

Сборник статей по материалам

III Всероссийской
научно-практической конференции

«Биотехнология как инструмент
сохранения биоразнообразия
растительного мира»



Волгоград
4—6 августа 2010

Издательство AVATARS
Россия, Волгоград, 400078, пр-т. Ленина, д. 100
www.avatars.ru

УДК 577:58
ББК 28.5

Сборник статей по материалам III Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира», Волгоград, 4—6 августа 2010 — Волгоград: Изд-во AVATARS, 2010.— 370 с.

ISBN 978-5-905045-01-1

В сборнике представлены статьи III Всероссийской научно-практической конференции «Биотехнология как инструмент сохранения биоразнообразия растительного мира». Рассмотрены теоретические и прикладные основы биотехнологии как инструмента сохранения биоразнообразия растительного мира по четырём направлениям: современные методы исследования и сохранения редких и исчезающих видов растений; создание коллекций культур клеток и тканей растений и методы сохранения генофонда; микрклональное размножение растений: научные и практические аспекты; молекулярно-генетические методы в изучении биоразнообразия растений.

УДК 577:58
ББК 28.5

Всю ответственность за достоверность предоставленных в сборнике материалов несут авторы соответствующих статей. Печатается без корректуры. Авторская орфография и пунктуация сохранены. Иллюстрации предоставлены авторами статей.

ISBN 978-5-905045-01-1

© Государственное учреждение «Волгоградский региональный ботанический сад», 2010
© Оформление: Изд-во AVATARS, 2010
© Илл. обложки: Vladimir Nikitin

УдГУ, Россия, г. Ижевск

Ботанический сад УдГУ
Россия, г. Ижевск

Е.М. Маркова, А.Ш. Нургаянова

Перспективы клонирования *Adonis vernalis* L.

Adonis vernalis L. – кистекорневой многолетник [1]. Является редким видом на территории Удмуртии, внесен в Красную книгу УР [2]. По характеру возобновления вегетативного роста весной растения адониса можно отнести к видам 1 группы по классификации И.Г. Серебрякова [7], для которых характерно разворачивание и рост уже заложенных в почке возобновления органов, новообразований после появления надземного побега не наблюдается [7]. В природе у данного вида преобладает семенной способ размножения [5].

Опыты по микроклональному размножению *A. vernalis* закладывались согласно методическим рекомендациям [4] в течение 2009 г. и до мая 2010 г. Наблюдения за экспериментом продолжаются и по сей день.

В ходе эксперимента нами рассмотрены варианты выбора экспланта, физических условий культивирования, элементы предварительной подготовки.

Одним из сложных моментов работы оказался выбор экспланта. В качестве эксплантов использовали семена 2009 г сбора, проростки на стадии семядольных листьев, а так же стеблевые черенки, почки возобновления, пазушные побеги, бутоны, семяпочки, кусочки корневища, корня. Экспланты помещались в твердую агаризованную питательную

среду Мурасиге-Скуга, как безгормональную, так и с добавлением фитогормонов.

эксплант	Результаты					
	Рост	Каллус	Инфицированы	Гибель	Нет роста	Число пассажей
Плодики	-	-	71,42 %	-	28,57 %	-
Семена	8,47 %	15,59 %	28,47 %	-	47,47 %	4
Зародыши	-	66,66 %	11,11 %	22,23 %	-	2
Проростки	-	-	-	100 %	-	1
Апекс побега	-	-	66,66 %	-	33,34 %	2
Стеблевые черенки	-	-	27,27 %	72,73 %	-	-
Пазушные побеги	50 %	-	50 %	-	-	2
Пазушные почки	-	-	50 %	50 %	-	1
Бутоны	-	-	25 %	75 %	-	2
Семяпочки	-	-	-	100 %	-	1
Ткани корневища	-	-	-	-	100 %	2
Апексы корня	-	-	25 %	-	75 %	2

Таблица 1. Экспланты *Adonis vernalis*.

В результате проведенных исследований (табл. 1.) мы отмечаем, что более успешным является использование в качестве экспланта семенного материала, кроме того, возможно применение пазушных побегов и апекса побега. Для надземных побегов, как основных, так и пазушных характерен ограниченный рост, что отражается в небольшом числе пассажей проводимых с ними. Растения, развивающиеся из семян сохраняют активный рост дольше. Для эксперимента нами отбирались выполненные плодики, но, к сожалению, нет возможности проверить уровень развития зародыша в неповрежденном семени или плодике, поэтому достаточно низок процент проросших семян. Использование плодиков затруднено, т.к. их поверхность сильно инфицирована и, кроме

того, плотные оболочки эндосарма препятствуют проникновению питательных веществ к зародышу. При использовании в качестве экспланта зародыша семени, потребовалось провести препарирование большого числа семян, чтобы получить нужное количество эксплантов. Особенностью семян адониса весеннего является недоразвитие зародыша, что выражается в отсутствии дифференциации его структур, а также в широком диапазоне варьирования размеров зародыша, в связи с этим при культивировании зародышей происходит либо развитие каллуса, либо зародыши погибают. Каллус, формирующийся из тканей зародыша, молочного цвета, активно растущий, но быстро стареющий, что видно по быстрому изменению его цвета.

Вариант		Реактивы													
		Без обработки		Вода		Эпин (0,5 мг)		Витамин С (1мг)		БАП (0,5 - 1 г)		Кн (0,5 - 1 мг)		Циркон (0,5 мг)	
t° хранения		Пл	С	Пл	С	Пл	С	Пл	С	Пл	С	Пл	С	Пл	С
+24°С	13	6	-	-	-	1	-	-	-	3	-	3	-	-	-
+4°С – 3 мес.	9	2	-	-	2	-	-	-	4	-	1	-	-	-	-
+37°С – 1 нед.	2	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-
+37°С – 1 мес.	3	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
		8		4		2		4		5		3		1	

Таблица 2. Влияние предварительной подготовки эксплантов на прорастание семян, шт.

Основным эксплантом нами выбраны семена. Для вида характерен сборный плод состоящий из отдельных плодиков – орешков. По классификации Николаевой М.Г. [3] для семян вида характерен комбинированный морфофизиологический покой. Период покоя у них длится 60 – 70 дней [6]. Считается, что задержка в прорастании семян вызвана недоразвитием зародыша, которому необходим определенный срок для дифференциации, а также низкой ферментативной активностью [3].

Вариант		Длительность этапа, количество дней				
Условия выращивания	Предварительная подготовка (температурный режим, биостимуляторы)	Прорастание	Семядольные буторки	Бесхлорофилльные семядоли	Проростки	Всходы
Свет, 26°С	-	34	-	9	8	-
Свет, 26°С	-	28	-	11	10	-
Свет, 26°С	-	47	10	-	-	-
Свет, 26°С	-	42	8	-	-	-
Свет, 26°С	-	99	-	-	-	-
Темнота 26°С	-	92	-	-	-	-
Темнота 26°С	БАП 0,5 мг - плоды	67	-	-	-	-
Темнота 26°С	Кн 0,5 мг - плоды	67	-	-	-	-
Темнота 26°С	БАП 0,5 мг - плоды	45	51			
Темнота 37°С	БАП 0,5 мг - плоды	39	45	-	-	-
Темнота 37°С	Эпин 0,5 мг - плоды	69	-	-	-	-
Темнота 26°С	нед. +37 °С, БАП 0,5 мг - плоды	37	10	-	-	-
Свет, 26°С	нед. + 37 °С, плоды	82	-	-	-	-
Свет, 26°С	1 мес. + 37 °С, вода - плоды	62	-	-	-	-
Свет, 26°С	1 мес. + 37 °С, циркон - плоды	18	-	-	-	-
Свет, 26°С	1 мес. + 37 °С, циркон - плоды	16	-	2	-	-
Свет, 26°С	3 мес. + 4 °С, Вит. С – семена	36	-	-	-	-
Свет, 26°С	3 мес. + 4 °С, Вит. С – семена	36	-	-	-	-
Свет, 26°С	3 мес. + 4 °С, плоды	54	-	-	-	-
Свет, 26°С	3 мес. + 4 °С, плоды	30	19	-	-	-
Свет, 26°С	3 мес. + 4 °С, Вит. С – семена	40	-	-	-	-
Свет, 26°С	3 мес. + 4 °С, БАП –семена	40	-	-	-	-
Свет, 26°С	3 мес. + 4 °С, Вит. С – семена	21	19	-	-	-
Свет, 26°С	3 мес. + 4 °С, Вит. С – семена	4	-	3	12	2
Свет, 26°С	3 мес. + 4 °С, вода – семена	40				

Таблица 3. Темпы прорастания адониса весеннего в зависимости от варианта эксперимента.

Нами проведено несколько экспериментов, которые могли бы вывести семена из состояния покоя. Проведенное ранее исследование фенологии и онтогенеза вида позволило нам скорректировать схему опыта. Для прорастания семян требуется длительный период. При этом имеются существенные отличия в развитии растений, прорастающих осенью или весной. Переход от проростка к стадии всхода (стадия, в которой на растении появляются кроме семядольных листьев первый настоящий лист) происходит намного быстрее при весеннем прорастании. При летне-осеннем прорастании под снег уходят проростки, у которых сформированы только семядольные листья. Поэтому нами проведены различные варианты температурного воздействия: прогревание в течение 7- 30 дней, стратификация в течение 3 месяцев при + 4 °С. Кроме того, для ускорения развития плодики и семена замачивались в биостимуляторах: плодики на 5 дней, а семена на 12 часов.

Опытным путем нами выявлена необходимость ступенчатой и многофакторной предварительной подготовки семенного материала для активизации процесса роста зародыша в семени.

В ходе эксперимента мы выявили (табл.2.), что прорастание семян происходит как при комнатной температуре, так и при предварительной стратификации или прогревании. Самое большое число проросших семян наблюдается в варианте, где отсутствует стимулирующая обработка, как биостимуляторами, так и при постоянном температурном режиме. Дальнейшее наблюдение за прорастающими особями выявило зависимость развития растений адониса весеннего от внешних воздействий.

Наблюдение за развитием растений адониса весеннего показало важность соблюдения режима освещения, сам процесс проклевывания семян не нуждается в свете, но в темноте не происходит дальнейшего развития зародыша. Проращивание семян в условиях 16-часового светового дня стимулирует более раннее проклевывание семян и ускоряет прохождение стадий развития растения. В ходе эксперимента выяснили, что для полноценного развития растения необходима предварительная стратификация семян. Только из семян подвергшихся воздействию низких температур происходит нормальное развитие (табл. 3).

Нами рассмотрены все возможные пути развития растений из семян.

1. Выход зародыша из семени – быстрая гибель.
2. Выход зародыша из семени – формирование семядольных бугорков – прекращение роста – гибель.

3. Выход зародыша из семени – формирование бесхлорофилльных семядольных листьев – окрашивание и рост семядолей – стадия проростка – прекращение роста – постепенная гибель.

4. Выход зародыша из семени - формирование бесхлорофилльных семядольных листьев – окрашивание и рост семядолей – стадия проростка – появление первого настоящего листа – рост главного корня – прекращение роста – постепенная гибель.

5. Выход зародыша из семени - формирование бесхлорофилльных семядольных листьев – слабое окрашивание семядольных листьев – прекращение роста – формирование уродливого проростка – появление точек роста – формирование листоподобных структур сходных с семядольными листьями проростка.

Нами проделана большая работа по введению адониса весеннего в культуру. Но, подводя итоги на данном этапе, мы можем говорить, что нам предстоит еще более серьезная и кропотливая работа. Вероятность формирования полноценного растения очень низка, зависит от размеров зародыша, степени его сформированности, от условий культивирования, условий вывода из состояния покоя.

Список литературы

1. Баранова О.Г. Местная флора Удмуртии: анализ, конспект, охрана: Учеб. пособие. – Ижевск, 2002. – 199 с.
2. Красная книга Удмуртской Республики: Сосудистые растения, лишайники, грибы. – Ижевск: Изд. дом «Удмуртский университет», 2001. – 290 с.
3. Николаева М.Г., Разумова М.В., Гладкова В.Н. Справочник по проращиванию покоящихся семян. – Л.: Наука, 1985. – 400 с.
4. Основы биотехнологии растений / сост. Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б., Гринь Н.А. С.: Изд. СГУ, 2002. 45 с.
5. Пошкурлат А.П. и Губанов И.А. Горицвет весенний // Биологическая флора московской области. Вып. 2. М.: Изд. МГУ, 1975. С. 36- 47.
6. Пошкурлат А.П. Род Горицвет – Adonis L. Систематика. Распространение. Биология. М.: Изд. Наука, 2000. С. 65 – 135.
7. Серебряков И.Г. Морфология вегетативных органов высших растений. – М.: Советская наука, 1952. – 391 с.