

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений

ГОРОШКО
Ольга Владимировна

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭТАПЫ
МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ
ЛИПЫ (*TILIA* L.) ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ЦБС НАН БЕЛАРУСИ

Аннотация к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Е.В.Спиридович

Допущена к защите
«___» _____ 2019 г.

Зав. кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений
кандидат биологических наук, доцент И.И. Смолич

Минск, 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень условных обозначений	4
Реферат	5
Рэферат	6
Abstract	7
Введение.....	8
Глава 1 Аналитический обзор литературы.....	10
1.1 Микрклональное размножение древесных и кустарниковых пород	10
1.1.1 Введение в культуру <i>in vitro</i>	10
1.1.2 Укоренение растений-регенерантов	11
1.1.3 Акклиматизация микрклональных регенерантов.....	13
1.2 Применение питательных сред на этапах <i>in vitro</i>	15
1.2.1 Компоненты питательной среды.....	15
1.2.2 Питательные среды применяемые для микроразмножения <i>Tillia</i> L.....	22
Глава 2 Материалы и методы.....	25
2.1 Объекты исследования	25
2.2 Оборудование, материалы, инструменты.....	25
2.3 Стерилизация.....	27
Глава 3 Результаты и обсуждение	29
3.1 Изучение влияния регуляторов роста на эффективность выгонки зелёных побегов липы	29
3.2 Разработка методики стерилизации растительного материала.....	31
3.2.1 Оценка эффективности стерилизующих агентов	31
3.2.2 Изучение эффективности стерилизации материала лип различного происхождения для инициации культуры ткани.....	33
3.3 Разработка методики инициации процессов морфоорганогенеза на эксплантах липы.....	35
3.3.1 Приёмы повышения жизнеспособности эксплантов липы	35
3.3.2 Подбор состава питательной среды для регенерации одноузловых эксплантов липы	36
3.4 Изучение морфологических отклонений <i>in vitro</i> видов липы различных таксонов.....	38
3.5 Оценка морфометрических параметров регенерантов липы на этапе стабилизации культуры <i>in vitro</i>	41
3.6 Влияние различных факторов на морфологию регенерантов и коэффициент мультипликации	43
3.7 Укоренение микропобегов на различных питательных средах	46
3.8 Адаптация микрорастений липы к <i>ex vitro</i> на искусственных субстратах.....	47

Заключение	50
Список использованных источников	52
Приложение А	61
Приложение Б	66

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 67 с., 3 рис., 18 табл., 62 источника, 2 приложения.
КУЛЬТУРА *IN VITRO*, *EX VITRO*, МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ,
ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА, *TILIA* L., СТЕРИЛИЗАЦИЯ, ЭКСПЛАНТ.

Объекты исследования: 4 таксона видовой коллекции лип Центрального ботанического сада НАН Беларуси: липа войлочная (*Tilia tomentosa*), липа американская, или черная (*Tilia Americana*), липа длинночерешковая (*Tilia petiolaris* DC.), липа европейская, форма разрезнолистная (*Tilia europaea* L.f.*Laciniata*) и 11 генотипов липы мелколистной (*Tilia cordata*) (включая 3 плюсовых дерева).

Цель: изучить влияние состава питательной среды на этапы микроклонального размножения некоторых видов рода Липа (*Tilia* L.) ЦБС НАН Беларуси.

Методы исследования: метод культуры клеток и тканей *in vitro*, морфометрический анализ, статистическая обработка данных.

В ходе экспериментов проведенных на базе лаборатории генетики и биотехнологии ГНУ «Институт леса НАН Беларуси» оптимизированы условия получения асептических культур отобранных объектов, выявлены особенности культивирования на этапах микроклонального размножения в зависимости от состава питательной среды и генотипа растений, получены асептические культуры с высоким морфогенетическим потенциалом.

Оптимальной питательной средой на этапе стабилизации культуры *in vitro* липы является среда Мурасиге - Скуга содержащая сахарозу (30,0 г/л), микробиологический агар-агар (8,0 г/л) с добавлением 6-БАП (0,5 мг/л), ТДЗ (0,1мг/л), ГК₃ (0,5 мг/л), ИМК (0,1 мг/л). Экспериментально установлено, что среди генотипов лип различных таксонов из коллекции ЦБС НАН Беларуси наименьший выход стабильных и жизнеспособных регенерантов отмечен для липы американской (34,8%), а наибольший - для липы войлочной (77,3%) и липы европейской разрезнолистной (62,5%). Наибольшая приживаемость микрорастений (до 90%) при акклиматизации отмечена при использовании искусственного субстрата на основе вермикулита, насыщенного комплексом минеральных солей по прописи WPM. Результаты работы по изучению эффективности стерилизации растительного материала *Tilia parvifolia* Ehrh. ex Hoffm. для инициации асептических культур доложены на XI Международной конференции «Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология» (г.Минск, 23 – 27 сентября 2018 г.). В практическом плане результаты исследований могут быть использованы для выращивания лип из коллекции ЦБС НАН Беларуси в промышленных масштабах для зелёного строительства, получения лекарственного сырья, длительного хранения меристем редких видов лип в генетическом банке стерильных культур и др.

РЭФЕРАТ

Дыпломная работа 67 с., 3 мал., 18 табл., 62 крыніц, 2 дадатка.
КУЛЬТУРА *IN VITRO*, *EX VITRO*, МІКРАКЛАНАЛЬНАЕ РАЗМНАЖЭННЕ,
ПАЖЫЎНОЕ АСЯРОДДЗЕ, *TILIA* L., СТЭРЫЛІЗАЦЫЯ, ЭКСПЛАНТ.

Аб'екты даследавання: 4 таксонаў відавой калекцыі ліпаў Цэнтральнага батанічнага саду НАН Беларусі: ліпа лямцавая (*Tilia tomentosa*), ліпа амерыканская, або чорная (*Tilia Americana*), ліпа длінначарашковая (*Tilia petiolaris* DC.), Ліпа еўрапейская, форма разрэсналістная (*Tilia europaea* L.f.*Laciniata*) і 11 генатыпаў ліпы дробналістай (*Tilia cordata*) (уключаючы 3 плюсовых дрэва).

Мэта: вывучыць уплыў складу пажыўнога асяроддзя на этапы мікракланальнага размнажэння відаў роду Ліпа (*Tilia* L.) ЦБС НАН Беларусі.

Метады даследавання: метады культуры клетак і тканін *in vitro*, марфаметрычны аналіз, статыстычная апрацоўка дадзеных.

У ходзе эксперыментаў праведзеных на базе лабараторыі генетыкі і біятэхналогіі ДНУ «Інстытут лесу НАН Беларусі» аптымізаваны ўмовы атрымання асептычных культур адабраных аб'ектаў, выяўлены асаблівасці культывавання на этапах мікракланальнага размнажэння ў залежнасці ад складу пажыўнога асяроддзя і генатыпу раслін, атрыманы асептычныя культуры з вялікім морфагенэтычным патэнцыялам.

Аптымальным пажыўным асяроддзем на этапе стабілізацыі культуры *in vitro* ліпы з'яўляецца асяроддзе Мурасіге - Скуга якое змяшчае цукрозу (30,0 г/л), мікрабіялагічны агар-агар (8,0 г/л) з даданнем 6-БАП (0,5 мг/л), ТДЗ (0,1 мг/л), ГК₃ (0,5 мг/л), ІМК (0,1 мг/л). Эксперыментальна ўсталявана, што сярод генатыпаў ліпаў розных таксонаў з калекцыі ЦБС НАН Беларусі найменшы выхад стабільных і жыццяздольных рэгенерантов адзначаны для ліпы амерыканскай (34,8%), а найбольшы - для ліпы лямцавай (77,3%) і ліпы еўрапейскай разрэзналістнай (62,5%). Найбольшая прыжывальнасць мікрараслін (да 90%) пры акліматызацыі адзначана пры выкарыстанні штучнага субстрата на аснове вермікуліту, насычанага комплексам мінеральных соляў па пропісу WPM. Вынікі працы па вывучэнню эфектыўнасці стэрылізацыі расліннага матэрыялу *Tilia parvifolia* Ehrh. ex Hoffm. для ініцыяцыі асептычных культур дакладзены на XI Міжнароднай канферэнцыі «Біялогія клетак раслін *in vitro* і біятэхналогія" (г. Мінск, 23 - 27 верасня 2018 г.). У практычным плане вынікі даследаванняў могуць быць выкарыстаны для вырошчвання ліпаў з калекцыі ЦБС НАН Беларусі ў прамысловых маштабах для зялёнага будаўніцтва, атрымання лекавай сыравіны, працяглага захоўвання мерыстэм рэдкіх відаў ліп у генетычным банку стэрыльных культур і інш.

ABSTRACT

Diploma work 67 p., 3 fig., 18 table., 62 sources, 2 annexes.

IN VITRO CULTURE, *EX VITRO*, MICROCLONAL PROPAGATION, CULTURE MEDIUM, *TILIA* L., STERILIZATION, EXPLANTS

Research objects: 4 taxa species of Linden trees of the collection of Central Botanical Gardens of NAS of Belarus: *silver* Linden (*Tilia tomentosa*), American Linden or Black Linden (*Tilia americana*), Linden long-petioles (*Tilia petiolaris* DC.), European Linden, dissected leaf form (*Tilia europaea* L. f. *Laciniata*) and 11 genotypes of small-leaved Linden (*Tilia cordata*), including 3 plus tree.

Objective: to study the influence of the composition of the culture medium on the stages of micropropagation some genus of the Linden species (*Tilia* L.) of the Central Botanical Garden of NAS of Belarus.

Research methods: *in vitro* cell and tissue culture method, morphometric analysis, statistical data analysis.

The experiments were carried out at the laboratory of genetics and biotechnology of State scientific institution «Forest Institute of the NAS of Belarus». The conditions for obtaining of aseptic cultures of selected objects were optimized, the features of cultivation at the stage of microclonal propagation depending on the culture medium composition and genotype of plant were revealed. Aseptic cultures with high morphogenetic potential were obtained.

The optimal nutrient medium at the stage of stabilization of *in vitro* culture of Linden is Murashige and Skoog basal medium, containing sucrose (30.0 g/l), microbiological agar (8.0 g/l) with the addition of 6-BAP (0.5 mg/l), TDZ (0.1 mg/l), GA₃ (0.5 mg/l), IBA (0.1 mg/l).

It was experimentally established that among the Linden genotypes of different taxa from the collection of the CBG of the NAS of Belarus the lowest yield of stable and viable regenerants was noted for the American Linden (34.8%), and the highest - for the *silver* Linden (77.3%) and European dissected leaf Linden (62.5%). The highest survival rate of microplants (up to 90%) during the acclimatization observed in the use of artificial substrate based on vermiculite saturated with WPM minerals and salts.

Results of the study of the effectiveness of *Tilia parvifolia* plant material sterilization for the aseptic cultures initiation were reported at the XI International conference "Plant cell Biology *in vitro* and biotechnology" (Minsk, 23-27 September 2018). In practical terms, the research results can be used to grow Linden from the collection of CBG of the NAS of Belarus on an industrial scale for landscaping, to obtain medicinal raw materials and long-term storage of rare species of Linden in a genetic bank of sterile crops.