

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

ДЕМЕШ
Ирина Юрьевна

**ПОЛУЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКИХ КУЛЬТУР И РАЗМНОЖЕНИЕ
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА ЛИПА (*TILIA*) В УСЛОВИЯХ *IN VITRO***

Аннотация дипломной работы

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

Допущена к защите
« ___ » _____ 2021 г.

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

Минск, 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	6
РЕФЕРАТ.....	7
РЭФЕРАТ.....	8
ABSTRACT.....	9
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1 ОБЗОР И АНАЛИЗ ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1 Глобальное биоразнообразие.....	13
1.2 Деградация биоразнообразия.....	15
1.3. Стратегии сохранения биоразнообразия.....	16
1.4. Методы сохранения растений.....	17
1.5 Биотехнология.....	19
1.6 Культура растительных тканей.....	19
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	25
2.1 Описание объекта исследования.....	25
2.2 Основное оборудование, инструменты, материалы, необходимые для клонального микроразмножения.....	26
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	28
3.1 Разработка методики сбора, хранения вегетативного материала старовозрастных деревьев и выгонки зеленых побегов.....	28
3.2 Разработка методики стерилизации растительного материала.....	30
3.2.2 Изучение эффективности стерилизации материала липы различного происхождения для инициации культуры тканей.....	32
3.2.3 Предобработка и прекультивирование материала (эксплантов).....	35
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 (на примере липы американской).....	37
3.4 Оценка морфометрических параметров регенерантов липы на этапе стабилизации культуры <i>in vitro</i>	40

3.5 Укоренение микропобегов на различных питательных средах	41
3.6 Адаптация микрорастений липы к <i>ex vitro</i> на искусственных субстратах	
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	45
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	47

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота

БГУ - Белорусский государственный университет

ГК₃ - гиббереллиновая кислота

2,4-Д - 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота

ИМК – 3-индолилмасляная кислота

ИУК – β-индолилуксусной кислоты

Кн – кинетин

КРТ– Культура растительной ткани

НУК – 1-нафтилуксусная кислота

ТДЗ - тидиазурон

ПАВ - поверхностно-активные вещества

ЦБС НАН Беларуси - государственное научное учреждение

«Центральный ботанический сад Национальной академии наук Беларуси»

IS - среда Ide и Saito

ВТМ - среда для размножения широколиственных деревьев

GD - среда Гресшоффа и Доя

MS – среда Мурасиге и Скуга

QP – среда Кворина и Лепорье (Лепуавра)

SH – среда Шенка и Хильдебрандта

WPM - Woody Plant Medium

РЕФЕРАТ

Дипломная работа 50 с., 3 рис., 10 табл., 62 источника.

КУЛЬТУРА IN VITRO, EX VITRO, МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ, ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА, TILIA L., TILIA AMERICANA СТЕРИЛИЗАЦИЯ, ЭКСПЛАНТ.

Объекты исследования: таксон видовой коллекции лип Центрального ботанического сада НАН Беларуси: липа американская, или черная (*Tilia Americana*).

Цель: получить асептическую культуру и провести стабилизацию представителей рода Липа (*Tilia L.*) на примере Липы американской (*Tilia americana L.*) из коллекции ЦБС НАН Беларуси.

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

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

Оптимальной питательной средой на этапе стабилизации культуры *in vitro* липы является среда Мурасиге - Скуга содержащая сахарозу ($30,0 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$), микробиологический агар-агар ($8,0 \text{ г} \cdot \text{л}^{-1}$) с добавлением 6-БАП ($0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), ТДЗ ($0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), ГК₃ ($0,5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$), ИМК ($0,1 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$). Экспериментально установлено, что из коллекции ЦБС НАН Беларуси выход стабильных и жизнеспособных регенерантов для липы американской составляет 34,8%. Наибольшая приживаемость микрорастений (до 90%) при акклиматизации отмечена при использовании искусственного субстрата на основе вермикулита, насыщенного комплексом минеральных солей по прописи WPM. 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 праца 50 с., 3 мал., 10 табл., 62 крыніцы.

КУЛЬТУРА IN VITRO, EX VITRO, МІКРАКЛАНАЛЬНАЕ РАЗМНАЖЭННЕ, ПАЖЫЎНОЕ АСЯРОДДЗЕ, *TILIA L.*, СТЭРЫЛІЗАЦЫЯ, *TILIA AMERICANA*, ЭКСПЛАНТ.

Аб'екты даследавання: таксон відавой калекцыі ліп Цэнтральнага батанічнага саду НАН Беларусі: ліпа амерыканская, або чорная (*Tilia Americana*).

Мэта: атрымаць асептычную культуру і правесці стабілізацыю прадстаўнікоў роду Ліпа (*Tilia L.*) на прыкладзе ліпы амерыканскай (*Tilia americana L.*) з калекцыі ЦБС НАН Беларусі.

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

У ходзе эксперыментаў праведзеных на базе лабараторыі біяхіміі і біятэхналогіі ДНУ «Цэнтральны батанічны сад НАН Беларусі» аптымізаваныя ўмовы атрымання асептычных культур адабраных аб'ектаў, выяўлены асаблівасці культывавання на этапах мікракланальнага размнажэння ў залежнасці ад складу пажыўнага асяроддзя, атрыманы асептычныя культуры з высокім морфагенетычным патэнцыялам.

Аптымальнай пажыўным асяроддзем на этапе стабілізацыі культуры *in vitro* ліпы з'яўляецца асяроддзе Мурасіге-Скуга якая змяшчае цукрозу (30,0 г·л⁻¹), мікрабіялагічны агар-агар (8,0 г·л⁻¹) з даданнем 6-БАП (0,5 мг·л⁻¹), ТДЗ (0,1 мг·л⁻¹), ГКЗ (0,5 мг·л⁻¹), ИМК (0,1 мг·л⁻¹). Эксперыментальна ўстаноўлена, што з калекцыі ЦБС НАН Беларусі выхад стабільных і жыццяздольных рэгенератаў для ліпы амерыканскай складае 34,8%. Найбольшая прыжывальнасць мікрорасцей (да 90%) пры акліматызацыі адзначана пры выкарыстанні штучнага субстрата на аснове вермікулітам, насычанага комплексам мінеральных соляў па пропісе WPM. У практычным плане вынікі даследаванняў могуць быць выкарыстаны для вырошчвання ліп з калекцыі ЦБС НАН Беларусі ў прамысловых маштабах для зялёнага будаўніцтва, атрымання лекавай сыравіны, працяглага захоўвання мерыстам рэдкіх відаў ліп у генетычным банку стэрыльных культур і інш.

ABSTRACT

Graduate work 50 p., 3 fig., 10 table., 62 references.

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

Research objects: taxon of the linden species collection of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus: American linden, or black linden (*Tilia Americana*).

Purpose: to obtain an aseptic culture and to stabilize the representatives of the genus Linden (*Tilia* L.) on the example of American Linden (*Tilia americana* L.) from the collection of the Central Library of the National Academy of Sciences of Belarus.

Methods of research: the method of cell and tissue culture *in vitro*, morphometric analysis, statistical data processing.

In the course of experiments conducted at the Laboratory of biochemistry and Biotechnology of the Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, the conditions for obtaining aseptic cultures of selected objects were optimized, the peculiarities of cultivation at the stages of microclonal reproduction depending on the composition of the nutrient medium were revealed, and aseptic cultures with high morphogenetic potential were obtained.

The optimal nutrient medium at the stage of stabilization of the linden culture. *in vitro* is the Murashige - Skuga medium containing sucrose (30.0 g·l⁻¹), microbiological agar-agar (8.0 g·l⁻¹) with the addition of 6-BAP (0.5 mg·l⁻¹), TDZ (0.1 mg·l⁻¹), GC3 (0.5 mg·l⁻¹), BCI (0.1 mg·l⁻¹). It was experimentally established that the yield of stable and viable regenerants for American linden is 34.8% from the collection of the CBS of the National Academy of Sciences of Belarus. The highest survival rate of micro-plants (up to 90%) during acclimatization was observed when using an artificial substrate based on vermiculite, saturated with a complex of mineral salts according to WPM. In practical terms, the results of the research can be used for growing linden trees from the collection of the Central Library of the National Academy of Sciences of Belarus on an industrial scale for green construction, obtaining medicinal raw materials, long-term storage of meristems of rare linden species in the genetic bank of sterile crops, etc.