Данный метод состоит из нескольких процессов: дедифференциация специализированных клеток, деление клеток и

формирование новых меристем, формирование и развитие органов растений. Возможно протекание процесса по пути соматического эмбриогенеза либо органогенеза. В качестве эксплантов для обоих путей процесса могут служить разные части органов растения: стебля, листа, зародыша, чешуй луковиц, корней и других. В своей работе Р.Л. Пиерик показал, что формирование адвентивных побегов лучше всего проявляется в молодых частях растений, таких как зародыш и проросток [9].

Соотношение регуляторов роста в эксплантах и в питательной среде считается существенным фактором. Определенные растения не нуждаются в ауксинах и цитокининах для процесса формирования адвентивных побегов. Для многих растений необходимо наличие в большей концентрации цитокининов, чем ауксинов для формирования адвентивных побегов. Для таких растений как лилия необходимо наличие только ауксинов, цитокинины не нужны.

Возникновение эмбриоидов либо возникновение почек из первичного и пересадочного каллуса, суспензионной культуры или же протопластов считается третьим методом микроклонального размножения. Особенностью данного метода является то, что в результате соматического эмбриогенеза или же непрямого органогенеза происходит образование меристематической ткани. В виде эксплантов для этого могут использоваться стебли, цветки, корни, листья и другие части растения, то есть почти любой его сегмент. Процесс осуществляется за счет потери специализации у соматических тканей экспланта.

Для успешного проведения соматического эмбриогенеза существуют определенные условия:

- изначальное повышение содержания ауксинов в среде для формирования эмбриогенных клеток, с последующим его уменьшением либо полным исключением для развития эмбриоидов;
- исключение ингибиторов эмбриогенеза: этилена и гиббереллинов;
- уменьшение содержания кальция, аммонийного азота;
- повышение содержания калия, солей;
- содержание сахарозы в среде от 2 до 3 %
- высокая степень освещенности (для некоторых видов - слабая освещенность, темнота);
- высокая температура (для некоторых видов – холодовой шок);

Из соматических зародышей, в дальнейшем при их помещении в капсулы с питательными веществами, возможно получение искусственных семян. Благодаря этому способу можно размножить уникальные генотипы растений, которые в естественных условиях не образуют семена, либо имеют трудности при половом размножении, либо, когда такой способ является единственным возможным способом размножения для определенных видов.

Способ образования почек из первичного и пересадочного каллуса применяется редко, что связано с высокой вероятностью появления нежелательных эффектов. Недостатком такого метода является возможность возникновения различных мутаций: генные мутации, хромосомные aberrации, изменение ploидности и другие. Для успешного протекания данного способа

должны выполняться два выдвигаемых требования: генетическая стабильность (идентичность первичного и полученного из него материала), поддержание способности к регенерации при повторном пересаживании каллуса.

1.3 Факторы, влияющие на микроклональное размножение растений

На процесс микроклонального размножения воздействуют многие факторы, имеющие разную природу происхождения.

К данным факторам относятся:

- физиологические характеристики вводимого в культуру *in vitro* растения;
- физические условия культивирования;
- химические условия культивирования.

Одним из самых важных этапов является выбор материнского растения, а также выбор экспланта.

В ходе выбора материнского растения нужно обращать внимание на его физиологические, сортовые и видовые свойства. Данные растения должны быть в фазе интенсивного роста и не должны быть больными, пораженными бактериальными, вирусными или же грибными заболеваниями.

На этапе выбора экспланта необходимо обращать внимание на его происхождение, строение и возраст. В качестве экспланта чаще всего используют молодые и слабо специализированные ткани, так как это предотвращает возникновение аномальных растений и обеспечивает наибольшую стабильность клонируемого материала. Экспланты, взятые у молодых растений лучше проходят процесс укоренения, чем у взрослых, это хорошо заметно при работе с древесными растениями. Самыми лучшими эксплантами считаются те части растения, которые содержат меристемы. К ним относятся зародыши, черенки, молодые листья, пазушные почки, чешуи луковиц, кончики стеблей. При выборе экспланта вдобавок нужно учитывать его размер. Необходимо подбирать оптимальный размер, так как при слишком маленьком размере уменьшается способность к регенерации, а при большом возрастает риск заражения.

На эффективность клонального микроразмножения также воздействует продолжительность процесса культивирования. Это связано с тем, что физиологические характеристики экспланта изменяются в течение пассажей, при длительном процессе культивирования частота укореняемости побегов будет возрастать. Есть вероятность, что за счет этого произойдет приобретение эксплантом признаков ювенильности, и это приведет к возрастанию морфологического и генетического потенциала.

1.3.1 Подготовка и стерилизация эксплантов

Перед тем как проводить стерилизацию растительного объекта необходимо промыть его под проточной водой, либо в проточной воде с

добавлением моющих средств для лучшего очищения от ненужных тканей. Если в качестве материала берутся корни и корнеплоды, то с них необходимо снять кожуру, с почек снимают кроющие чешуи, с побегов снимают кору.

Стерилизация эксплантов обычно проводится с помощью растворов веществ, которые содержат бромную воду, гипохлорит натрия, Tween-20, этиловый спирт, перекись водорода (3%-ая либо 10%-ая), нитрат серебра, антибиотики и другие. Для каждого растения необходимо индивидуально подбирать антисептики, их последовательность и продолжительность действия на экспланты.

Иногда проводится предварительная стерилизация с использованием этилового спирта. Предварительная стерилизация осуществляется двумя способами: растительный материал протирается этиловым спиртом либо полностью погружается в него на 2-5 секунд. В редких случаях, например, при работе с семенами, завязями, побегами или плодами этого достаточно и после не проводят дополнительной стерилизации.

Менее повреждающим агентом, используемым для стерилизации, является перекись водорода. После проведения промывания экспланта перекисью водорода не требуется дальнейшее промывание в дистиллированной воде, так как она разлагается.

Универсальным для всех эксплантов является раствор гипохлорита натрия, то есть он применяется для стерилизации любых эксплантов. Единственным условием для разных эксплантов является индивидуальный подбор концентрации и времени воздействия на них. Обычно время варьирует от 1 до 20 минут, а концентрация от 2 до 5%.

Токсичным веществом, используемым при стерилизации, считается сулема. Это вещество требует к себе особого внимания, как при выборе его концентрации для обработки разных эксплантов, так и при его хранении. В зависимости от экспланта время стерилизации варьирует от 1 минуты до 20 минут.

Если растительный материал поражен бактериями, то для его стерилизации используют антибиотики. Часто используемыми являются левомицитин, тетрамицин, стрептомицин и другие [10].

Для установления степени прохождения стерилизации нужно экспланты, находящиеся в специальных колбах, поместить в условия полной темноты при комнатной температуре на одну неделю. Спустя неделю можно увидеть где произошло заражение материала и произвести его удаление [11].

1.3.2 Состав питательных сред

Питательные среды играют важную роль в процессе культивирования растительного материала. По консистенции питательные среды подразделяются на твердые и жидкие. Жидкая питательная среда имеет преимущество по сравнению с твердой. Этим преимуществом является то, что при использовании

жидкой питательной среды материал полностью обволакивается ею, то есть погружен в нее, и питательные вещества поступают во все части растительного материала и лучше усваиваются. А в случае, когда используется твердая питательная среда питательные вещества поступают в нижнюю посаженную часть материала, за счет чего усвоение питательных веществ идет дольше.

Для успешного проведения процесса культивирования эксплантов в условиях *in vitro* важным этапом является подбор состава питательных сред. Для каждого вида растения необходимо произвести подбор индивидуального состава питательной среды. К тому же на определенных этапах культивирования необходимо менять состав среды для получения нужного результата.

Обычно для любого вида растения этап подбора оптимальной питательной среды начинается с использования таких сред, как Мурасиге-Скуга, Уайта, Нича, Гамборга Эвеллага (B5), Блейдза, Шенка-Хильдебрандта с различным содержанием в них органических соединений и фитогормонов. Данные среды являются эффективными по отношению к многим двудольным и однодольным растениям.

На сегодняшний день для введения в культуру *in vitro* широко применяются уже готовые сухие смеси таких питательных сред, как Мурасиге-Скуга, Хеллера и Уайта, которые содержат все необходимые минеральные соли. При работе с данными средами необходимо учитывать, что они требуют дополнительного использования агара, сахарозы либо глюкозы, а также фитогормонов в нужной концентрации.

При приготовлении твердых питательных сред к стандартному составу среды добавляют желатирующее вещество агар-агар. Его концентрация зависит от вида культивируемого объекта.

В состав всех питательных сред должны входить определенные микро- и макроэлементы, витамины, источники углерода, аминокислоты и фитогормоны.

В качестве источников углерода используют обычно сахарозу либо глюкозу, концентрация которых подбирается индивидуально для каждого объекта, но в среднем составляет от 15 до 40 г/л.

Минеральные соли, которые входят в состав питательных сред, представляют собой смесь, которая в свою очередь состоит из микро- и макроэлементов. К микроэлементам относятся такие вещества, как марганец, цинк, кобальт, медь, бор, молибден. А к необходимым макроэлементам относятся фосфор, магний, кальций, азот, сера и калий. Азот добавляется в питательную среду в виде аммонийной, либо нитратной соли, сера - в виде сульфатов, а фосфор - в виде фосфатов. Для поддержки содержания железа в питательной среде производят добавление в среду органических и неорганических солей в виде хелатирующего агента.

Кроме того, одним из необходимых составляющих элементов в составе питательных сред являются витамины, которые хорошо стимулируют рост растительных тканей. Практически во всех средах присутствуют витамины группы В, а именно В₁, В₂ и В₆. Но для ряда определенных культур также

применяются аскорбиновая, никотиновая, пантотеновая, а также фолиевая кислоты.

Одними из наиболее важных регуляторов физиологических процессов, добавляемых в питательную среду, являются фитогормоны. К ним относятся цитокинины и ауксины, которые участвуют в процессах дифференциации и роста клеток растений.

Как известно, цитокинины отвечают за процесс деления клеток. В качестве цитокининов в питательную среду обычно добавляют зеатин, кинетин либо 6-БАП. Цитокинины, влияя на ускорение клеточного деления, также влияют на синтез ДНК, РНК и белков, что обуславливает замедление процесса старения клеток, а также приводит к повышению устойчивости растений к неблагоприятным условиям. Самым активным индуктором деления клеток считается зеатин, который, к сожалению, обладает низкой термолабильностью, что осложняет его широкое применение в средах. Кроме того, учитывая его высокую стоимость, обычно вместо него применяют кинетин. Еще одним цитокининовым фитогормоном, стимулирующим процесс деления клеток в культуре *in vitro* является 6-БАП, который обладает более высокой активностью, чем кинетин и достаточно широко и активно применяется в питательных средах.

Фитогормоны ауксинового ряда обычно синтезируются в верхушечных меристемах и регулируют процессы клеточного растяжения. Самыми популярными среди ауксинов считаются НУК, ИУК, ИМК и 2,4-Д. В процессе формирования боковых и придаточных корней, а также регенерации и размножении каллуса ауксины оказывают положительное влияние. Для формирования каллуса, либо его длительного поддержания в культуре *in vitro* применяют НУК, ИУК, 2,4-Д, а для образования корней используют ИМК, ИУК, ФМК, ФУК и НУК.

Важным фактором, оказывающим серьезное влияние на культивирование эксплантов, является рН питательной среды. Она влияет на усваиваемость и устойчивость таких компонентов питательной среды, как витамины и фитогормоны. При культивировании растений оптимальным значением рН считается 5-6. В лабораториях определение уровня рН среды происходит при помощи прибора – рН-метр.

1.3.3 Условия культивирования растений-регенерантов

Наиболее важными физическими факторами, влияющими на процесс культивирования растительного материала в условиях *in vitro*, являются температура, аэрация, освещение, влажность и осмотическое давление питательной среды.

Температура является фактором, влияющим на все процессы первичного, а также вторичного метаболизма растений. Оптимальный режим температуры подбирается для каждого вида растения индивидуально, исходя из его особенностей и поставленной цели исследования. Обычно используется

температура 25-26°C, которая считается оптимальной для большинства культур. Чтобы активизировать процесс морфогенеза температуру понижают до 18-20°C. В литературе описаны случаи для ряда культур, когда понижение температуры приводит к повышению эффективности размножения. Одним из примеров, подтверждающих такое влияние, служит культивирование растений альпийских лугов при оптимальном температурном режиме в районе 19°C, тогда как для тропических растений оптимумом будет являться температура порядка 27°C [12].

Еще одним важным абиотическим фактором является аэрация, которая серьезно влияет на процесс культивирования растений. Необходимым условием для успешного выращивания клеток в ферментерах больших объемов является постоянный доступ к клеткам воздуха. Если же выращивание происходит в колбах, то есть в маленьких объемах, нужная аэрация достигается путем обычного регулярного перемешивания суспензии. Следует отметить, тот факт, что суспензионные культуры не могут культивироваться без аэрации, что является одной из их особенностей.

Следующим немаловажным фактором для культивирования клеток в условиях *in vitro* является освещение. Оптимальным освещением для большинства видов растений является предел от 1000 до 3000 люкс. В условиях полной темноты, либо же слабого освещения, растут почти все каллусные ткани. Освещение также влияет на процесс морфогенеза. Задержка развития растения может вызываться за счет слишком высокой интенсивности освещения. Вдобавок к этому, важную роль в культивировании играет сочетание гормонального содержания питательной среды и спектрального состава света [13].

Оптимальная влажность в процессе микроклонального размножения должна быть от 60 до 70% [14]. Сухой воздух пагубно влияет на питательную среду. Чтобы повысить влажность в комнатных помещениях обычно используют поддоны с водой.

Осмотическое давление питательной среды также является влияющим физическим фактором. Учитывая индивидуальные особенности физиологии каждого вида культивируемых растений необходим индивидуальный подбор концентрации осмотического давления. При высоком осмотическом давлении питательной среды происходит затруднение усвоения в ней необходимых питательных веществ.

При разработке технологии введения в культуру любого нового вида растений необходимо полностью изучать комплексное влияние всех физических факторов на процессы развития и роста того или иного вида растения.

1.4 Оборудование биотехнологической лаборатории

Биотехнологическая лаборатория представляет из себя просторное и изолированное помещение, которое оснащено современным оборудованием и

реактивами высокого качества. Для того, чтобы проведение дезинфекции не вызывало затруднений, в лабораторных помещениях потолки, полы и стены покрыты водостойкими и устойчивыми к ультрафиолету покрытиями.

В лаборатории имеются моечные раковины из специального кислотоустойчивого материала, с подведенной к ним холодной и горячей водой. Для биотехнологических работ необходима дистиллированная вода, в связи с чем каждая биотехнологическая лаборатория оснащена дистилляторной установкой.

Стерилизация инструментов в лаборатории проводится в сушильных шкафах, поддерживающих режим сушки при 170°C, а стерилизация посуды в режиме от 100 до 130°C. В лаборатории также имеются шкафы для хранения чистых инструментов и посуды, вытяжные шкафы с экстракторами, разные моющие средства и емкости для них.

Для выполнения биотехнологических работ в лаборатории используют необходимую лабораторную посуду и инструменты: мерные стаканы, колбы, цилиндры, пробирки, пипетки, дозаторы, чашки Петри, стеклянные палочки, мембранные фильтры, ножницы, ножи, препаровальные иглы, ланцеты, бумага (фильтрованная, пергаментная, оберточная), фольга, марля и другие [15].

Для процесса приготовления питательной среды используют лабораторные столы, холодильники для хранения растворов солей, лабораторные электронные весы, магнитные мешалки, рН-метры, газовые горелки, посуда (стаканы, колбы, пробирки, мерные цилиндры и другие), витамины, фитогормоны, химические реактивы, среды в виде порошков, агар в виде порошка, сахароза или же глюкоза.

Стерилизация в лабораторных условиях проводится при помощи автоклава, который работает при температуре 120°C и атмосферном давлении 1-2 Па. Также в лабораторном помещении размещены шкафы для хранения стерилизованных материалов и стеллажи для штативов с питательными средами. Вдобавок помещение снабжено канализационным сливом для отвода конденсата из автоклава и приточно-вытяжной вентиляцией.

Для процесса посадки эксплантов на питательную имеется определенное лабораторное оборудование. Таким оборудованием является ламинарный бокс. В него нагнетается стерильный воздух, который проходит через бактериальные фильтры. Ламинарный бокс находится в отдельной комнате лаборатории.

В помещении где проводится процесс культивирование находятся стеллажи, на которых размещаются штативы с культивируемым растительным материалом; световое отделение, поддерживающее нужный спектр света; кондиционер, отвечающий за регулицию температуры и влажности воздуха. Еще одним не менее важным оборудованием является термостат, он необходим для культивирования уже посаженного на питательную среду растительного материала. Термостат создает и поддерживает во всей камере выбранный температурный режим и тем самым способствует росту и развитию посаженных на среду эксплантов.

2 Ботаническая характеристика лилий

Лилии принадлежат семейству лилейных *Lilium L.*, которые являются однодольными растениями. Луковицы у лилий чаще рыхлые и состоят из чешуй. В зависимости от вида лилии их чешуи имеют разные формы и количество, а также различается плотность их размещения по отношению друг к другу. По цвету луковицы бывают разные: белые, розовые, розовато-коричневые, темно фиолетовые и другие.

Размер луковиц различен у разных видов лилий и их размер находится в диапазоне от 1 до 30 см в диаметр. Луковицы некоторых видов лилий хорошо переносят низкие температуры от -15 до -35°C [16].

В нижней части луковиц лилий имеется выпуклое цилиндрическое или конусовидное донце. Именно из этого донца происходит формирование и рост чешуек, а также корней растения. Если луковица взрослая, то она формирует дополнительные точки роста, из которых в дальнейшем прорастают новые луковички, которые называются дочерними. Такой процесс называется делением луковицы. Изначально дочерние луковички растут на материнском донце и внутри наружных луковиц, а после их увеличения в размерах и образования собственных корней они формируют свое гнездо [17].

У стебле-корневых видов лилий над стеблевыми корнями формируются маленькие луковички-детки, которые растут в пазухах опавших чешуй. Образование таких луковичек происходит в виде гнезда на поверхности почвы, либо в ее верхнем слое.

Кроме того, существуют виды лилий у которых происходит формирование воздушных бульбочек (стеблевые луковички) на стебле растения. После созревания они опадают и дальше растут самостоятельно [18].

Обычно одна луковица дает выход одного стебля, листа или же розетки. Если же образуются два или более стебля, это говорит о том, что произошел процесс деления луковицы у основания стебля.

Структура и длина корней у конкретного растения зависит от размера луковиц. Если луковицы крупные, то корни в длину достигают до 50 см, в диаметр 3 мм. У лилий с маленькими луковицами корни короткие и тонкие [19].

В зависимости от строения подземных частей лилии подразделяются на три группы:

- 1) Лилии, имеющие луковицу, которая дает лишь надземный стебель;
- 2) Лилии, имеющие столоны (подземные побеги). Столоны являются видоизмененными луковицами. Они имеют растянутое донце с редкими чешуйками и переходящее в побег, который заканчивается почкой. Из такой почки может образоваться надземное растение. Столоны имеют такую особенность, как способность к ветвлению и могут образовывать из-за этого несколько надземных стеблей.

- 3) Лилии, имеющие стебель, который при выходе из луковицы растет вбок под землей и выходит наружу лишь на расстоянии от 20 до 30 см от

луковицы. При этом на части стебля, которая находится под землей идет образование стеблевых корней и луковичек-деток.

По форме стебли у лилий различают чаще всего круглые и четырехгранные, встречающиеся лишь у некоторых видов лилий. За счет процесса гибридизации, осуществляемого селекционерами и биотехнологами, во многих случаях появляются ребристые и плоские по форме стебли.

На стеблях лилий содержится один или же несколько цветков. Высота стеблей варьирует от 5 см (альпийские лилии) до 4 м (гигантские лилии).

Листья лилий по форме разнообразны. Они могут быть вытянутыми, ланцетными, эллипсовидными, сердцевидными или яйцевидными. В зависимости от вида данного растения длина листьев варьирует от 1 до 15 см, а в ширину от 2 мм до 8 см. По внешней структуре листья лилий могут быть матовыми или глянцевыми. Жилкование у листьев чаще всего параллельное.

Строение цветков у лилии представляет собой шесть крупных, насыщенных по цвету долей околоцветника, наличие шести тычинок с крупными и яркими по окрасу пыльниками и одним пестиком, имеющим верхнюю завязь. В свою очередь пестик состоит из завязи, которая имеет семяпочки; шести плодолистиков; столбика с трехлопастным рыльцем. По форме цветки у лилий бывают трубчатые, звездообразные, колокольчатые, чашевидные, воронковидные и чалмообразные.

Плод лилии - трехгнездная коробочка. Эта коробочка раскрывается после процесса созревания. Семена у лилии плоские и небольших размеров.

Цветки лилий чаще всего собраны в соцветия. Они могут состоять из простых или сложных зонтиков либо кистей, обычно идущих в несколько ярусов. Соцветия в виде кисти обладают пирамидной формой. А соцветия зонтики имеют канделябровую форму [20].

3 Результаты исследований и их обсуждение

3.1 Материалы и методы

В качестве объекта исследований для введения в культуру *in vitro* были использованы луковицы и части бутонов лилий сортов Nepal и Lollypop. В качестве эксплантов были использованы различные части чешуек, как рекомендуется в научной статье Соколова Р.Н. [21], а также части пестика, стеблей, листьев и лепестков по рекомендациям работы Набиевой А.Ю. [22].

Стерилизацию эксплантов проводили различными способами с применением 70% этанола, 50% раствора гипохлорита натрия, 3% раствора перекиси водорода и их комбинаций.

В качестве питательной среды была использована минеральная основа питательной среды Мурасиге – Скуга [23]. При микроклональном размножении растений лилии чаще всего используется гормон - α -нафтилуксусная кислота [24], тогда как 6-бензиладенин не оказывает особого влияния на регенерацию луковичек [25]. В качестве источника углерода использовалась сахароза в концентрации 30-60 г/л. Для получения полутвердой питательной среды применяли агар-агар марки «Vasto agar» в концентрации 6-8 г/л.

3.2 Подбор оптимальных условий стерилизации эксплантов

Этап подбора оптимальных условий стерилизации эксплантов является одним из самых важных и сложных, так как поверхностные ткани растения могут быть заражены бактериями или же грибами. Для каждого вида экспланта растения лилии подбирается индивидуальный способ стерилизации.

Подбор оптимального варианта стерилизации для каждого вида экспланта проводили в нескольких вариантах, в которых варьирующими факторами выступали стерилизующие вещества - перекись водорода, гипохлорит натрия, этиловый спирт и их сочетание, а также продолжительность этапов стерилизации.

Было проведено три варианта стерилизации чешуек луковиц:

1 вариант - Промывание в мыльном растворе в течение 30 мин, под проточной водой, в 3% растворе перекиси водорода - 2 мин, с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 5 минут.

2 вариант - Промывание в мыльном растворе в течение 20 мин, под проточной водой, в 50% растворе гипохлорита натрия - 2 мин, в 3% растворе перекиси водорода - 5 мин, с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 5 минут.

3 вариант - Промывание в мыльном растворе в течение 20 мин, под проточной водой, в 50% растворе гипохлорита натрия - 3 мин, в 70% этиловом спирте - 2 мин, в перекиси водорода 3% - 3 мин, с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 5 минут.

По результатам исследования первый способ стерилизации чешуек луковиц не обеспечил стерильность материала и привел к заражению всех 50 эксплантов (100%), третий способ прошел с заражением 46 эксплантов (92%). Второй способ оказался наиболее эффективным для чешуек луковиц, как видно из представленных на рисунке 1 результатов, где выход стерильных эксплантов составил 94%.

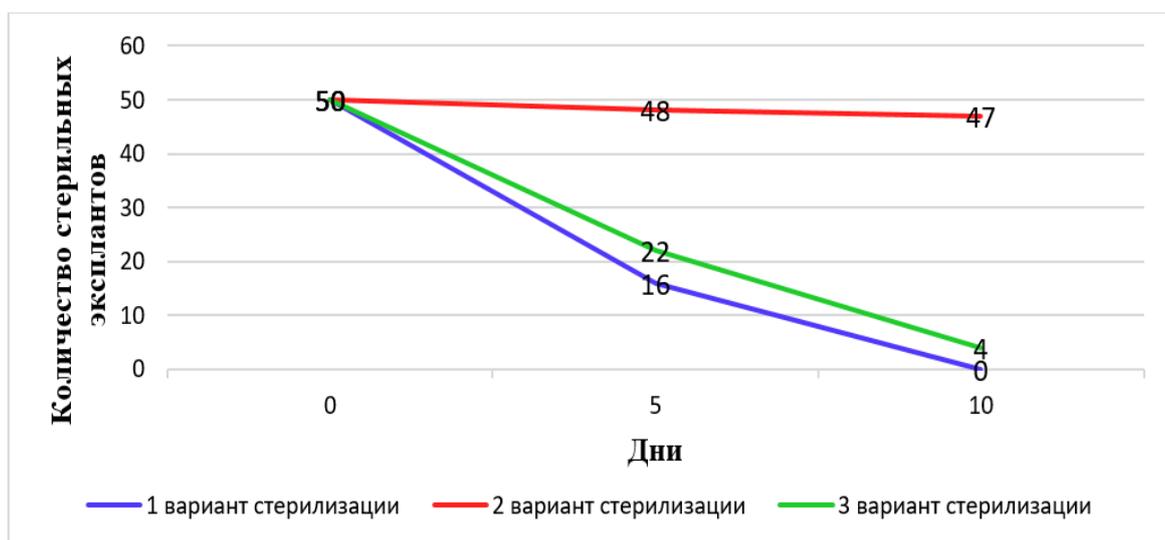


Рисунок 1 – График процесса получения стерильных эксплантов чешуек луковиц

Было проведено два варианта стерилизации пестика:

1 вариант - Промывание в 50% растворе гипохлорита натрия -1 мин, в 70% этиловом спирте - 1,5 мин, промывание на три раза стерильной дистиллированной водой.

2 вариант - Промывание в 50% растворе гипохлорита натрия – 1,5 мин, в 70% этиловом спирте – 2 мин, промывание на три раза стерильной дистиллированной водой.

По результатам оценки эффективности стерилизации пестичных эксплантов представленных на рисунке 2, установлено, что из двух способов, оптимальным вариантом стерилизации является первый вариант, где выход стерильных эксплантов составил 95%. Во втором варианте выход стерильных эксплантов был всего лишь 7%.

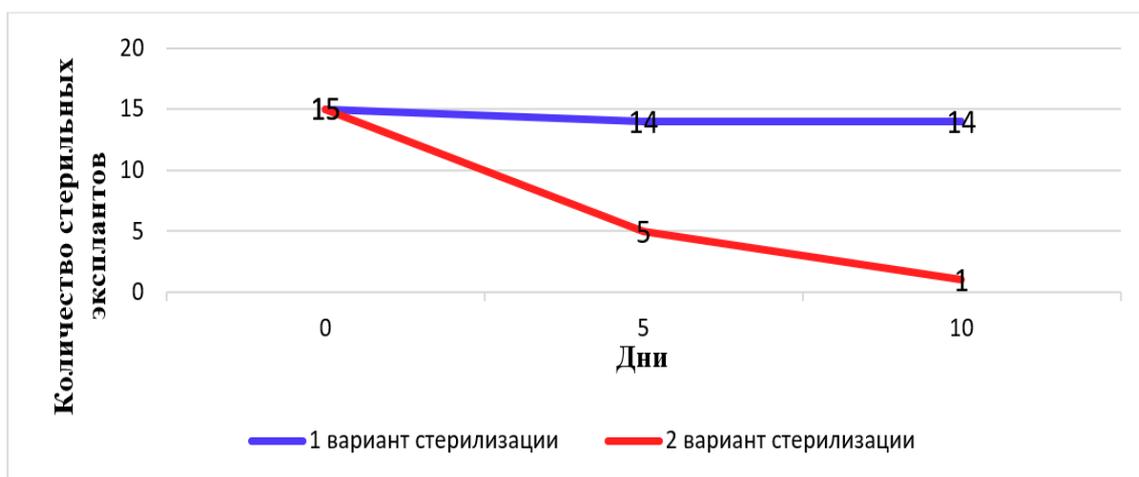


Рисунок 2 – График процесса получения стерильных эксплантов пестиков

Далее, нами был проведен этап подбора метода стерилизации для листьев, лепестков и стеблей. Было опробовано три варианта стерилизации:

1 вариант - Промывание в 50% растворе гипохлорита натрия – 3 мин, в 70% этиловом спирте – 2,5 мин, в 3% растворе перекиси водорода - 3 мин, с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 5 минут.

2 вариант - Промывание в 50% растворе гипохлорита натрия – 1 мин, в 70% этиловом спирте – 1,5 мин, в 3% растворе перекиси водорода - 2 мин, с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 5 минут.

3 вариант - Промывание в 50% растворе гипохлорита натрия – 2,5 мин, в 70% этиловом спирте – 2,5 мин, с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 5 минут.

По результатам проведенных опытов ни один из способов стерилизации таких эксплантов, как листья, лепестки и стебли не был идеальным.

Итоги исследования по подбору оптимального метода стерилизации эксплантов из частей листьев, как это показано на рисунке 3, являются таковыми: по первому способу стерилизации листьев выход стерильных эксплантов составил 12%, по второму способу стерилизации – 9%, а по третьему способу – 4%.

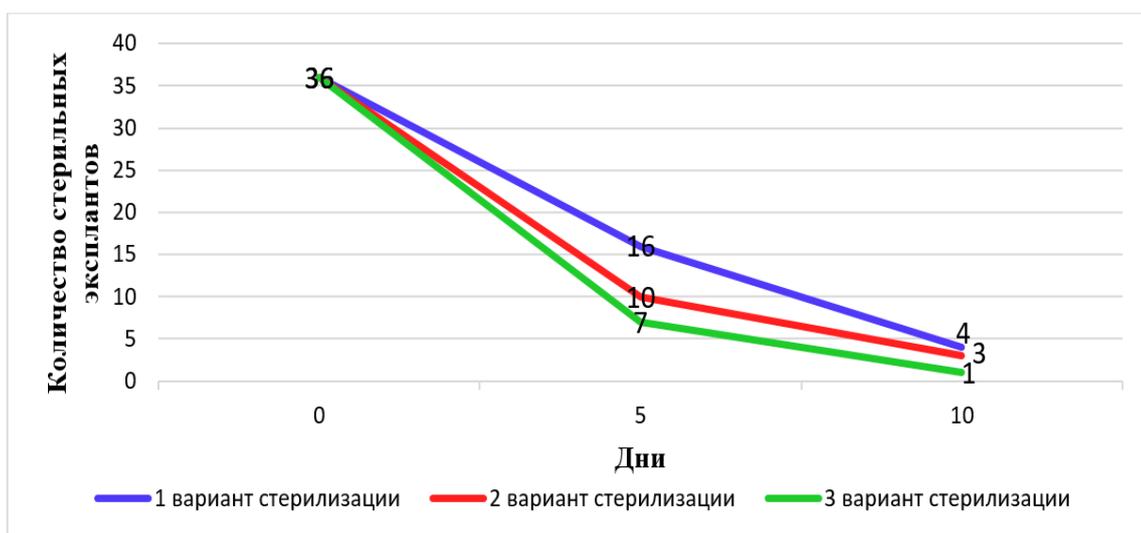


Рисунок 3 – График процесса получения стерильных эксплантов листьев

Полученные результаты экспериментов по подбору метода стерилизации, эксплантов лепестков представлены на рисунке 4, и по первому способу составили 12%, по второму способу – 8%, по третьему – 4%.

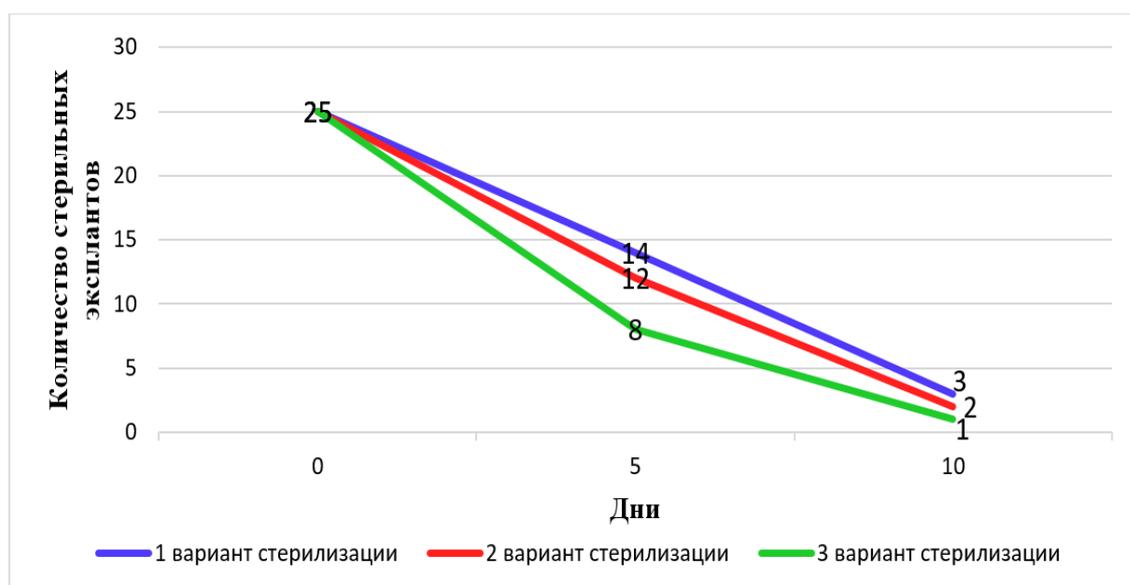


Рисунок 4 – График процесса получения стерильных эксплантов лепестков

Для исследований, касающихся подбора условий стерилизации для эксплантов, взятых из стеблевого материала, были получены следующие результаты: по первому способу стерилизации выход стерильных эксплантов составил 14%, по второму способу – 10% и по третьему способу – 0%, которые показаны на рисунке 5.

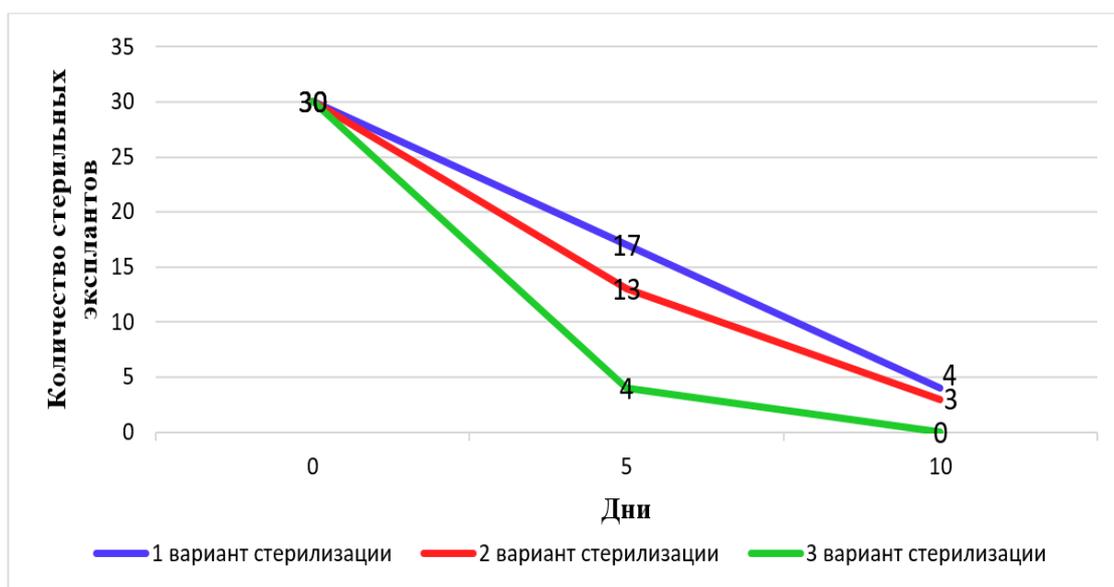


Рисунок 5 – График процесса получения стерильных эксплантов стеблей

На основании сравнения полученных результатов стерилизации всех эксплантов нами были сделаны выводы, что для чешуек луковиц оптимальным будет второй способ стерилизации: промывание в мыльном растворе в течение 20 мин, под проточной водой, в 50% растворе гипохлорита натрия -2 мин, в 3% растворе перекиси водорода - 5 мин, с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 5 минут. Для эксплантов пестиков оптимальным является первый способ: промывка в 50% растворе гипохлорита натрия -1 мин, в 70% этиловом спирте - 1,5 мин, промывание на три раза стерильной дистиллированной водой. Для таких частей растений, как листья, лепестки и стебли оптимальный вариант стерилизации подобрать не удалось.

3.3 Подбор оптимальных питательных сред

Вторым не менее важным этапом является подбор оптимальных питательных сред. От правильного подбора оптимальной питательной среды зависит дальнейший успех процесса культивирования эксплантов.

Процесс приготовления питательной среды в лабораторных условиях:

1) Взвешивают: 4,33 грамма сухой смеси среды Мурасиге-Скуга, 30 г сахарозы, 7 г сухой смеси агар - агар.

2) Растворяют МС, агар и сахарозу в 800 мл дистиллированной воды.

3) Добавляют в раствор 5 мл смеси витаминов, состоящую из В₁, В₂, В₆, РР.

4) Перемешивают на магнитной мешалке.

5) Добавляют ауксин – НУК (0,1 мл) и цитокинин – БАП (0,1мл).

4) Перемешивают на магнитной мешалке.

5) Доводят объем дистиллированной воды до 1 л.

6) Измеряют рН питательной среды.

7) Проводят автоклавирование питательной среды.

Для оптимизации и подбора условий культивирования эксплантов лилий были использованы четыре варианта питательных сред МС:

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

2 вариант - МС – 4,33 г/л, витамины 5 мг/л (В₁, В₂, В₆, РР), сахараза 60 г/л, НУК - 0,5 мг/л, агар – 7 г/л, рН=5,7.

3 вариант - МС – 4,33 г/л, витамины 5 мг/л (В₁, В₂, В₆, РР), сахараза 30 г/л, ИМК - 0,3 мг/л, БАП - 1 мг/л, агар – 7 г/л, рН=5,7.

4 вариант - МС – 4,33 г/л, витамины 5 мг/л (В₁, В₂, В₆, РР), глюкоза 40 г/л, НУК - 0,1 мг/л, БАП – 0,1 мг/л, агар – 7 г/л, рН=5,7.

В результате исследований установлено, что наиболее оптимальной средой для таких эксплантов как части чешуек луковиц и пестика, оказались два варианта сред МС: первый вариант МС с содержанием 0,1 НУК и сахаразы- 30 г/л, и второй вариант МС с содержанием 0,5 НУК и сахаразы 60 г/л, которые представлены на рисунке 6 - а, б. На питательных средах МС третьего и МС четвертого вариантов, посаженный материал эксплантов некротизировался и не показывал морфологических изменений на протяжении всего эксперимента.

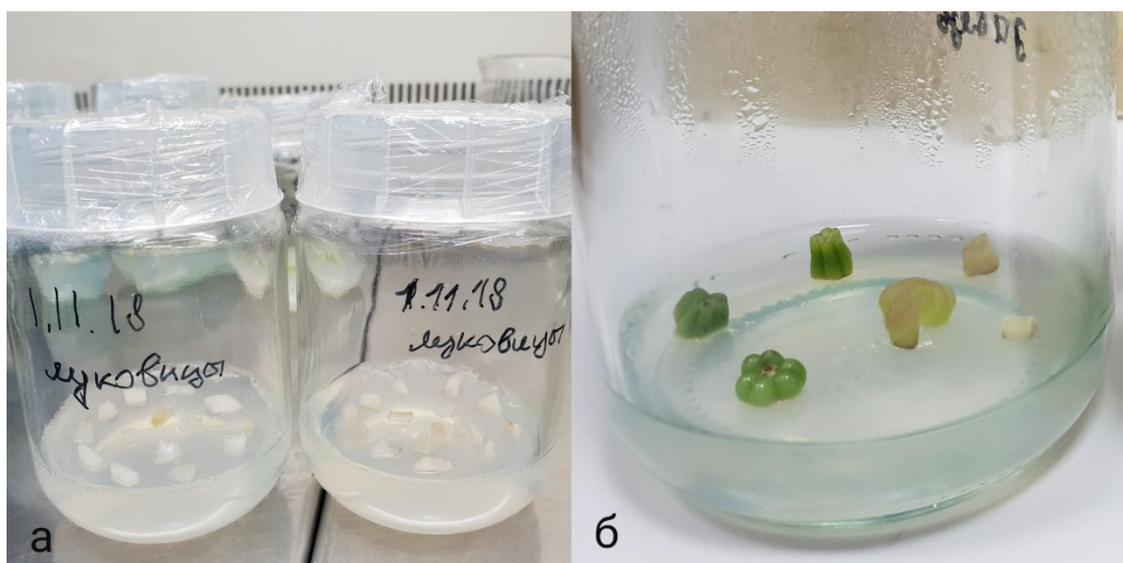


Рисунок 6 – Посаженный растительный материал на питательную среду

а – высаженные чешуи луковиц

б – высаженные части пестика

3.4 Особенности культивирования в условиях *in vitro*

Культивирование эксплантов чешуек луковиц проводили в термостате при температуре 26°C, без освещения. В то время как экспланты пестиков культивировались на стеллажах при освещении. Через 14-21 день после высадки эксплантов на оптимизированную среду МС нами был отмечен первичный рост

новых луковиц на чешуйках, как видно на рисунке 7(а), и набухание завязей пестиков, представленных на рисунке 7(б). Через 35 дней после высадки эксплантов, увеличившиеся в размере луковицы, показанные на рисунке 8(а), пересаживались на новые питательные среды, изображенные на рисунке 9, для их дальнейшего роста. В этот же период на питательных средах с эксплантами завязей пестиков наблюдалось образование каллуса, как это продемонстрировано на рисунке 8(б).

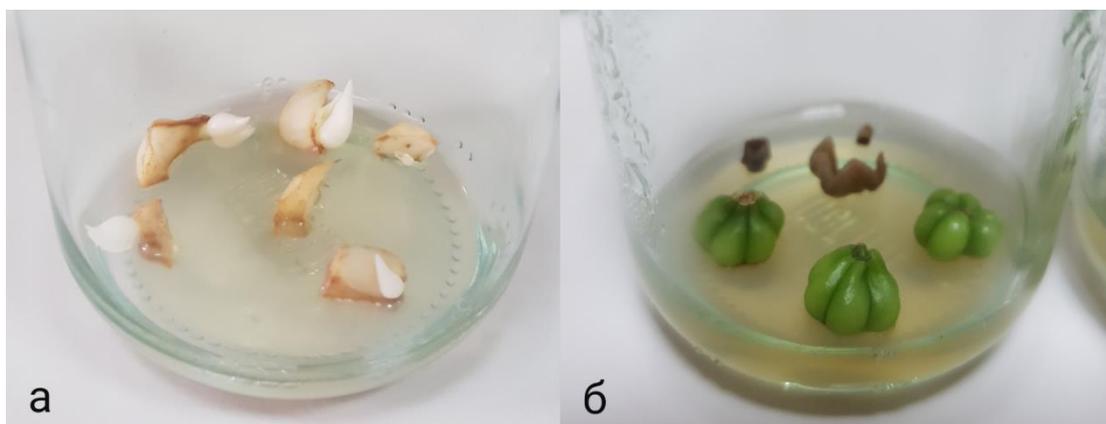


Рисунок 7 – Результаты роста эксплантов на 14-21 день
а - образование новых луковиц на чешуйках
б - набухшие завязи пестика

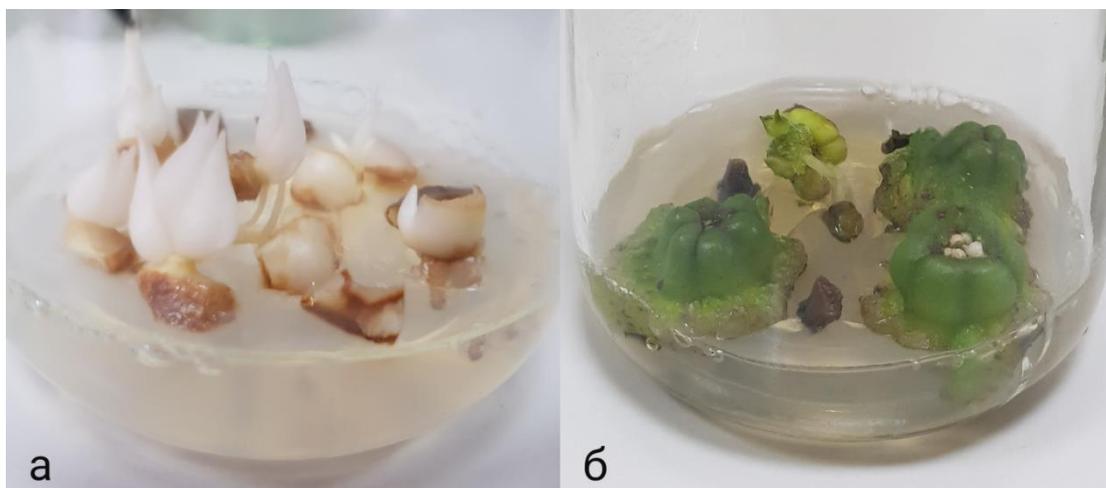


Рисунок 8 – Результаты роста эксплантов на 35 день
а - увеличившиеся луковицы
б - образование каллуса из завязей пестика



Рисунок 9 – Рост луковиц на свежих питательных средах

Таким образом, в ходе исследований был подобран оптимальный и высокоэффективный метод стерилизации растительных эксплантов луковиц и пестиков лилий, а также подобраны оптимальные варианты питательных сред для культивирования лилий двух сортов Nepal и Lollypop в условиях *in vitro*. Установлено, что при культивировании на питательной среде МС первого варианта, с содержанием 0,1 НУК и сахарозы - 30 г/л, из эксплантов чешуек луковиц идет образование новых луковиц растения, а из эксплантов пестиков на питательной среде МС второго варианта, с содержанием 0,5 НУК и 60 г/л сахарозы, происходит образование каллуса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов проведенных исследований был подобран и оптимизирован метод по введению в культуру *in vitro* для дальнейшего микрোকлонального размножения растений лилий *Lilium L.*, голландских сортов *Nepal* и *Lollypop*:

1) Был проведен подбор оптимальных условий стерилизации таких эксплантов, как чешуи луковиц и завязей пестика. Для чешуек луковиц оптимальной стерилизацией является: промывание в мыльном растворе в течение 20 мин, под проточной водой, в 50% растворе гипохлорита натрия - 2 мин, в 3% растворе перекиси водорода - 5 мин, с последующим трехкратным промыванием дистиллированной водой в течение 5 минут. Оптимальная стерилизация для пестиков: промывание в 50% растворе гипохлорита натрия - 1 мин, в 70% этиловом спирте - 1,5 мин, трехкратное промывание стерильной дистиллированной водой.

2) Были подобраны варианты оптимальных питательных среды МС для культивирования таких эксплантов, как части чешуек луковиц и пестика. Для чешуек луковиц оптимальной питательной средой является первый вариант МС, с содержанием 0,1 НУК и 0,1 БАП, а также сахарозы - 30 г/л. Оптимальной питательной средой для завязей пестика является второй вариант МС, которая содержит 0,5 НУК и сахарозы 60 г/л.

3) Изучены особенности роста и развития растений в ходе процесса культивирования и установлено, что при культивировании на питательной среде МС первого варианта, с содержанием 0,1 НУК и сахарозы - 30 г/л, из эксплантов чешуек луковиц на 14 сутки начинается органогенез новых луковиц растения, а на 21 сутки из эксплантов пестиков на питательной среде МС второго варианта, с содержанием 0,5 НУК и 60 г/л сахарозы, происходит процесс каллусогенеза.

ПЕРЕЧЕНЬ ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

МС – питательная среда Мурасиге – Скуга
НУК – α -нафтилуксусная кислота
ИУК – индолилуксусная кислота
ИМК – индолилмасляная кислота
6-БАП – 6-бензиламинопурин
В₁ – тиамин
В₂ – рибофлавин
В₆ – пиридоксин
РР – никотиновая кислота
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК – рибонуклеиновая кислота
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
ФМК – фенилмасляная кислота
ФУК – фенилуксусная кислота

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Егорова Т.А. Основы биотехнологии: учебное пособие для высш. пед. учеб. завед. / Т.А. Егорова Т.А., С.М. Клунова, Е.А. Живухина. - М.: Издательский центр «Академия», 2003. - 208 с.
- 2 Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений / Г.Ж. Валиханова. - Алматы: Конжык, 1996. - 272 с.
- 3 Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие. / Р.Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1991. – 160 с.
- 4 Калашникова Е.А. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов клеточной и генной инженерии. Учебное пособие / Е.А. Калашникова, А.Р. Родин. - Москва, 2001. – 71 с.
- 5 Валиханова Г.Ж. Культура клеток и биотехнология растений. Учебное пособие / Г.Ж. Валиханова, И.Р. Рахимбаев. - Алма-Ата: издательство КазГУ, 1989. - 80 с
- 6 Загоскина Н.В. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко. – М.: Оникс, 2009. – 496 с.
- 7 Бутенко Р.Г. Биотехнология. Книга 3: Клеточная инженерия / Р.Г. Бутенко, М.Ф. Гусев, А.Ф. Киркин, Т.Г. Корженевская, Е.Н. Маркарова - М.: Высшая школа, 1987. – 127 с.
- 8 Катаева, Н.В. Клональное микроразмножение растений / Н.В. Катаева, Р.Г. Бутенко. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
- 9 Pierik, R. L. *In vitro* culture of higher plants / R. L. Pierik // Lordrecht: M. wijhoffPubl. -1987. - 344 p.
- 10 Павловская Н.Е., Введение в сельскохозяйственную биотехнологию: Учебное пособие / Н.Е. Павловская, Л.В. Голышкина, - Орел: Изд-во ОГСХА, 1998. – 204 с.
- 11 Шевелуха В.С. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб./, В.С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев – М.: Высшая школа, 1998. – 416с.
- 12 Тимофеева О.А. Клональное микроразмножение растений: Учебно-методическое пособие / О.А. Тимофеева, Ю.Ю Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. - 56 с.
- 13 Константинова Т.Н., Аксенова Н.П., Сергеева Л.И., Чайлахян М.Х. Взаимное влияние света и гормонов на регуляцию морфогенетических процессов в культуре *in vitro*. // Физиология растений. 1998. Т. 34, № 4. - С. 795-802.
- 14 Бекер М.Е. Биотехнология / М.Е. Бекер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис. – М.: Агропромиздат, 1990. – 254 с.
- 15 Бирюков В.С. Основы промышленной биотехнологии / В.С. Бирюков. - М.: КолосС, 2004. – 296 с.
- 16 Жмылев, П.Ю. Биоморфология растений: иллюстрированный словарь / П.Ю. Жмылев; под общ. ред. П.Ю. Жмылева. – М., 2002. – 240 с.

- 17 Еленевский А.Г. Ботаника. Систематика высших, или наземных, растений: учеб. для студ. высш. пед. учеб. заведений / А.Г. Еленевский, М.П. Соловьева, В.Н. Тихомиров. – 4-е изд., испр. – М. Издательский центр «Академия», 2006. – 464 с.
- 18 Блукет Н.А. Ботаника с основами физиологии растений и микробиологии / Н.А. Блукет, В.Т. Емцев. – М. Колос, 2007. – 560 с.
- 19 Лебедев, С.И. Физиология растений / С.И. Лебедев. – М.: Колос, 2008. – 544 с.
- 20 Заливский И.Л. Лилии / И. Л. Заливский. - Москва: Государственное издательство сельской литературы, 1959 г. - с. 112.
- 21 Соколов Р.Н. Введение в культуру *in vitro* некоторых редких и исчезающих видов флоры Западного Кавказа / Р.Н. Соколов, Т.М, Коломиец, В.И. Маляровская // Научный журнал КубГАУ. – 2013. -№ 94(10)
- 22 Набиева А.Ю. Размножение в культуре *in vitro* *Lilium serotinum* Kom., *Lilium distichum* Nakai. и *Lilium pumilum* Delile при использовании эксплантов тканей и органов цветка. / А.Ю Набиева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. -№6. – С. – 618.
- 23 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.
- 24 Валиханова Г.Ж. Культура клеток и биотехнология растений. Учебное пособие / Г.Ж. Валиханова, И.Р. Рахимбаев. - Алма-Ата: издательство КазГУ, 1989. - 80 с.
- 25 Французенок В.В. Совершенствование методов микрклонального размножения лилий: автореферат дис. кандидата сельскохозяйственных наук: 06.01.05. / В.В. Французенок - Горки, 1997. - 22 с.

Краткий отчет



Университет:	Satbayev University
Название:	Размножение лилий в культуре in vitro
Автор:	Марюхина Лилия Александровна
Координатор:	Наталья Малахова
Дата отчета:	2019-04-24 08:52:42
Коэффициент подобия № 1: ?	3,7%
Коэффициент подобия № 2: ?	0,0%
Длина фразы для коэффициента подобия № 2: ?	25
Количество слов:	7 908
Число знаков:	59 641
Адреса пропущенные при проверке:	
Количество завершенных проверок: ?	2

! 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 6