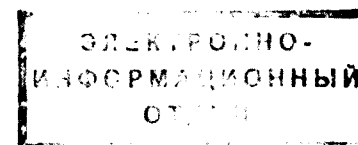


634.1
Ф91



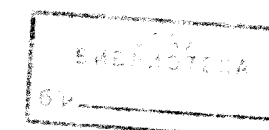
Фролова Людмила Владимировна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО
РАЗМНОЖЕНИЯ ВИШНИ И ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ
МЕТАЛЛОВ В КУЛЬТУРЕ IN VITRO**

Специальность 03.00.23 – биотехнология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата сельскохозяйственных наук

Орел – 2003



634.1 634.23:634.524.6:504.43.25
+ 91

Работа выполнена в кабинете биотехнологии при кафедре почвоведения и прикладной биологии
1999-2002 гг.

Членский лист А.В. уек, профессор,

Мир Техно-
Крестьян-
Всего Кредит
Технологии
in vitro

5/м, х наук

лекции плодовых растений

часов на заседании диссертационном аграрном университете
Орел ГАУ

АУ: г. Орел, Бульвар Победы
в двух экземплярах, за-

доцент

Макеева Т.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Вишня - косточковая плодовая культура, которая при правильном подборе сортов с учетом их биологических особенностей и соблюдении требований агротехники рентабельна и экономически выгодна.

В последний период произошло значительное снижение урожайности и сокращение площадей, занимаемых этой культурой. Одной из основных причин этого является широкое распространение опасных болезней и вирусных инфекций. В следствие этого создан острый дефицит посадочного материала (Жуков, Желтодубова, Степанова, Чмир, 1988; Кашин, Борисова, Павлова, 1998; Колесникова, Джигадло, 1998).

Для восстановления культуры необходимо не только иметь устойчивые к болезням сорта и подвои, но также внедрить в производство экономически эффективную технологию производства посадочного материала. Исключительно важное значение при этом приобретает использование микроклонального размножения, позволяющего резко повысить коэффициент размножения и производить оздоровленный посадочный материал (Колесникова, Колесников, Муханин, 1986; Джигадло, Джигадло, Голяева, 1988; Колесникова, Джигадло, 1998; Мотылева, Соснина, 1998).

Перспективность метода микроклонального размножения растений в системе производства оздоровленного посадочного материала высших категорий качества не вызывает сомнений (Джигадло, 1988; Высоцкий, 1998; Вовк, 2000). Микроклональное размножение вишни имеет ряд трудностей из-за их склонности к образованию мутантных клонов, что делает актуальной оптимизацию технологии на каждом этапе культивирования. Для успешного выращивания растений вишни в культуре in vitro необходимо адаптировать к ним наиболее применимые из существующих методик. При этом следует учитывать генетические особенности сортов. Очень важно подобрать оптимальный состав питательных сред, на которых можно успешно выращивать экспланты сортов в зависимости от их происхождения. Однако технологии, адаптированной к культуре вишни до сих пор не было.

В связи с техногенным загрязнением почв и воздуха ионами ТМ необходимо также вести отбор растений на устойчивость к действию ТМ, т.к. повышенные концентрации соединений ТМ оказывают отрицательное влияние на генотип растений и их состояние. Применение селективных питательных сред in vitro создает возможность ускоренной оценки растений вишни на устойчивость к действию ионов ТМ.

Оптимальные селективные питательные среды, содержащие ионы ТМ, могут позволить быстрее, чем в открытом грунте, выявить сорта, более устойчивые к воздействию неблагоприятных экологических факторов, пригодные для выращивания в зонах с повышенным загрязнением ТМ.

Цель и задачи исследований. Цель настоящей работы состояла в оптимизации технологии выращивания растений вишни методами верхушечных меристем in vitro, и выделении сортов устойчивых к повышенному содержанию ионов ТМ в почве.

В связи с этим необходимо было решить следующие задачи:

- разработать оптимальный способ поверхностной стерилизации эксплантов;
- выявить наиболее оптимальные сроки для введения меристем в культуру in vitro;
- подобрать оптимальный состав питательной среды для стимулирования пролиферации;

- изучить темпы развития микрорастений и процесса ризогенеза на средах Смирнова, Мурасиге и Скуга в зависимости от происхождения сортов;
- выделить сорта, устойчивые к действию повышенных концентраций ионов ТМ в почве.

Научная новизна и практическая значимость работы. Разработан эффективный способ стерилизации эксплантов, позволяющий сократить затраты времени на его подготовку для введения в культуру *in vitro*. Подобраны питательные среды, оптимальные для выращивания растений вишни и черешни из меристем на этапах пролиферации и ризогенеза *in vitro*. Установлено оптимальное число пассажей при микроклональном размножении вишни. Выявлены наиболее продуктивные сроки введения эксплантов вишни в культуру *in vitro*. Подобран состав питательной среды для стимулирования пролиферации и ризогенеза. Установлено, что на этапе укоренения более эффективной является среда Смирнова. Хорошие результаты дает использование среды Мурасиге и Скуга с добавлением ИМК-2мг/л + БАП-2мг/л с последующим помещением в холодильник через 2 суток после перевода на данную среду при температуре +3,5°C на срок 4 суток. Впервые исследовано влияние питательных сред Блейдза, Гамборга (В-5) и Шенка на выращивание районированных и перспективных сортов вишни селекции ВНИИСПК. Выявлено, что на этапе пролиферации наиболее эффективной для всех сортов вишни и черешни является среда Гамборга. Выявлена зависимость темпов развития микрорастений сортов на питательных средах *in vitro* от доминирования признаков видов.

Разработаны селективные питательные среды с содержанием ионов ТМ (Co, Zn, Pb), позволившие выявить сорта вишни, устойчивые к повышенному содержанию их, в культуре *in vitro*. Рекомендованы сорта для выращивания на загрязненных указанными ионами тяжелых металлов почвах.

Разработан экспресс-метод ориентировочной оценки устойчивости растений вишни к действию ионов ТМ, позволяющий проводить массовый отбор с минимальными затратами времени в условиях не требующих специального оборудования, помещения и профессиональной подготовки.

Апробация работы. Основные результаты исследований были доложены: на научных конференциях «Неделя науки ОГУ», 2001 и 2002гг.; на Всероссийской научно-практической конференции, посвященной памяти П.П. Семенова Тян-Шанского (16-18 мая 2002г) в г. Липецке; на научно-практической конференции в Великом Новгороде в марте 2002, на Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Социально экономическое развитие регионов: реальность и перспективы», 2003, г. Воронеж. Диссертация рассмотрена и рекомендована к защите расширенным заседанием ученого совета факультета естественных наук ОГУ.

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 5 научных работ.

Реализация результатов исследований. Полученные *in vitro* растения высажены в открытый грунт для создания маточника вишни высшей категории качества на агробиостанции ОГУ. Оптимизированная технология микроклонального размножения вишни использована в кабинете биотехнологии ОГУ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 146 страницах, состоит из введения, 5 глав, выводов и практических рекомендаций. Список использованной литературы содержит 203 наименования, в том числе 63 на иностранных языках. Работа содержит 24 таблицы и 33 рисунка.

Место проведения, материал и методика исследований. Исследования проводились в 1998-2002 годах в лаборатории биотехнологии Орловского государственного университета. В качестве объектов исследований были взяты сорта вишни: Антрацитовая, Быстринка, Гриот Остгеймский (клон 2), Жуковская, Журавушка, Кистевая, Комсомольская, Ливенская, Любская, Муза, Мценская, Новелла, Орлея, Орлица, Ровесница, Студенческая, Тихоновская, Трофимовская, Тургеневка, Шоколадница; районированный сорт черешни: Поззия, перспективные - Аделина, Сударовская, Фея.

Исследования проводили руководствуясь методикой: «Программа и методика селекции плодовых, ягодных и орехоплодных культур» (Орел, 1995).

Экспланты выделяли из апикальных и латеральных почек. Для поверхностной стерилизации применяли 0,1% раствор сулемы в течение 4 минут, с последующей двукратной промывкой автоклавированной бидистиллированной водой с экспозицией - 2 минуты.

При постановке опыта по изучению влияния питательных сред на этапе пролиферации были взяты следующие среды: Мурасиге и Скуга (MS) с половинной концентрацией NH_4 , MS без NH_4NO_3 , MS+KCl, MS+6-БАП - 1 мг/л, MS+6-БАП - 0,5 мг/л, Гамборга (В-5), Блейдза и Шенка. На этапе укоренения испытывали среды: MS+ИМК-1мг/л, MS+ИМК-2мг/л, MS+ИМК-2мг/л+БАП-2мг/л, MS+ИМК-2мг/л+БАП-2 мг/л + воздействие пониженных температур, Смирнова. В качестве контрольной питательной среды была взята среда MS. Наряду с указанными средами использовали разработанную нами селективную питательную среду MS с содержанием различных концентраций ионов ТМ для выявления сортов устойчивых к их действию. Микрорастения выращивали на селективных средах укоренения с ионами Zn, Co, Pb. Концентрации ионов выбраны с учетом норм ПДК почвы - Co - 5 мг/л, Zn - 23 мг/л, Pb - 6 мг/л (Перечень ПДК и ориентировочно допустимых количеств (ОДК) химических веществ в почве. М., 1991).

Варианты опыта:

Контроль - без ионов тяжелых металлов;

1 - Zn^{2+} , 43 мг/л, (\approx в 2 раза выше ПДК);

2 - Zn^{2+} , 430 мг/л, (\approx в 20 раз выше ПДК);

3 - Zn^{2+} , 1290 мг/л, (\approx в 60 раз выше ПДК);

4 - Zn^{2+} , 2150 мг/л, (\approx в 100 раз выше ПДК);

5 - Co^{2+} , 1 мг/л, (в 5 раз меньше ПДК);

6 - Co^{2+} , 5 мг/л, (равная ПДК);

7 - Co^{2+} , 10 мг/л, (в 2 раза выше ПДК);

8 - Co^{2+} , 100 мг/л, (в 20 раз выше ПДК);

9 - Pb^{2+} , 12 мг/л, (в 2 раза выше ПДК);

10 - Pb^{2+} , 120 мг/л, (в 20 раз выше ПДК).

В исследования были вовлечены сорта вишни: Тургеневка, Ровесница, Шоколадница, Гриот Остгеймский и Любская. Каждый вариант имел 10 культуральных сосудов. Первый учет состояния проводили через 10 дней после введения микрорастений на среду укоренения, второй - через 30 дней.

Проводили химический анализ частей микрорастений для определения количественного содержания ТМ. Анализ эксплантов и питательной среды на содержание ионов тяжелых металлов выполняли в лаборатории биохимии ВНИИСПК на жидком хроматографе «Миллихром-4» МУК 4.1 053 - 96. Экспланты и микрорастения культивировали при 12-часовом фотопериоде, освещенности 4500 люкс, $t = 25 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха 80%. Учитывали длину побегов, размер приростов, жизнеспособность микропобегов, размер и окраску листа, число листьев. Фенотипическую оценку полученных *in vitro* микрорастений, проводили по методике ВНИИС им. И.В. Мичурина (1980).