

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ АСЕПТИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ
В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* ПАВЛОВНИИ ВОЙЛОЧНОЙ**

Е.В. Копытник, 3 курс, Т.В. Герасимович, мл. научный сотрудник
Научный руководитель – Н.В. Водчиц, заведующий отраслевой лабораторией ДНК
и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве
Полесский государственный университет

Введение. Павловния войлочная – листопадное дерево родом из стран Юго-Восточной Азии. Древесину Павловнии используют для изготовления краснодеревных изделий, облицовки выдвижных мебельных ящиков, музыкальных инструментов, для выработки сверхтонкого шпона. Кроме того, Павловния представляет интерес для культивирования с целью производства древесных топливных гранул – пеллет, так как при содержании в порослевой культуре она проявляет высокую побегообразовательную способность [1].

В связи с высокой ценностью дерева, возникает потребность в производстве его плантационных количеств. Этого можно достичь только с помощью микроклонального тиражирования, т.е. размножения в условиях *in vitro* [2].

Клонирование ценных сортов, подвоев, уникальных форм из минимального количества исходного материала, а также генеративное размножение в культуре *in vitro*, по сравнению с традиционным (вегетативным) методом размножения имеет ряд преимуществ: возможность получать саженцы круглый год независимо от сезона; сокращение селекционного процесса за счет отбора форм по нужным признакам; высокий коэффициент размножения [3]. Растения, полученные методом культуры *in vitro* абсолютно свободны от болезней и вирусов; генетически однородны и развиваются быстрее [4].

Цель работы: провести сравнительный анализ способов асептического введения в культуру *in vitro* Павловнии войлочной.

Материалы и методы исследования. Исследования проводили на базе отраслевой лаборатории ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве биотехнологического факультета УО «Полесский государственный университет» в июле – декабре 2019 года.

В качестве объекта исследований использовали внешне однотипные стерильные семена Павловнии войлочной и неодревесневшие, верхушечные фрагменты стебля длиной 15 мм с 1–2 почками в количестве 20 шт. Для ввода их в культуру *in vitro* были использованы растворы фунгицидов и стерилизующий агент 7,5% раствор гипохлорита кальция [5].

После стерилизации и отмывки семена проращивали в банках. В обоих случаях экспланты высаживали на питательную агаризованную среду Мурасиге-Скуга (MS) с нашими модификациями и среду Андерсона. В качестве регулятора роста в среду MS добавляли 6-бензиламинопурин (БАП).

Образовавшиеся при стерильном проращивании побеги были поделены на экспланты, а затем снова помещены на ту же питательную среду.

Банки с семенами и побегами размещали на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16/8 ч, освещенности 4000 лк, относительной влажности воздуха 70%.

Учет количества проросших семян проводили через каждые 10 дней в течение четырех месяцев культивирования на стеллажах световой.

Результаты и их обсуждение. В качестве первичных эксплантов для введения растений в культуру *in vitro* возможно использование различных тканей и органов растений, в том числе и семенного материала [6].

В лабораторных условиях при обычных методах проращивания нестерильных семян на влажной фильтровальной бумаге часто происходит контаминация всходов, что крайне нежелательно. Использование методов стерилизации при проращивании семян *in vitro* является перспективным подходом и позволяет снизить степень зараженности первичных эксплантов [7].

В настоящий момент не существует унифицированной методики введения в стерильные условия пророщенных семян для многих видов растений [6].

На первом этапе оптимальный режим стерилизации определяется экспериментальным путем. В качестве стерилизующего агента нами был выбран 7,5%-ный раствор гипохлорита натрия и фунгициды Ридомил Голд и Байтан, т.к. в предыдущих работах данный метод оказался наиболее эффективным [5].

Стерильные семена начали прорасти на шестой день от начала эксперимента. На 10 сутки число семян, нормально проросших относительно общего количества, заложенного в пробе, составило 76% (рис.).



Рисунок – Проросшие стерильные семена Павловнии

Далее проростки высаживали на питательную среду. Огромное значение для успешного микро-размножения имеет состав питательной среды в каждой из фаз развития растений [1].

Важную роль в индукции деления клеток экспланта играют минеральный состав среды, источник углеродного питания, регуляторы роста и экологические факторы [8].

Среда Мурасиге и Скуга, которая наиболее часто используется для инициации, роста и развития изолированных растительных тканей в условиях *in vitro*, содержит хорошо сбалансированный состав питательных веществ и отличается от других соотношением аммонийного и нитратного азота, которые стимулируют процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза [9].

В свою очередь среда Андерсона, помимо солей, содержит аденинсульфат, который является предшественником биосинтеза цитокининов и способствует регенерации растений из ткани эксплантов [8].

Дополнительно в среду MS мы добавляли цитокинин БАП в концентрации 1,0 мг/л

Показатели роста и активности эксплантов к пролиферации на среде Андерсона оказались значительно ниже, чем на среде Мурасиге-Скуга. По многочисленным исследованиям, применение среды MS является более предпочтительным, чем среды Андерсона: среда Мурасиге-Скуга увеличивает показатели приживаемости первичных эксплантов, коэффициент размножения и высоту растений в культуре *in vitro* [10, 11].

Дальнейшее микрочеренкования основного и дополнительного побегов *in vitro* обеспечило коэффициент размножения в первом цикле на среде MS до 1:8, на среде Андерсона – до 1:4.

Черенки побегов с почками после стерилизации культивировали на среде MS с добавлением гормон БАП в концентрации указанной выше. Наблюдалась хорошая пролиферативная активность, коэффициент размножения в дальнейшем составлял 1:3.

Заключение. В результате проведенного опыта лабораторная всхожесть стерильных семян Павловнии войлочной составила 76%.

Среда MS с добавлением БАП является оптимальной для культивирования эксплантов, полученных из семян и черенков с пазушными почками.

Использование стерильных семян на этапе ввода растений в культуру *in vitro* позволяет производить многочисленное потомство от одного материнского организма, что удобно для дальнейших этапов микроклонального размножения.

Список использованных источников

1. Шурганов, О. А. Разработка эффективной системы регенерации *Paulownia Shang Tong* (*P. fortunei* x *P. tomentosa*) / Б. В. Шурганов [и др.] // Вестник РУДН. Сер. Агронимия и животноводство. – 2015. – № 3. – С. 47–55.

2. Опыт микроклонального размножения Эхинацеи узколистной (*echinacea angustifolia d.c.*) / О. А. Землянухина [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 6 (Ч. 2) – С. 319-322.

3. Введение в культуру *in vitro* и микроклональное размножение перспективных сортов, клоновых подвоев и дикорастущих форм яблони / Н. В. Ромадонова [и др.] // Исследования, результаты. – 2013. – №3 (059). – С. 142–146.

4. Багдат, А. А. Оптимизация условий введения в культуру *in vitro* растений вида *Paulownia* / А. А. Багдат [и др.] // Международный студенческий научный вестник. – 2018. – № 4 (часть 3). – 183–189.

5. Жатько, К. И. Способ стерилизации эксплантов земляники (*Fragaria L.*) на этапе введения в культуру *in vitro* / К. И. Жатько [и др.] // Биотехнология: достижения и перспективы развития : материалы II Международной научно–практ. конф. Пинск, 7–8 дек. 2017 г. / ПолесГУ, редкол.:Шебеко К.К. (гл. ред.) [и др.]. – Пинск, 2017. – С. 8–10.

6. Кузнецова, Е. Н. Особенности прорастания семян редкого растения *asteramellus L.* в культуре *in vitro* / Е. Н. Кузнецова, О. Г. Баранова // Вестн. Удмуртского университета. – 2017. – № 3. – С. 409–411.

7. Полубоярова, Т. В. Проращивание семян дикорастущих видов луков рода *Allium L.* Подрода *melanocrommyum webb et berth.* В условиях *in vitro* / Т. В. Полубоярова, Т. И. Новикова // Вестн. Алтайского аграрного университета. – 2009. – № 1 (51). – С. 22–26.

8. Березина, Е. В. Морфологические особенности и синтез фенольных соединений и аскорбата микрорастениями клюквы крупноплодной при выращивании на питательных средах с разным минеральным, углеводным и гормональным составом / Е. В. Березина [и др.] // Вестн. Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. – 2014. – № 4 (1). – С. 202–209.

9. Широков, А. И. Основы биотехнологии растений : учеб-метод. пособие / А. И. Широков, Л. А. Крюков. – Нижний Новгород : Физические основы информационно-телекоммуникационных систем, 2012. – 49 с.

10. Беседина, Е. Н. Усовершенствование метода клонального микроразмножения подвоев яблони *in vitro* : дис. ... канд. биол. наук : 06.01.08 / Е. И. Беседина. – Краснодар, 2015. – 141 л.

11. Бунцевич, Л. Л. Разработка составов питательных сред для интродукции в культуру *in vitro* эксплантов сортов малины и крыжовника / Л. Л. Бунцевич [и др.] // Плодоводство и виноградарство юга России. – 2014. – № 28 (Ч. 4). – С. 123–133.