

Оглавление

ГЛАВА 1. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ.....	9
1.1 Факторы, влияющие на процесс микроклонального размножения	10
1.2 Потенциальные системы клонального микроразмножения	11
1.3 Практическое значение метода микроклонального размножения растений	13
ГЛАВА 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЙ.....	19
2.1 Систематическое положение	19
2.2 Ботаническая характеристика.....	19
2.3 Источники посадочного материала.....	23
2.4 Виды, разновидности и сорта бегоний	24
2.4.1 Кустовидные бегонии с прямостоячими бамбукоподобными побегами	24
2.4.2 Бегоний с толстыми корневищными побегами, лежащими на земле (или полегающими).....	26
2.4.3 Бегонии с ползучими или поникающими тонкими гибкими побегами.....	30
2.4.4 Бегонии – родоначальники гибридных цветущих форм ...	31
2.5 Условия содержания и основы агротехники.....	34
ГЛАВА 3. СОСТАВЫ СРЕД ДЛЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ И ОСОБЕННОСТИ ИХ ПРИМЕНИМОСТИ ДЛЯ <i>BEGONIA REX</i> P	36

ГЛАВА 5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	41
5.1 Состав применяемой питательной среды	41
5.2 Стерилизация эксплантов	42
5.3 Введение растений в культуру <i>in vitro</i>	46
5.4 Техника стимуляции адвентивных побегов	47
ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	48
ГЛАВА 7. ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ РАБОТЫ С УЧАЩИМИСЯ ШКОЛ	53
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	58
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК	60
Приложение 1	65
Приложение 2	66
Приложение 3	68

ВВЕДЕНИЕ

Нашу Землю называют зеленой планетой. Этим она обязана растительному миру. Не зря говорят: «Земля - планета растений». Растения растут как в дикой природе, так и в наших домах, офисах и различных учреждениях. История цветоводства началась давно. В исторической и художественной литературе упоминаются розовые сады царственных особ и цветочные клумбы возле фонтанов. Люди путешествовали по миру, стремились привезти на родину экзотические растения, которые раньше не произрастали в местах их проживания.

Сегодня уже мало кого можно удивить флористикой, то есть умением составлять различные букеты. Существует также и ландшафтный дизайн, который предполагает украшение участков, прилегающих к дому. Цветы в горшках уже никого не удивляют, и редко мы задумываемся о том, как же искусство цветоводства вошло в нашу жизнь. Раньше привезти из-за границы какой-нибудь редкий цветок могли позволить себе только состоятельные купцы.

В настоящее время процесс дарения цветов стал правилом этикета и просто знаком расположения к человеку. Люди стремятся обеспечить все условия для того, чтобы экзотические растения можно было выращивать на родине. В век технического прогресса и урбанизации, растения особенно дороги нам. Озеленение помещений благотворно влияет на нервную систему человека. Это объясняется тем, что зелёный цвет растений действует успокаивающе и снимает накопленное напряжение. Растения благотворно влияют на наше здоровье, повышая влажность воздуха. Для озеленения помещений самого различного назначения широко используются бегонии [41].

Род бегония (*Begonia*) — самый крупный и наиболее известный в семействе Бегониевых (*Begoniaceae*).

Сегодня существуют тысячи гибридных форм и сортов бегоний. Обогащению ассортимента послужила значительная работа по гибридизации и селекции бегонии, которая была развёрнута начиная со второй половины XIX века. Наибольшей известностью пользуются сорта, выведенные в Бельгии. В цветоводстве бегонии с одинаковым успехом используются в открытом и защищенном грунте. Большинство бегоний используются как декоративно-лиственные и цветущие растения для озеленения жилых помещений при создании композиций и в качестве одиночных комнатных растений. Используются также в ампельной комнатной культуре, зимних садах в подвесных корзинках, кашпо. Бегонию выюнковую (*Begonia convolvulaceae* A.DC.) можно использовать для декорирования трельяжей, стен, окон и как почвопокровное растение. Бегонии всегда применялись при оформлении интерьера в романтическом стиле, а также являются прекрасными офисными растениями. Бегонии поглощают ядовитые вещества, поэтому их рекомендуют заводить сразу же после ремонта квартиры. В качестве однолетников открытого грунта используются два вида: бегония вечноцветущая (*Begonia semperflorens* L.) и бегония клубневая (*Begonia tuberhybrida* V.). Бегония вечноцветущая используется во всех видах цветников, включая ковровые. Бегония клубневая используется для озеленения балконов, в контейнерах на верандах и закрытых дворах, а также в цветниках.

В Пермском крае бегонии имеют широкое применение в ландшафтном дизайне. Например, Свердловский район отличился установкой цветочных шаров на клумбах. Пять конструкций высотой около 2м размещены на площади Карла Маркса. Пластиковые шары полностью усажены бегониями. Этот пример нестандартного озеленения впервые в этом году применили благоустроители и других районов. Аналогичные конструкции появились у памятника Татищеву в микрорайоне «Разгуляй», на транспортной развязке улиц Мира - Шоссе Космонавтов – Свйазева [42].

Можно сделать вывод что, бегонии имеют широкое применение, поэтому разработка более выгодных и оптимальных способов размножения данных растений является актуальной темой в наше время.

В биологической характеристике бегоний, описанной в ботанической литературе, указано, что размножаются бегонии листовыми или стеблевыми черенками, клубневые виды размножаются также путем деления клубней с небольшими ростками. Но существует более эффективный способ размножения этих растений – микроклональное размножение. Такой тип размножения имеет ряд достаточно весомых преимуществ. А именно:

1) Процесс размножения значительно быстрее, нежели чем при традиционных способах размножения. Сокращается продолжительность селекционного периода, происходит ускорение перехода растений от ювенильной фазы развития к репродуктивной.

2) Воспроизведение посадочного материала происходит круглый год, что значительно экономит площади, занимаемые маточными и размножаемыми растениями.

3) Высокий коэффициент размножения. При традиционном способе размножения от одного листа бегонии можно получить не более 3-4 растений, а при микроклональном размножении несколько десятков тысяч растений, повторно черенкуя выросшие в пробирках растения.

4) При микроклональном размножении возникает возможность оздоровления растений, освобождения их от вирусов благодаря клонированию меристематических тканей. А также можно использовать различные стимуляторы роста, для более быстрого и качественного развития растений.

5) Обеспечивается получение генетически однородного посадочного материала.

6) Транспортировка растений в пробирках или колбах значительно удобнее и безопаснее, чем транспортировка растения, высаженного в почву.

7) При данном типе размножения не требуется регулярный уход за посадками

8) После адаптации к почве, качественно клонированные растения опережают в своем развитии выращенные традиционным способом.

Микроклональное размножение достаточно изучено, как в зарубежных странах, так и в нашей стране. В России есть лаборатории почти при всех профилирующих научных и образовательных учреждениях, где изучаются вопросы, связанные с проблемами микроклонального размножения растений и их оздоровления. Для большинства декоративных, плодовых, ягодных культур, а также в сортовом разрезе, подобраны оптимальные питательные среды для культивирования их *in vitro* на различных этапах размножения, а также отработаны методики тестирования растений на наличие латентных патогенов. Но всё-таки узким местом в цепочке от меристемы до готового саженца является акклиматизация регенерантов *in vivo* (в условия внешней среды, вне пробирки). На данном этапе растения требуют определённых параметров микроклимата.

Для возделывания посадочного материала в промышленных масштабах это делается в акклиматизационных комплексах, оснащённых специальным оборудованием, позволяющим регулировать параметры микроклимата в зависимости от этапа акклиматизации растений и климатических условий внешней среды. Как известно, приборы и оборудование для обустройства лаборатории микроклонального размножения растений, компоненты для приготовления питательных сред, обустройство акклиматизационных комплексов и оплата труда квалифицированного персонала требуют значительных капиталовложений. Поэтому, в странах, где микроклональное размножение плодовых и декоративных культур поставлено на коммерческую основу, этот очень необходимый сегмент садоводческой отрасли обслуживается частными компаниями.

Причина преимущества применения безвирусного посадочного материала, полученного *in vitro* кроется в том, что растения, проходя путь от

меристематических клеток до взрослых растений, проходят процесс “реювенилизации” (омолаживания) в результате чего лишаются действия накопившейся в растениях “усталости” вызванной стрессовыми факторами.

Поэтому, применяя оздоровленный посадочный материал в комплексе с высокой агротехникой, можно получить более высокую отдачу урожая и более раннее вступление растений в период товарного плодоношения и цветения, таким образом обеспечить быстрое возвращение вложенных инвестиций и получить более высокий доход по сравнению с использованием обычного посадочного материала [42].

В Пермском крае технологии микроклонального размножения изучаются в рамках трех университетов: ПГНИУ, ПГГПУ и ПГСХ.

Автор дипломной работы, обучающийся в ПГГПУ, заинтересован в проведении исследования на тему «Микроклональное размножение бегоний» по ряду причин:

- бегониевые являются перспективным и интересным объектом, в том числе для автора;
- размножение бегоний микроклональным способом ещё не достаточно изучено, об этом свидетельствует малое количество как печатных, так и электронных литературных источников. Результаты, полученные автором, могут быть полезны для развития направления биотехнологии бегониевых (*Begoniaceae*)
- наработки по теме исследований могут использоваться автором в дальнейшей педагогической деятельности, для создания специального курса для учащихся школ, интересующихся биологическими науками.

Цель работы: освоение методики клонального микроразмножения бегониевых на примере *Begonia rex* Р.

Использование полученных материалов в составе тематических спецкурсов, факультативных и практических занятий в школе.

Задачи:

1. Изучить биологические особенности растений рода *Begonia*, а также современные материалы по их микрклональному размножению;
2. Определить наиболее подходящие составы сред и необходимые условия культивирования объекта исследований *in-vitro*. Получить регенеранты различных сортов растений рода *Begonia* с приоритетом *Begonia rex* P;
3. Оценить эффективность различных дезинфектантов при стерилизации эксплантов объекта исследований;
4. Оценить способность бегоний к каллусогенезу при культивации в средах различных по составу;
5. Привлечь учащихся школ к исследовательской работе в рамках тематики исследования.

ГЛАВА 1. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

По своей сути микроклональное размножение аналогично вегетативному типу размножения растений, с той лишь разницей, что оно протекает в пробирке в условиях *in vitro*, где из клеток изолированных тканей в итоге можно получить достаточно большое количество новых растений. Обязательным условием микроклонального размножения является идентичность полученного растительного материала исходному материнскому растению. Еще недавно этот способ рассматривали как возможность ускоренного получения вегетативно размножающихся видов растений, а также как вспомогательный метод освобождения растений от вирусов. Однако, результаты некоторых экспериментов показали, что значение этого метода существенно возрастает для клоновой селекции вегетативно размножающихся растений (экспериментальный мутагенез и расхимерикание - это неустойчивость генотипа, которая приводит к образованию у крупноплодного растения мелкоплодных отпрысков), криосохранения ценного исходного материала и особенно для изучения частной генетики культур, размножающихся семенами (Бутенко, 1999).

Способность к образованию больших количеств (несколько миллионов и более) соматических зародышей в условиях *in vitro*, рассматриваемая как один из путей практического приложения метода микроклонального размножения, может быть использована для разработки технологии массового и непрерывного получения «искусственных семян». Это может придать гетерозисной селекции некоторых сельскохозяйственных культур большую эффективность и целенаправленность. Более того, метод клонального микроразмножения может быть с успехом использован для создания синтетических сортов – это сорта, механически составленные из двух или более чистых сортов и внедряющиеся в производство.

С коммерческой точки зрения этот метод по сравнению с другими имеет наибольшее значение для сельскохозяйственной практики. К настоящему времени число видов, которые можно клонировать «в пробирке», уже составляет около тысячи. Более чем у ста видов этот метод находит реальное коммерческое применение, среди них – декоративные, плодово-ягодные, древесные и другие виды растений.

Основное преимущество метода микроклонального размножения по сравнению с классическими методами кроется в значительно более высоком коэффициенте размножения. Если обычным способом (черенками, луковичками, корневищами и т.д.) от одного растения можно получить 10 – 100 растений в год, то методом микроклонального размножения их число в зависимости от вида, можно увеличить от 50тыс. до 1 млн. Следовательно, для обеспечения необходимого объема растений какой – либо селекционной программы могут быть использованы единичные и суперэлитные растения. В этом и заключается высокая экономичность метода (Дитченко, 2007).

1.1 Факторы, влияющие на процесс микроклонального размножения

Наиболее важными моментами при введении растений в культуру *in vitro* являются выбор материнского растения и экспланта, а также стерилизация исходного материала.

Желательно, чтобы исходные растения не были повреждены грибными, бактериальными и вирусными болезнями и находились в состоянии активной вегетации. Растения в состоянии покоя, как правило, непригодны для этой цели. Луковицы, корневища и клубни перед введением в культуру *in vitro* необходимо предварительно обработать высокими или низкими температурами. Для обеспечения максимальной генетической стабильности клонируемого материала и во избежание появления аномальных растений в качестве исходного экспланта желательно использовать молодые, слабодифференцированные ткани. Для этой цели наиболее подходят кончики стеблей, боковые (пазушные) почки, зародыши и другие меристемные ткани.

Можно использовать молодые листья, черенки, соцветия и чешую луковиц. Однако в этом случае в исходном пассаже необходим цитологический и морфологический контроль (Черевченко, 2008). Для обеззараживания исходных эксплантов предлагаются общепринятые процедуры. Однако часто внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное, поэтому экспланты предварительно обрабатывают фунгицидами и антибиотиками против грибной и бактериальной инфекции. Хорошие результаты дает обработка растительного материала бензоатом натрия. Более того, необходим тщательный фитосанитарный уход за исходными растениями.

В зависимости от вида растений необходимо испытывать как твердые, так и жидкие питательные среды, горизонтальное или вертикальное расположение экспланта на питательную среду, тип пробок (вату, дунапрен, пластмассу, стекло, нержавеющей сталь и т.д.), необходимо также установить соотношение объема эксплантов и количества питательной среды для оптимального освещения и газообмена эксплантов и т.д. [43].

1.2 Потенциальные системы клонального микроразмножения

Существует три основных способа микрклонального размножения *in vitro*.

Пазушное образование почек. Пазушное образование почек наблюдается у растений с апикальным доминированием верхушечной почки основного побега. В пазухах листьев на стебле таких растений остаются меристемные участки, которые при снятии апикального доминирования формируют пазушные почки, впоследствии развивающиеся в боковые побеги. Потенциальные возможности такого способа микроразмножения *in vitro* реализуются при добавлении в питательные среды цитокининов, которые подавляют развитие верхушечной почки стебля и стимулируют образование пазушных. В результате формируется розетка из почек, которые могут быть разделены и перенесены на свежую питательную среду. Этот

процесс можно поддерживать непрерывно. Количество заново сформированных почек и растений-регенерантов зависит от размера используемых в качестве эксплантов боковых почек и оптимизации питательной среды. Чаще всего соотношение между исходным числом эксплантов и числом сформированных почек составляет от 1:5 до 1:15. Преимущество этого метода состоит в сравнительно быстром размножении исходного генотипа по сравнению с общепринятыми классическими методами, при этом обеспечивается наиболее высокая фенотипическая и генотипическая стабильность.

Образование адвентивных почек. Адвентивные (или придаточные) почки образуются из меристемных зон, чаще всего сформированных вторично из тканей каллуса. Каллусом называют дедифференцированные (потерявшие специализацию) клетки, являющиеся тотипотентными и способными поэтому дать начало целому растению.

В отличие от пазушных, адвентивной почки могут возникнуть как из меристемы, так и из немеристемных тканей (листьев, стеблей, чешуй луковиц и т.д.). Лучше всего для этих целей использовать молодые, активно растущие органы растения. У большинства видов растений образование адвентивных почек индуцировано высоким отношением цитокининов к ауксинам в питательной среде. Однако у некоторых видов растений наблюдаются вариации в концентрации этих фитогормонов.

Обычно адвентивные почки образуются из клеток как внешних (эпидермальных) слоев, так и внутренних тканей стеблей и листьев. Это позволяет осуществить расхимирование тканей, состоящих из генетически неоднородных клеток. Однако в этом случае не может быть обеспечено сохранение идентичности исходного генотипа и соответственно, фенотипа. У меристемных верхушек часто наблюдается одновременное формирование пазушных и адвентивных почек (Строева, 2017).

Непрямой морфогенез. Непрямой морфогенез включает вторичную дифференциацию адвентивных почек из каллусных тканей. Если образование

первичного (начального), а впоследствии и пассированного (периодически переносимого на свежую среду) каллуса - задача несложная, то вторичная дифференцировка адвентивных почек и эмбриоидов из каллуса требует значительных усилий. Причина заключается в том, что не все ткани и органы растений индуцируют тотипотетный (способный к регенерации растений) каллус. Прежде всего это связано с образованием аберрантных полиплоидных и анеуплоидных клеток, генетической перестройкой на уровне хромосом и ДНК. Часть этих нарушений уже существует в исходных тканях экспланта, другая часть возникает вновь под воздействием фитогормонов. Молодые эмбриональные ткани, так же как зародыши, соцветия и т. д., являются наиболее подходящими эксплантами для вторичного образования адвентивных побегов. Успешные результаты в этом направлении связаны с эмпирическим подбором оптимальных соотношений концентрации ауксинов и цитокининов. Из-за генетической нестабильности такая система не может быть рекомендована для микроклонального размножения. Однако эта система имеет определенное значение для клеточного мутагенеза, отбора на селективных средах, а также соматической изменчивости (Тимофеева, 2012).

1.3 Практическое значение метода микроклонального размножения растений

Метод микроклонального размножения играет важную роль для ускоренного клонирования плодовых, ягодных, клубнеплодных, декоративных видов растений и древесных пород. Впервые этот метод успешно применил французский исследователь Морель в 1960г. для размножения орхидеи (*Cymbidium*): из одного исходного экспланта ему удалось в течение года получить около 4 млн. новых растений, свободных от вирусной инфекции (Куликов, 1998). Вскоре хорошие результаты были получены при использовании этого метода для вегетативно размножающихся

растений. Для некоторых видов (особенно декоративных) клональное микроразмножение *in vitro* используется для непосредственной реализации их на рынке. У других видов этот метод применяется для создания элитного и суперэлитного материала. В настоящее время число таких видов превышает 1000. И тем не менее следует отметить, что основной проблемой при широком использовании метода микроклонального размножения для некоторых видов растений остается высокая стоимость полученных клонов.

В нашей стране накоплен большой опыт по клональному микроразмножению ряда декоративных культур – гвоздики, герберы, хризантем, роз и др.; плодовых – яблони, сливы, персика и др.; а также ягодных, овощных, технических и многих других важных для сельского хозяйства видов. В национальную биотехнологическую программу включено более 30 наименований растений, что позволит удовлетворить потребности страны в здоровом и ценном посадочном материале, исходном материале в селекционно-генетических программах по созданию новых высокопродуктивных сортов, а также в посадочном материале для экспорта в другие страны.

Метод клонального микроразмножения имеет большое значение для оздоровления исходного растительного материала. Общеизвестно, что борьба с вирусными болезнями многих сельскохозяйственных культур – одна из наиболее актуальных проблем растениеводства во всем мире, так как из производства могут выпадать ценные сорта растений. Особенно остро эта проблема стоит для многолетних вегетативно размножающихся культур. В 1952 г. французские исследователи Морель и Мартен впервые получили свободный от вирусных инфекций посадочный материал георгина методом меристемных культур. В отличие от грибных и бактериальных болезней, которые могут быть устранены методом химической обработки, изолирование и культивирование меристем (размером от 0,1 до 0,3 мм) в настоящее время является единственным надежным методом освобождения от вирусов вегетативно размножающихся растений. Можно предположить,

что этот метод будет иметь такое же значение и для некоторых растений, размножающихся семенами (например, сахарной свеклы, томатов лука, капусты, огурцов, подсолнечника и т.д.) [44].

Практика получения безвирусного посадочного материала показывает, что не всегда удастся вычленить меристемы, не зараженные вирусом. Следовательно, необходимы дополнительные приемы, повышающие эффективность метода культуры меристем. К ним относится использование высоких температур, противовирусных препаратов и т.д. Однако более надежно клонировать исходные растения, тестированные серологическими методами. Если нет здорового исходного материала, то все растения, полученные из изолированных меристем *in vitro*, необходимо протестировать на зараженность и отобрать несколько безвирусных растений для размножения методами культуры тканей в необходимом количестве. Обязательным условием при оздоровлении растительного материала является использование культур с высоким коэффициентом размножения *in vitro*.

Сочетание методов культивирования меристем *in vitro* с термо- и химиотерапией зависит от того, включен ли данный вирус в клетки меристем тканей. Более эффективно чередовать циклы высоких дневных (40°C) и низких ночных (5°C) температур по сравнению с непрерывным выдерживанием растений лишь при высоких температурах. Применение только химиотерапии не дает положительных результатов. Однако в последнее время появились данные о том, что добавление виразола (рибовирин) в среду для культивирования эффективно против вируса табачной мозаики и Х-вируса картофеля в культуре тканей табака [43].

Помимо метода культуры меристем получить здоровый посадочный материал можно и путем регенерации растений из каллусных, суспензионных и протопластных культур. Однако в этом случае нельзя обеспечить генетическую стабильность полученного материала.

Одним из наиболее важных условий при получении безвирусного посадочного материала является наличие надежных методов тестирования

вирусов. В прошлом использование прививки, исследования на электронном микроскопе листьев и сока чувствительных к вирусам растений – хозяев, а также различные серологические тесты. Позднее были разработаны более точные методы: ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) и иммунная электронная микроскопия. Но, пожалуй, наиболее чувствительными методами, позволяющими диагностировать не только вирусные, но и виroidные патогены, являются новейшие методы моноклональных антител и ДНК-зондов.

Введение в практику надежных, быстрых и дешевых методов тестирования обеспечивает производство здорового посадочного материала, а также его поддержание в здоровом состоянии в процессе размножения. Сочетание микроразмножения с методами диагностики является необходимым звеном в получении качественной продукции. [45]

Обсуждая практическое значение метода клонального микроразмножения, следует подчеркнуть его широкие возможности по ускорению селекционного процесса, длительному поддержанию и сохранению ценных генотипов, а также по мутагенезу, расхимериванию тканей и отбору ценных мутантных форм в условиях *in vitro*. Использование мутационных изменений – широко распространенный и признанный метод селекции вегетативно размножающихся растений. Поэтому микроклональное размножение в виде прямого органогенеза из ценных эксплантов может оказаться более подходящим методом реализации некоторых желаемых генетических изменений у вегетативно размножающихся растений, чем традиционные методы.

Остается нерешенным вопрос, как проводить отбор желаемых генетических изменений и особенно биохимических мутаций, которые не имеют фенотипического проявления на уровне целых почек. Создание генетических, биохимических, иммунохимических, молекулярных и других маркеров значительно облегчило бы работу с мутантами. Несмотря на то, что эти проблемы еще предстоит решить, можно уверенно сказать, что

аксиллярное и адвентивное образование почек при микроклональном размножении существенно расширит возможности мутационной селекции, не только сократив время на выведение мутаций. Но и позволив получать более широкий их спектр (Шевелуха, 1998).

Часто в своей практической деятельности селекционер сталкивается с проблемой поддержания и быстрого размножения полученных генотипов. Если это связано с определенными биологическими и генетическими барьерами, то использование таких генотипов селекции невозможно. Например, у некоторых видов растений, в частности *Brassica oleracea*, коммерческое значение имеют только гибриды 1-го поколения. Производство гибридных семян, а также поддержание исходных родительских пар, представленных самоопыленными линиями, связано с системами самонесовместимости. Применение метода микроклонального размножения позволяло бы решить эту проблему. Клональное микроразмножение можно использовать как эффективный метод решения целого ряда селекционных задач, которые связаны со следующими проблемами:

1. Цитоплазматическая мужская стерильность
2. Гетерозисные генотипы
3. Двудомные виды
4. Размножение ценных генотипов
5. Тестирование растений на устойчивость к болезням
6. Мутантные линии
7. Растения с низкой жизнеспособностью семян
8. Получение полиплоидных форм
9. Яровизация и цветение
10. Микропрививки
11. Соматический эмбриогенез

Метод микроклонального размножения может быть использован в физиологических, биохимических, фитопатологических исследованиях

сельскохозяйственных растений. Метаболические процессы, связанные с синтезом белков, жиров, углеводов, аминокислот и т.д., а также механизмы, обеспечивающие устойчивость растений к болезням и насекомым – вредителям, могут быть изучены полнее и точнее при использовании линий с одинаковой генетической основой.

Таким образом, можно утверждать, что метод микроклонального размножения будет играть важную роль в практической реализации основных направлений генетической инженерии в растениеводстве (Лутова, 2010).

ГЛАВА 2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Систематическое положение

Царство: Растения (*Plantae*)

Отдел: Покрытосеменные (*Magnoliophyta*)

Класс: Двудольные (*Dicotyledones*)

Порядок: Тыквоцветные (*Cucurbitales*)

Семейство: Бегониевые (*Begoniaceae*)

2.2 Ботаническая характеристика

Род бегония (*Begonia*) — самый крупный и наиболее известный в семействе бегониевых (*Begoniaceae*). Впервые представители семейства бегониевых были обнаружены еще в 17 веке французским ботаником Шарем Плюмье. Но названы растения были в честь другого человека. Другом и наставником Шарля Плюмье был француз Мишель Бегон, бывший интендантом французских колоний в Карибском море, и прославившийся любовью к ботанике. Он занимался систематикой растений, и развитием сельскохозяйственных культур. В 1685 он организует поездку Шарля Плюмье на Антильские острова с целью обзора местной флоры. И на основе собранного гербария публикует «Описание растений Америки с их рисунками». В честь него и названо одно из открытых Плюмье растений - бегония, сам же Плюмье был назначен королевским ботаником. Основная же работа по выведению гибридов бегоний началась несколько позже - в конце 19 века, при этом более 100 исходных видов послужили родительским материалом для получения гибридов, а затем и новых сортов [45].

В роду насчитывается свыше 1000 видов, произрастающих в тропиках Америки, Азии и Африки. Больше всего видов бегоний в Южной Америке, где они растут во влажных тропических лесах на склонах гор, в горных

долинах, доходя на севере до Мексики. Места их произрастания в Азии — Восточные Гималаи, горные области Индии, Малайский архипелаг, Южная Индия, остров Шри-Ланка. В Африке бегонии тяготеют к ее наиболее влажной западной части. При этом, как показали исследования, существуют родственные связи между видами, обитающими в Африке и Америке. Есть даже мнение, что именно Африка явилась тем континентом, откуда в далеком прошлом бегонии распространились и в Азию, и в Америку. По числу произрастающих видов бегоний Африка занимает третье место в мире [46].

Среди бегоний есть как декоративно-лиственные, так и декоративно-цветущие виды. Бегонии поражают разнообразием своего облика. От многолетних миниатюрных трав высотой всего 3-4 см с ползучими побегами до кустарников с часто одревесневающими прямостоячими побегами высотой до 3-4 м. Некоторые вовсе лишены стебля, и листья у них растут от клубня, скрытого под землей. Есть бегонии, которые с помощью корней и присосок взбираются на высокие деревья. Большинство бегоний — облиственные долгоживущие многолетники, их условно можно разделить на две морфологические группы: полукустовидные травы с прямыми бамбукоподобными побегами и корневищные (ризомные), т.е. с толстыми суккулентными короткометамерными побегами.

Кустовидные бегонии имеют длинные прямые или поникающие побеги, почти неветвящиеся или ветвящиеся на высоте 1-3 м. Эти побеги часто полегают и в местах соприкосновения с землей могут давать корни. Как правило, такое растение состоит из многих побегов, которые растут из основания взамен старых. Особенно активный рост наблюдается весной, когда вырастают новые так называемые побеги замещения. Обычно междоузлия этих побегов сильно вытянуты (до 20-30 см длиной), с утолщениями в узлах (тростниковидные или бамбуковидные).

Бегонии с корневищным ростом могут иметь разные побеги: от поднимающихся до ползучих. У молодых бегоний корневищные побеги могут быть ползучими и лишь с возрастом вытягиваются, приподнимаются, становятся более или менее вертикально ориентированными. С течением времени старые корневищные побеги покрываются серым или коричневым налетом, полуодревесневают и таким образом, как бы защищаются от солнечной радиации. Толстые и суккулентные побеги являются хранилищем влаги, что помогает растениям пережить засушливый период.

Бегонии могут произрастать в горах на высоте более 4000 м над уровнем моря - они живут в Гималаях и перуанских Андах. Есть среди бегоний и суккулентные формы, произрастающие в засушливых местах, на каменистых склонах. Они запасают влагу в клубнях, утолщенных побегах и листьях. Существуют бегонии, которые в засушливый сезон полностью сбрасывают листья, а некоторые уходят на покой.

Форма листьев бегоний: от простых асимметричных округлых до сложных, состоящих из 5-10 листочков. У отдельных видов они напоминают улитку, звезду, листья каштана, ивы, плюща, клена, пальмы. Кроме этого, листья разных видов отличаются по размеру от мелких до крупных, с лист лопуха. Края листьев - цельные, пильчатые, глубоко рассеченные, иногда украшенные двойной или тройной бахромой.

Окраска листьев разнообразнее, чем окраска цветков. Недаром бегонии относят к декоративно-лиственным растениям. У одних листья темно-бордовые до черных с фосфоресцирующими пятнами, у других - изумрудно-зеленые с разбросанными по поверхности серебристо-муаровыми жемчужинами, у третьих - с темно-зеленой каймой, переходящей в серебристо-малиновую, почти коричневую зону. Необыкновенна и пятнистость, крапчатость листьев бегоний. Многие виды имеют опушение - очень разнообразное по форме, окраске и величине. Оно может быть редким,

густым, войлочным, собранным в пучки. По цвету - белым, красным, коричневым, малиновым. Волоски бывают длинными, короткими, вильчатой или звездчатой формы. Опушены могут быть не только листья и побеги, но и черешки и цветки.

Бегониевые - растения однодомные: соцветия сложная метелка, несут как мужские, так и женские цветки. Сами цветки зигоморфные (очень редко правильной формы), мужские у женских четырех - или пятилепестных цветков над лепестками образуется трехгранная семенная коробочка. Большинство бегоний цветут все лето, однако при создании им хороших условий, они могут цвести и осенью, и даже зимой.

У махровых гибридов бегоний, махровостью обладают только мужские цветки, а женские имеют простое строение и скромный вид. У гибридов бегоний распространена неполная и полная махровость мужских цветков, образованная за счет преобразования тычинок в дополнительные лепестки. Чем больше выражена махровость цветка, тем меньше остается тычинок, у полумахровых бегоний андроцей остается хорошо заметен. Кстати, у полностью махровых бегоний тычинки могут полностью отсутствовать, а у некоторых гибридов среди лепестков встречаются нормально развитые тычинки с жизнеспособной пылью. Но пыльца быстро теряет свои оплодотворяющие свойства, поэтому для искусственного оплодотворения пригодна только свежая пыльца, которая жизнеспособна еще до полного распускания цветка.

Существует мнение, что если на бегонии образуется больше простых цветков, то это из-за того, что вовремя не удалялись женские цветки. На самом деле образование мужских или женских цветков зависит от многих факторов, и основными являются: генетическая предрасположенность, питание растения, например, известно, что посадка в питательную почву и

подкормки, способствуют образованию больше мужских махровых цветков. На менее питательной среде распускается больше простых женских.

Вообще, семейству бегониевых присуща очередность "полового развития" - в начале цветения в соцветии образуются, прежде всего, мужские цветки, после их отцветания распускаются женские. Природа продумала такой вариант развития, чтобы уменьшить опыление растения собственной пылью и закрепить перекрестное опыление - бегониевые опыляются насекомыми [45].

Плод бегонии - крыловидная трехгнездная коробочка с неравными крылатками, хотя у некоторых видов коробочка не имеет крыльев и напоминает ягоду. Семена очень мелкие, почти пылевидные.

2.3 Источники посадочного материала

Покупать бегонии следует в специализированных хозяйствах и оранжереях — там, где за ними осуществляется должный уход. При покупке обратите внимание на влажность субстрата, не берите слишком подсохшие и переувлажненные бегонии. Не следует брать растения, стоящие возле окон и дверей: они подвергались воздействию сквозняков, могут долго болеть и даже погибнуть. Не берите бегонии, у которых корни торчат из отверстий на дне горшка. Старайтесь выбирать здоровые, крепкие растения среднего размера без признаков заболеваний и повреждений. Первое время после покупки будьте предельно внимательны. Постарайтесь создать необходимые для растения условия освещенности, влажности и температуры, так как ему необходимо акклиматизироваться и привыкнуть к новому жилищу. Защитите ваш цветок от сквозняков, не переносите с места на место, не подкармливайте и без необходимости не поливайте его, а для повышения влажности воздуха поставьте рядом с ним емкость с водой. Не покупайте бегонии поздней осенью и зимой. В это время слишком резко меняются условия содержания, в комнатах этот период самый тяжелый, и потому при

переселении растений из оранжереи в комнату им трудно акклиматизироваться. Лучшее время для их приобретения — апрель—июнь (Шахова, 2005).

2.4 Виды, разновидности и сорта бегоний

Автор серии книг о бегониях Шахова Г.И (2005) условно делит виды бегоний на 4 группы:

- кустовидные бегонии с прямостоячими бамбукоподобными побегами;
- виды бегоний с толстыми корневищными побегами, лежащими на земле (или полегающими);
- бегонии с ползучими или поникающими тонкими гибкими побегами;
- виды бегоний - родоначальники гибридных красивоцветущих форм.

2.4.1 Кустовидные бегонии с прямостоячими бамбукоподобными побегами

Бегония белопятнистая *Begonia Albopicta* W. Кустовидное растение высотой до 1 м, слабоветвящееся, с гибкими голыми зелеными побегами. Старые побеги с возрастом поникают, образуя полуампельную форму. Листья удлинненно-ланцетные, голые, зеленые, с разбросанными по всей поверхности серебристыми пятнами. Цветки мелкие, белые. Цветет летом.

Происхождение. Была открыта в 1883 г. в Бразилии привезена в Англию.
Содержание и уход. Хорошо растет при температуре не ниже 14-16 °С. Летом полив обильный, зимой - умеренный. В марте-апреле обрезают и пересаживают в смесь из листовой земли, торфа, песка, перегноя (1:1:1:0,25). Размножают верхушечными стеблевыми черенками. Летом регулярно (раз в две недели) подкармливают.

Использование. Одиночное или в композициях.

Бегония богатая *Begonia olbia* К. Кустовидное травянистое растение высотой до 80 см с утолщенными сочными побегами. Листья кососердцевидные, оливково-зеленые. На молодых листьях разбросаны

мелкие серебристо-белые пятна. Цветки средние, зеленовато-белые.
Происхождение. Была привезена в 1883 г. из Бразилии.

Содержание и уход. Содержат в помещениях с температурой зимой не ниже 16-18 °С и влажностью воздуха до 60-80%. Полив летом - умеренный, зимой - по мере подсыхания кома. Достаточно прихотлива, требует притенения от прямых солнечных лучей, боится сквозняков, не выносит резкого понижения температуры (ниже 16 °С) и излишней сырости почвы. Размножают верхушечными стеблевыми черенками. Весной обрезают, удаляя старые побеги, и в марте-апреле пересаживают в почвенную смесь из листовой земли, перегноя, торфа песка (3:0,25:1:1).

Использование. Одиночное или в композициях.

Бегония велтонская *Begonia weltonensis* W. Кустовидное растение высотой до 60 см с прямыми суккулентными голыми ярко-пурпурными обильно ветвящимися побегами. Листья кососердцевидные, с зубчатым краем, изумрудно-зеленые с бархатисто-муаровым блеском и ярко-красными жилками. Цветки крупные ярко-розовые. Цветет с июня по декабрь.

Происхождение. Межвидовой гибрид, полученный в 1864 г. в результате скрещивания бегонии Дреге и бегонии Сутерлянда.

Содержание и уход. Требуется умеренная температура 14-16 °С, достаточно света и защита от прямых солнечных лучей, влажный воздух (до 60%). Летом полив обильный, осенью его постепенно уменьшают. С началом нового роста пересаживают в смесь, из листовой земли, перегноя, торфа, песка (3:1:1:1). Летом – подкормка раз в 10-12 дней (2 г/л). Размножают верхушечными черенками.

Использование. Одиночное горшочное растение.

Бегония войлочная *Begonia venosa* H.

Кустовидное растение с прямыми, долго не поникающими побегами высотой до 80 см, покрыто обильным бурым войлочным опушением. Побеги толстые, суккулентные, буропятнистые. Листья ушковидные, с бурым

опущением по краям, темно-зеленые, блестящие, очень плотные. Цветки средние, кремово-белые. Цветет с поздней осени до весны.

Происхождение. Вид открыт в 1898 г. в Бразилии.

Содержание и уход. Хорошо растет при температуре 14-18 °С и солнечном освещении, однако от прямых лучей солнца требует защиты. Полив летом умеренный, зимой - очень осторожный, только после просыхания кома. В марте-апреле обрезают и пересаживают в смесь из листовой, дерновой земли, торфа, песка, перегноя (2:0,25:0,5:1:0,25). Летом раз в две недели подкармливают сбалансированным удобрением (2 г/л). Размножают верхушечными стеблевыми черенками.

Использование. Комнатное одиночное растение.

Бегония волнистая *Begonia undulate* S. Кустовидное растение высотой до 150 см с прямыми побегами, слабо одревесневающими у основания. Побеги плотные, сочные, коричневато-зеленые, голые или слабоопушенные, слабоветвящиеся, долго не лежащие. Листья ланцетные, темно-зеленые, блестящие. Цветки мелкие, белые, ароматные. Цветет с июля по октябрь.
Происхождение. В 1825 г. привезена из Бразилии.

Содержание и уход. Температура зимой -13 - 15 °С, необходимо затенение. Полив летом умеренный, зимой - очень осторожный, только после просыхания кома. Весной обрезают, удаляя старые побеги. В марте-апреле пересаживают в смесь из листовой земли, перегноя, торфа, песка (3:0,25:1:1). Летом подкармливают минеральными удобрениями раз в две недели (2 г/л). Размножают верхушечными стеблевыми черенками.

Использование. Одиночное или и в композициях.

2.4.2 Бегоний с толстыми корневищными побегами, лежащими на земле (или лежащими)

Бегония борщевиколистная *Begonia beracleifolia* S. Кустовидная листовая бегония высотой до 60 см с плотным толстым коричневым стеблем. Листья крупные, почти круглые, глубоко рассеченные, темно-зеленые с чуть

более светлыми зонами вдоль жилок. Цветет с весны все лето. Цветки крупные, в соцветии их до 30.

Происхождение. Была найдена в 1830 г. на юге Мексики в листопадных лесах. В культуре известны три разновидности этого вида.

Содержание и уход. В отличие от других видов устойчива к солнечной радиации. Необходимы яркий рассеянный свет (защита от прямых солнечных лучей), умеренная температура (16-18 °С). Полив летом равномерный, обильный, зимой - очень осторожный. Весной пересаживают в смесь из листовой земли, торфа, песка, перегноя (2:1:1:1). Размножают верхушечными стеблевыми и листовыми черенками. Эти бегонии можно пересаживать раз в два-три года, а в промежутках – чистить и подсыпать свежую землю.

***Бегония боуера Begonia bowerae* Z.** Низкорослое кустовидное растение с полегающими темно-пурпурными слабопятнистыми голыми побегами длиной до 25 см, покрытыми усохшими прилистниками. Очень многочисленны побеги второго порядка с одним двумя листьями. У основания растения развивается масса корневых отпрысков, благодаря чему образуется низкая изящная куртина. Листья мелкие, кососердцевидные со слабоволнистым реснитчатым опушением, изумрудно-зеленые с темно-оливковым прерывистым рисунком по краю. Цветки бело-розовые с красными пятнышками на внешней стороне лепестков высоко поднимаются над куртиной листьев. Цветет весной — в начале лета.

Происхождение. Произрастает во влажных субтропиках южной части Мексики. В культуре известно несколько сортов, полученных путем скрещивания бегонии Боуера с другими видами. Введена в культуру в 1860 г.

Бегония гриффита *Begonia griffithii* H. Кустовидное травянистое растение высотой 30-50 см с лежащими побегами. Листья широкояйцевидные, с волнистым, городчатым краем, темно-оливково-зеленые в центре и по краю с широкой серебристой зоной. Все растение густо опушено фиолетово-красными волосками. Цветки крупные, беловато-розовые, цветет в январе—феврале.

Происхождение. Влажные субтропики Гималаев. Открыта Гриффитом в Бутане и описана в 1857 г.

Содержание и уход. Требуется температуры воздуха зимой 14-15 °С, относительной влажности 60%, притенения от прямых солнечных лучей. Полив летом — обильный, зимой — очень умеренный. В марте—апреле чистят, обрезают, пересаживают в смесь из листовой земли, торфа, песка, перегноя (2:1:1:0,25). Летом подкармливают раз в 10-12 дней минеральными удобрениями (2 г/л). Размножают верхушечными и листовыми черенками и делением куста.

Использование. Одиночное и в композициях.

Бегония кислая *Begonia acida* V. Кустовидное растение высотой до 50 см с круглыми светло-зелеными сильноопушенными побегами. Листья крупные, почти почковидные, изумрудно-зеленые с морщинистой поверхностью, белоопушенные. Цветки мелкие белые. Цветет весной, в марте-мае.

Происхождение. Тропики восточной части Бразилии, где произрастает в тенистых лесах на камнях. Открыта в 1790 г.

Содержание и уход. Теплолюбивое растение, зимняя температура содержания - 16-18 °С. Необходим рассеянный свет и влажность воздуха не ниже 60%. Полив летом умеренный, зимой - очень осторожный. В марте-апреле обрезают и пересаживают в смесь из листовой земли, торфа, песка, перегноя (3:1:1:0,25). Размножают листовыми и верхушечными стеблевыми черенками. Через месяц после пересадки подкармливают раз в 10-12 дней минеральным удобрением (2 г/д).

Использование. Одиночное и в композициях.

Бегония клещевинолистная *Begonia ricinifolia* D. Кустовидная листовая бегония с плотным коричневым ползучим стеблем. Листья крупные, почти округлые, в основании глубоко рассеченные, бронзово-зеленые, опушенные. Цветки мелкие, белые, снаружи опушенные. Цветет с февраля по август.

Происхождение. Старейший гибрид, полученный в 1547 Г. от скрещивания бегонии борщевиколистной и бегонии крупнолистной.

Содержание и уход. Требуется светлого, но защищенного от полуденных солнечных лучей места. Температура зимой - 14-15 °С. Полив летом обильный, зимой — умеренный. С октября по февраль рост приостанавливается. В марте—апреле пересаживают в плоские горшки в смесь из листовой земли, песка, торфа, перегноя (3:1:1:1). Летом раз в две недели подкармливают комплексным удобрением (2 г/л). Пересаживать можно раз в два-три года. Размножают листовыми или верхушечными черенками в апреле-мае.

Использование. Одиночное в композициях.

Бегония королевская *Begonia rex* Р. Один из самых ярких представителей группы листовых бегоний. Стебель плотный, толстый, ползучий. Листья крупные, кососердцевидные в основании. Верхняя поверхность листа, как правило, ярко и контрастно окрашенная, голая или слегка опушенная, шелковисто-блестящая, зеленая, с серебристо-белыми зонами. Цветки крупные, от белых до ярко-розовых. Цветет с весны до конца лета.

Происхождение. Была случайно завезена в Англию в 1856 г. из Ассама (Индия, Восточные Гималаи) в контейнере с орхидеями.

Содержание и уход. Этот вид и его производные предпочитают температуру зимой около 12 °С. Растение теневыносливо, причем, чем выше температура, тем глубже должна быть тень. Полив летом обильный, зимой — редкий, только после просыхания земляного кома. Зимой растение следует периодически чистить, удаляя сухие, пожелтевшие листья. В марте—апреле пересаживают в легкую смесь — листовая земля, перегной, торф и песок (3:1:1:1). Первое время после пересадки растения поливают умеренно, ком не должен быть мокрым. Размножают листовыми и верхушечными стеблевыми черенками или делением куста. С апреля по октябрь регулярно подкармливают (раз в 10-12 дней) комплексным удобрением (N:P:K — 1:1:1),

а во второй половине лета это соотношение меняют, увеличивая долю калия и уменьшая — азота (0,5:1:2).

Использование. В композициях и как одиночное.

Большая группа сортов этого вида бегоний - декоративно-лиственные растения с толстым суккулентным стеблем, обычно лежащим на земле или полегающим. Листья на длинных черешках, крупные, косояйцевидные, со слабоволнистым, слабозазубренным краем, с разнообразным опушением и очень эффектной окраской. Цветки немногочисленные, декоративной ценности не представляют.

2.4.3 Бегонии с ползучими или поникающими тонкими гибкими побегами

Бегония буколистная Begonia fagifolia F. Низкое куртинообразующее растение с длинными (до 1 м) зеленовато-буроватыми белоопушенными побегами. Листья эллиптические, темно-зеленые, белоопушенные. Цветки мелкие, белые. Цветет в январе-феврале.

Происхождение. Произрастает в Бразилии и Перу.

Содержание и уход. Растет в условиях теплого и умеренного режима, при 14-18 °С зимой, достаточно теневыносливо, летом полив умеренный, зимой - после просыхания земляного кома. В марте-апреле пересаживают в смесь из листовой земли, торфа, песка, перегноя (2:1:1:0,25). Летом регулярно (раз в 10-12 дней) подкармливают (2 г/л). Размножают стеблевыми черенками, отводками.

Использование. Как почвопокровное в зимних садах либо как ампельное в жилых помещениях.

Бегония вьюнковая Begonia convolvulacea D. Невысокое растение (до 30 см), отличается очень длинными, до 2 м, сочными зелеными голыми побегами, по всей длине которых могут возникать корни. Лист крупный, широкояйцевидный, голый, темно-зеленый, блестящий. Цветки мелкие, белые. Цветет в сентябре-декабре.

Родина, происхождение. Найдена в 1853 г. во влажных субтропиках на юге Бразилии.

Содержание и уход. Для этого мощного, сильнорослого растения пригодно любое прохладное помещение (12-14 °С) с достаточным рассеянным светом. Полив летом обильный, зимой - только после просыхания кома. Желательна ежегодная пересадка и обрезка для получения новых молодых побегов. Пересаживают в смесь из листовой земли, промытого песка, перегноя и торфа. Размножают зелеными верхушечными черенками. Летом регулярно (раз в 10-12 дней) подкармливают (2 г/л).

Использование. Как ампельное, а также почвопокровное растение.

Бегония голая *Begonia glabra* А. Низкое кустовидное травянистое растение с длинными (до 1 м) ползучими голыми зелеными побегами. Листья средние, яйцевидные, по краю неравнозубчатые, светло-зеленые, блестящие, голые. Цветки мелкие, белые. Цветет в феврале-марте.

Происхождение. Тропики Центральной Америки, Антильские острова, север Южной Америки. Растет на покрытых мхом стволах деревьев, скалах. В 1779 г. была обнаружена на Ямайке и в Гвиане.

Содержание и уход. Теплолюбива, зимой температура 16-18 °С, высокая влажность воздуха (60%). Полив умеренный летом и очень осторожный - зимой. Тенелюбива. Побеги легко «уходят» из горшка и могут укореняться. Весной пересаживают в смесь из листовой земли, торфа, песка и перегноя (3:1:1:0,25). Летом подкармливают раз в 10-72 дней (2 г/л). Размножают стеблевыми и листовыми черенками, отводками.

Использование. Как почвопокровное и ампельное.

2.4.4 Бегонии – родоначальники гибридных цветущих форм

Бегония вечноцветущая *Begonia semperflorens* L. Невысокое травянистое растение (20-40 см) с прямостоячими сочными зелеными стеблями. Листья косояйцевидные до сердцевидных, голые, сверху темно-

зеленые блестящие, снизу — светло-зеленые, обе стороны голые. Цветки средние, от белых до розовых. Цветет в июне—ноябре.

Происхождение. Семена этой бегонии были случайно завезены с землей и растениями из Южной Бразилии в Ботанический сад Берлина. Яркое и продолжительное ее цветение было тут же использовано в гибридизационной работе.

Содержание и уход. Растению нужна умеренная температура 14-16 °С, зимой даже ниже 12-15 °С, много света, а летом — защита от прямых солнечных лучей, особенно в полуденные часы. Зимой — как можно больше света, иногда необходима подсветка. Очень страдает от недостатка света, вытягивается и даже может погибнуть при высокой температуре воздуха и дефиците освещенности. Летом обильный полив, зимой — очень умеренный. Необходимо ежегодно омолаживать, т. е. черенковать и выращивать новые молодые растения. Размножают стеблевыми верхушечными черенками и семенами. Сеянцы с появлением первой пары настоящих листьев пикируют (один-два раза, в зависимости от времени посева). Летом раз в две недели проводят подкормки. Обязательна прищипка растений для образования более компактного куста.

Использование. Как цветущее декоративное растение.

Особые замечки. Зимой необходимо дополнительное освещение.

Бегония сокотрская Begonia socotrana Н. Кустовидное растение высотой 10-30 см с гибкими зелеными побегами, в основании которых на поверхности почвы после цветения образуется гроздь мелких, сначала зеленых, а позже коричневых бульбочек. Листья почти круглые, с вдавленным центром, по краю слабоволнистые и городчатые, темно-зеленые, чуть блестящие, голые. Цветки крупные, розовые с желтоватой серединой. Цветет в ноябре-феврале.

Происхождение. Этот эндемичный вид произрастает только на острове Сокотра. Был впервые обнаружен в 1880 г. Этот вид послужил исходным

материалом для получения бегоний, цветущих к *Рождеству*. Новые группы сортов впоследствии были названы Лоррейн и Элатиор-бегонии.

Содержание и уход. Растет при умеренно-теплом режиме и затенении. После цветения рост постепенно затухает, листья желтеют и опадают, но растение полностью на покой не уходит. В этот период надо обеспечить его водой, чтобы корневая система бульбочек не высохла, но и не было переувлажнения. После цветения удаляют все цветки и до конца апреля держат при температуре 12-15 °С, поддерживая влажность воздуха. Старые побеги не удаляют до тех пор, пока не появятся новые. В начале роста полив очень осторожный. В апреле-мае старые растения переваливают в смесь листовой земли, перегноя, торфа и песка (3:0,5:1:1). Летом раз в две недели подкармливают минеральными удобрениями. Размножают стеблевыми черенками (молодые побеги из основания куста) в мае-июне и листовыми черенками в декабре-январе.

Использование. Как зимнецветущее декоративное растение.

Глюар де Лоррейн Begonia Gloire de Lorrain.L Кустовидное растение до 30 см высотой с тонкими гибкими голыми зелеными побегами, легко поникающими в период цветения под тяжестью соцветий. Листья почти округлые, блестящие, светло-зеленые с красноватым пятном в месте прикрепления черешка. Цветки простые, некрупные, розовые. Время цветения ноябрь-январь.

Происхождение. Сорт получен в 1892 г. от скрещивания бегонии сокотрской с бегонией Дреге французским садоводом В. Лемуаном. Это первоисточник всех сортов и гибридов, полученных позже и объединенных в большую группу зимнецветущих, или Лоррейн-бегоний.

Содержание и уход. Для роста Лоррейн-бегоний нужна температура 18-20 °С, с началом цветения температуру снижают до 12-15 °С. Необходимо много воздуха при относительной влажности 60%, достаточно света, однако от полуденных солнечных лучей растение надо притенять. Следует избегать избыточной влажности воздуха и почвы. Полив летом умеренный, зимой -

очень осторожный. Размножают листовыми и стеблевыми черенками с ноября по март. Идеальные черенки - стеблевые, появляющиеся весной после обрезки старых побегов. В качестве листовых черенков следует брать зрелые листья. Молодые укоренившиеся черенки высаживают в смесь листовой земли, торфа, перегноя и песка (2:1:0,25:0,5), для взрослых растений такая же смесь, но в соотношении 2:1:1:0,5.

Использование. Как зимнецветущее комнатное растение.

Особые заметки. Зимой необходимо дополнительное освещение.

2.5 Условия содержания и основы агротехники

Температурный режим: Летом температура воздуха в жилых помещениях должна быть 22-25 °С, но зимой следует снизить до 16-18 °С. Бегонии являются теневыносливыми и тенелюбивыми растениями. Летом стоит защищать их от прямых солнечных лучей, а зимой размещать ближе к источнику света.

Почвы: Субстрат для бегоний должен быть легким, рыхлым, с хорошей влаго- и воздухопроницаемостью, и обеспеченностью элементами минерального питания в легкодоступной форме. Для выращивания почти всех бегоний нужна легкая почвенная смесь, состоящая из листовой земли, торфа, песка и перегноя (2-3:1:1:0.5-1).

Минеральные удобрения: должны содержать фосфор, калий, кальций, магний. Можно подкармливать раствором коровяка, аммиачной селитрой, мочевиной.

Полив: Поливать стоит при сухости земли, если в поддоне остается вода ее необходимо слить. Вода для полива должна быть комнатной температуры.

Пересадка: Молодые растения требуют ежегодной пересадки. Старые экземпляры бегоний перед пересадкой можно предварительно разделить на две – три части и, присыпав пораненные места углем, посадить их отдельно друг от друга и полить (Шахова, 2005).

Данные сведения по уходу создают представление о том, какие условия должны создаваться по уходу за представителями, которые будут изучаться и использоваться для проведения практических работ по МКР.

ГЛАВА 3. СОСТАВЫ СРЕД ДЛЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ И ОСОБЕННОСТИ ИХ ПРИМЕНИМОСТИ ДЛЯ *BEGONIA REX* P

Растения различных таксонов размножаются методиками МКР, что демонстрирует высокую применимость данного метода. Существует множество вариаций применения сред для введения растений в культуру *in vitro*. На сегодняшний день известны питательные среды, отличающиеся по минеральному и органическому составу, например среда Уайта, среда Гамборга, или В-5. (Приложение 1). В связи с этим наибольшую практическую ценность представляют питательные среды, характеризующиеся относительной универсальностью и дающие хорошие результаты для разных видов и сортов растений. Наиболее близким техническим решением, выбранным в качестве прототипа, является модифицированная питательная среда с макро- и микроэлементами по Мурасиге-Скугу [46] (Табл.1).

Таблица 1

«Стандартный состав среды МС»

Компоненты	Среда, мг/л	Маточный раствор	Количество маточного раствора на 1л среды, мл
1. Макросоли, г/л маточного раствора			
NH ₄ NO ₃	1650	33	50
KN0 ₃	1900	38	
KH ₂ PO ₄	170	3,4	
MgSO ₄ *7H ₂ 0	370	7,4	
2. Кальций, г/200 мл маточного раствора			
CaCl ₂	440	8,8	10
3. Микросоли, мг/100 мл маточного раствора			
Na ₂ Mo0 ₄ *2H ₂ 0	0,25	25	

H ₃ BO ₃	6,2	620	1
MnSO ₄ *4H ₂ O	22,3	2230	
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	860	
KJ	0,83	83	
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	2,5	
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	2,5	
1. Хелат железа, г/л маточного раствора			
FeSO ₄ *7H ₂ O		5,57	5
Na ₂ ЭДТА*2H ₂ O		7,45	
0			
2. Витамины и органические соединения			
Тиамин	0,1		Витамины и органические соединения вводить в день приготовления среды (pH=5,6-5,8)
Пиридоксин	0,5		
Никотиновая кислота	0,5		
Мезоинезит	100		
Глицин	2		
ИУК	В зависимости от экспланта		
Кинетин	0,2		
Сахароза г/л	30		
Агар г/л	7		

Среда Мурасиге –Скуга для разных видов растений также может преобразовываться.

Обратимся к нескольким методикам, чтобы проследить как авторы меняли состав среды для того или иного растения.

Например, сотрудник Брянской с/х академии Н.В. Леонова (2012) проводила оптимизацию состава питательной среды при размножении *in vitro* земляники садовой. Питательные среды для данного эксперимента готовились на основе минеральной части среды Мурасиге – Скуга с увеличением в 3 раза концентрации хелата железа.

Ученые Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины О.М. Бублик, И.О. Андреев, К.В. Спиридонова, Л.П. Можилевська, В.А. Кунах (2011) занимались культивированием *in vitro* унгернии виктора. Соотношение различных компонентов среды Мурасиге – Скуга было таким:

Макроэлементы – МС (усовершенствованные), Микроэлементы – МС, Тиамин – 1мг/л, Пиридоксин – 0,5 мг/л, Никотиновая кислота – 0,5мг/л, Глицин – 2мг/л, Мезоинозит – 80мг/л, Гидролизат казеина – 500мг/л, Хелат железа – 5мг/л, Сахароза – 5%, Агар – 9г/л.

В Саратовском ГАУ имени Н.И. Вавилова Лобачев Ю.В., Костина Е.Е., Ткаченко О.В. (2014) изучали влияние консистенции питательной среды и генетических факторов на морфогенез подсолнечника *in vitro*. Для регенерации ими была использована среда Мурасиге – Скуга с добавлением 6-бензилоаминопурина (6БАП) 0,5 мг/л, гидролизата казеина 500 мг/л и инозита 100 мг/л.

По данным М.В. Насыревой, Н.А. Вечернина, О.К. Таварткиладзе (2008) *Begonia rex* Putzeys является трудно распространяемой культурой по ряду причин. Во – первых, недостаток вегетативного способа размножения заключается в том, что такое размножение имеет низкий коэффициент, от одного листа возможно получить не более 3-4 растений. Во – вторых, существуют ограничения в распространении бегонии, связанные с длительностью процесса размножения, требовательностью культуры к температурному режиму, а также подверженностью заболеваниям.

В работе приводятся данные по влиянию экзогенных регуляторов роста на индукцию морфогенетических процессов в культуре изолированных фрагментов листьев бегонии королевской.

Проводя эксперимент, использовали в качестве первичных эксплантов фрагменты различающихся по размеру листьев:

- базальные части от листовых пластинок размером 12*15 и 7*10 мм;
- срединные части от листовых пластинок размером 12*15 и 7*10 мм;
- кончики от листовых пластинок 12*15 и 7*10 мм;
- цельные листовые пластинки размером 5*5
- черешки листьев

Для стерилизации использовали раствор 0.1% сулемы в течении 20 мин, затем четырежды промывали в стерильной дистиллированной воде, в последней порции воды 40 мин.

Экспланты культивировали на агаризованных питательных средах (0.6% агар) с минеральной основой по прописи Мурасиге и Скута (МС), дополненных различными регуляторами роста: 6-бензиламинопурином (БАП), 1-нафтилуксусной кислотой (НУК), кинетином (К), аденин сульфатом (Ас). Стерилизация сред проводилась в автоклаве при давлении 0.9+- 0.1 атм.

Операции, требующие асептики проводили в ламинар-боксе. Культивирование осуществляли в условиях фотопериода 16/8 ч свет/темнота 25+-1 °С. Субкультивирование проводили через 25 – 28 суток. Ускоренное размножение побегов проводили на модифицированной МС питательной среде, дополненной 0.5 мкМ НУК. В течение 2-3 недель адаптировали растения-регенеранты к условиям *in vitro*. Для этого использовали гидропонную установку «Минивит – 0.35».

Проведя опыты, авторы установили, что различные типы эксплантов характеризовались разной интенсивностью регенерационных процессов. Общим же было то, что образование меристематических очагов с последующей регенерацией в них почек проходило преимущественно в области центральной жилки и в раневых зонах. Также была установлена связь между процессом регенерации и типом экспланта. Способность эксплантов регенерировать растения характеризуется морфогенетическим потенциалом. Вот некоторые закономерности его изменчивости:

-он увеличивается, если брать экспланты от укорененного растения по сравнению с неукорененными растениями в искусственной культуре.

- м.п листьев возрастает от нижних листьев к верхним

- наибольшей способностью к регенерации обладают ткани экспланта основания листа

- предпочтение нужно отдавать небольшим листьям, в виду их молодости

Возраст источника экспланта тоже имеет значение: чем моложе, тем больше морфогенетический потенциал.

В ходе работы стало известно, что различные регуляторы роста, добавляемые в среду, взаимодействуют с эксплантами по-разному. Например, для целых листовых пластинок 5*5 мм, для отрезков черешков и кончиков листовой пластинки оказалось более эффективным введение в состав среды 2 мкМ БАП и 0.5 мкМ НУК. Увеличение концентрации регуляторов приводило к угнетению регенерационных процессов. Экспланты от базальной и средней части листа регенирировали наибольшее количество побегов на среде, дополненной только БАП 2мкМ. Замена БАП на К (кинетин) привела к отрицательному результату и доказана малоэффективность Ас (аденин сульфата) как индуктора.

ГЛАВА 5. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

5.1 Состав применяемой питательной среды и отбор эксплантов

Автором использовалась стандартная среда Мурасиге – Скуга (Табл. 1) с добавлением гормонов ауксинового и цитокининового ряда 6-БАП (6-бензиламинопурин) – 0,5мг на 0,5л среды ИУК (индолилуксусная кислота) – 0,05мг на 0,5л среды.

В качестве модельного объекта было использовано растение рода Бегония (*Begonia*) бегония королевская (*Begonia rex* P.). Бегония королевская приобреталась в цветочном магазине, отбор и стерилизация эксплантов проводились в лаборатории. Отбор эксплантов проводился с учётом того, что в присутствии регуляторов роста в среде, все типы листовых эксплантов бегонии королевской способны к формированию адвентивных побегов. Основной регенерационной зоной является базальная часть листовой пластинки и черешок. Самая низкая способность к регенерации характерна для средней части и кончика листовой пластины (М.В Насырева, Н.А Вечернина, О.К Таварткиладзе, 2008).

Работы по культивированию бегонии королевской (*Begonia rex* P.) включали также приготовление среды для каллусообразования из листовых черенков. Среда для каллусообразования несколько отличается от среды для культивирования эксплантов и содержит компоненты, представленные в таблице 2.

Таблица 2

Среда для получения каллуса бегоний

Компонент	Концентрация мг/л
Минеральная основа среды МС	
ЭДТА	37,3
Дрожжевой экстракт (или ГРМ)	40
6-БАП	0,2

2,4-Д	1
Тиамин	0,1
Пиридоксин	0,1
Никотиновая кислота	40

5.2 Стерилизация эксплантов

Перед посадкой в среду экспланты подвергались стерилизации. Отбирался молодые листья бегонии - будущий посадочный материал. Проведя несколько посадок и получив не всегда хороший процент выхода жизнеспособных регенератов, решили усовершенствовать этап стерилизации и впоследствии место разреза листьев начали обрабатывать стерильным воском содержащим цефазолин. Предполагалось, что при промывании эксплантов, края которых обработаны воском, в пространства апопласта не будет попадал дезинфектант.

После обработки воском экспланты помещали в специальные кассеты, и промывали под струёй тёплой воды (30 °С) 40 минут, периодически перемешивали кассеты. Затем кассеты с посадочным материалом помещали в раствор ПАВ (хозяйственного мыла) и ставили в шейкер на 25 минут. После чего кассеты промывали стерилизованной водой. Затем помещали в 70% спирт периодически помешивая.

Следующие стадии по стерилизации осуществлялись в ламинар – боксе, который предварительно мыли раствором гипохлорита натрия (NaClO) и оставляли на облучение в течение 40 минут УФ - лампами. В ламинар – боксе стерильной водой кассеты с эксплантами промывались от остатков ПАВ.

После чего посадочный материал помещали в 5% раствор NaClO - гипохлорита натрия периодически помешивая, объекты находились в растворе 10 мин (Дитченко, 2007).

По истечению времени кассеты с материалами промывали в трёх порциях стерильной воды и время от времени помешивали. Подробно последовательность и продолжительность этапов обработки представлена в таблице (Табл. 3).

Таблица 3

Последовательность этапов и временные промежутки при стерилизации
экспланта

Исходный материал	ПАВ (в мин)	C ₂ H ₅ ОН 70% (в сек)	NaClO 5% (в мин)	H ₂ O ₂ 10% (в мин)	Промывка (в мин)
Молодые листья	25	20-30	10	5	5

В условиях дальнейших экспериментов с бегониями использовали в качестве дезинфектанта 3D – Септ. Средство «3D-Септ» представляет собой состав общего стерилизующего действия, сочетает противовирусные и антимикробные свойства. В состав в качестве действующих веществ (ДВ) входит алкилдиметилбензиламмония хлорид (ЧАС) – 8,5%, дидецилдиметиламмония хлорид (ЧАС) – 4%, а также неионогенные поверхностно-активные вещества и натуральные терпеновые масла цитрусовых растений. рН 1% водного раствора средства 7,0.

«3D – Септ» применяется в основном в медицинских учреждениях для стерилизации инструментов и поверхностей. Выбор дезинфицирующего средства обоснован следующими преимуществами «3D – Септа» перед другими антисептиками:

- «3D – Септ» антисептик широкого спектра действия, проявляет бактерицидное, вирулицидное и фунгицидное действие;
- доступен для приобретения (относительно недорогой),
- не содержит не разлагаемых ядовитых компонентов, т.е. легко утилизировать его растворы (например, другой типичный для БТ

дизинфектант - сулема - содержит ртуть, сложно утилизируется, поскольку растворенная форма ртути токсична).

Для стерилизации эксплантов готовился раствор 2% «3D-Септа» и 3% перекиси водорода (H_2O_2). Используемая концентрация дезинфектанта, была выбрана с учетом следующих предположений:

- 1) При выборе слишком низкой концентрации, значительно продлевается время экспозиции в дезинфицирующем растворе;
- 2) Слишком высокая концентрация раствора повышает риск гибели живой ткани листа;

Сначала кассеты с эксплантами помещались на 6 минут в раствор «3D – Септа», после на 2 минуты в раствор перекиси. Стерилизация в такой последовательности является наиболее эффективной вероятно за счёт того, что перекись окисляет органические соединения в составе «3D – септа», делая его менее токсичным для эксплантов.

Подробно последовательность и продолжительность этапов обработки представлена в таблице (Табл. 4).

Таблица 4

Последовательность и продолжительность этапов обработки

Исходный материал	ПАВ (мин)	3D–септ 2% (мин)	H_2O_2 3% (мин)	Промывка стер. водой
Молодые листья	25	15	2	10

Оптимально время экспозиции эксплантов в «3D – Септе» устанавливалось экспериментально.

После стерилизации «3D – Септом» и перекисью, кассеты с эксплантами вновь промывали в 4 порциях стерильной воды поэтапно по 15 минут в каждой, для того чтобы смыть остатки стерилизующих растворов. На этом этап стерилизации завершили.

Далее следовало извлечение стерильных эксплантов из кассет, удаление концевых и краевых участков экспланта и высадка их на агаризованную питательную среду.

Антибиотики также используются для подавления роста микроорганизмов в суспензионных культурах, стерилизации нежных тканей и корончатогалловых опухолей. Поскольку антибиотики являются термолабильными веществами, их стерилизуют только методами фильтрования и добавляют в охлажденную среду. При использовании антибиотиков руководствуются тем правилом, что применяют либо несколько антибиотиков, действующих на разные микроорганизмы, либо один, но с широким спектром микробного действия (Дитченко, 2007).

В ходе исследовательской деятельности применяли антибиотик цефазолин. Цефазолин — цефалоспориновый антибиотик 1-го поколения. Действует бактерицидно. Обладает широким спектром антимикробного действия. Активен как в отношении грамположительных (*Staphylococcus spp.*, продуцирующие и не продуцирующие пенициллиназу штаммы, *Streptococcus spp.*, *Pneumococcus*, *Corynebacterium diphtheriae*, *B. anthracis*), так и грамотрицательных микроорганизмов (*N. meningitides*, *N. gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *E. coli*, *Klebsiella*). Активен также в отношении *Spirochaetaceae* и *Leptospiraceae*. Препарат не эффективен в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, индолположительных штаммов *Proteus*, *Mycobacterium tuberculosis*, анаэробных микроорганизмов. По сравнению с другими препаратами из группы цефалоспоринов первого поколения, он

является самым безопасным лекарственным препаратом, поскольку обладает минимальной токсичностью.

5.3 Введение растений в культуру *in vitro*

Далее следовала подготовка рабочего места в ламинар - боксе: обработка рабочего места 75-% спиртом, расстановка материалов и оборудования на рабочий стол, как показано на рис.1.



Рис. 1. Рабочее место в ламинар – боксе (правое)

После посадки всех эксплантов на среду, закрыли все пробирки ватно-марлевыми пробками, на пробки сверху поместили кусочками целлофана, кальки или фольги, зафиксировали их серными резинками. Это нужно для того, чтобы избежать попадания пыли и воды в стерильные пробирки с эксплантами.

Подписи пробирок осуществлялись CD – маркером (число высадки, инициалы оператора и наименование культуры.) Пробирки помещали в штативы, в шахматном порядке, чтобы хорошо попадал свет, и перенести в светоустановку, с фотопериодом 14-16 часов и освещенностью около 5 кЛк.

Выбраковку проводили через 1,5-2 недели.

5.4 Техника стимуляции адвентивных побегов

В практике эффективно применяются гормональные пасты как промышленного, так и самостоятельного производства. Автором работы использовалась паста собственного приготовления с фиксированным содержанием 6-бензиламинопурина 10мг/мл.

Приготовление пасты с фитогормоном – цитокинином. Навеска цитокинина 20мг растворялась в спирте (около 0,5мл), до получения однородного раствора или мелкой взвеси, из расчета 10мг на 1мл пасты. Ланолин или медицинский вазелин расплавлялся в маленьком бюксе на магнитной мешалке с нагревателем, при температуре около 45-50 °С, затем добавлялся концентрат цитокинина в результате promешивания получалась мутная однородная масса. Состав автоклавировался стандартным методом в вертикальном бюксе, закрытом ватно-марлевой пробкой, и завернутым в бумагу (необходимо т.к. весь этанол должен испариться в процессе).

В ходе введения в культуру паста использовалась следующим образом. На первых этапах использовали аналог микробиологической петли. Из жесткой стальной проволоки был изготовлен петля диаметром отверстия около 1,5мм. Изготовленную петлю прокаливали до ручки в пламени спиртовки, остужали о стенку сосуда с пастой, и брали еще теплой петлей, поворачивая ее, шарик пасты.

Позднее использовали цельностеклянные микрошприцы. Наносили на поверхность экспланта шарик пасты и делали прокол насквозь стерильной медицинской иглой, частично нарушив покровы экспланта.

Эксплант поместили на поверхность среды, чтобы цитокининовая паста осталась на границе сред. Зеленые экспланты выращивали при стандартных условиях.

ГЛАВА 6. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе научной деятельности по микроклональному размножению бегонии королевской (*Begonia rex* P.) проводились различные опыты и были достигнуты следующие результаты:

- 1) Установлен оптимальный режим стерилизации эксплантов Бегонии королевской (*Begonia rex* P.).

При применении в качестве дезинфектанта гипохлорита натрия (NaClO) и анализа полученных результатов установлено, что выход жизнеспособных регенерантов был минимальным и составлял при первой посадке 21,4%. Первая посадка проходила не успешно вероятно потому, что были выбран старый посадочный материал или листья имели внутренние клеточные инфекции, поэтому первичные данные следует не учитывать. Анализ второй посадки показал незначительное повышение выхода жизнеспособных регенерантов – 23,4%. Был сделан вывод о том, что минимальный выход жизнеспособных регенерантов вероятно связан с тем, что гипохлорит натрия (NaClO) является слишком жестким окислителем и уничтожает кроме бактерий живые меристематические клетки, что приводит к гибели культивируемых эксплантов.

Использование «3D-Септа» показало положительные результаты по выходу жизнеспособных растений, он составил 56,5%, кроме этого наблюдался значительный процент выхода стерильных регенерантов – 47,8%, а количество регенерантов с нарушенной стерильностью уменьшилось до 11,6%. Предположительно такой результат связан с тем, что «3D - Септ» имеет широкий спектр действия и не окисляет живые ткани листа, так как бактерицидное действие четвертично – аммониевых соединений, связано с инактивацией синтеза клеточных ферментов, денатурацией клеточных белков и нарушением проницаемости клеточных мембран (Табл. 5.).

Таблица 5

Стерильность и жизнеспособность эксплантов в зависимости от
способа стерилизации

Дезинф. р-р	Стериль- ность нарушена		Стерильные регенер.		Нежизнесп. регенер.		Жизнесп. регенер.		Всего эксплантов
	%	кол- во	%	кол- во	%	кол- во	%	кол- во	
NaClO	33,3	14	47,6	20	78,6	33	21,4	9	42
NaClO	17,2	11	37,5	24	76,5	49	23,4	15	64
3D-Септ	11,6	8	47,8	33	43,5	30	56,5	39	69

Применение пчелинного расплавленного воска с цефазолином, на наш взгляд, также способствовало увеличению выхода жизнеспособных регенерантов.

Кроме этого экспериментально было установлено наиболее благоприятное время экспозиции эксплантов в «3D – Септе» (Табл. 6.).

Таблица 6

Данные по выживаемости регенерантов, при различных экспозициях в
3D – Септе

Время экспозиции в р-ре 3D - Септа (мин)	3	6	9	12
Количество стерильных регенерантов (шт/%)	1(7,2%)	11(61,1%)	14(82,4%)	15(93,7%)
Количество регенерантов, с нарушением стерильности (шт/%)	13(92,8%)	7(38,9%)	3(17,6%)	1(6,3%)

Количество жизнеспособных регенерантов (шт/%)	14(100%)	13(72,2%)	5(29,4%)	0(0%)
Всего регенерантов	14	18	17	16

2) Был опробован новый состав на основе среды Мурасиге – Скуга для каллуса с внесением антибиотика широкого спектра действия – Цефазолина. Данная среда использовалась с добавлением синтетического ауксина 2,4 Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота) для индукции каллусогенеза.

Анализируя данные эксперимента, было установлено, что присутствие в среде для каллуса антибиотика в сочетании с синтетическим ауксином 2,4 Д положительно сказывается на культивировании каллуса. На среде с содержанием 2,4 Д и антибиотика в 56,7% случаев наблюдалось образование каллуса, кроме этого процент стерильности составил 36,7%. В то время как в отсутствие антибиотика процент стерильности снижался до 20%, а образования каллуса снижается до 26,7%, вероятно по причине зараженности клеток листьев, использованных для каллусогенеза, микроорганизмами (Табл.7) (Рис.2) (Рис.3).

Таблица 7

Стерильность и каллусообразование в среде с добавлением и отсутствием
Цефазолина

Антибиотик +/-	Стерильность нарушена		Стерильность		Каллус отсут.		Образование каллуса		Всего пробирок
	%	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%	кол-во	
Цефазолин +	26,7	8	36,7	11	43,3	13	56,7	17	30
Цефазолин -	46,7	14	20	6	66,7	20	26,7	8	30

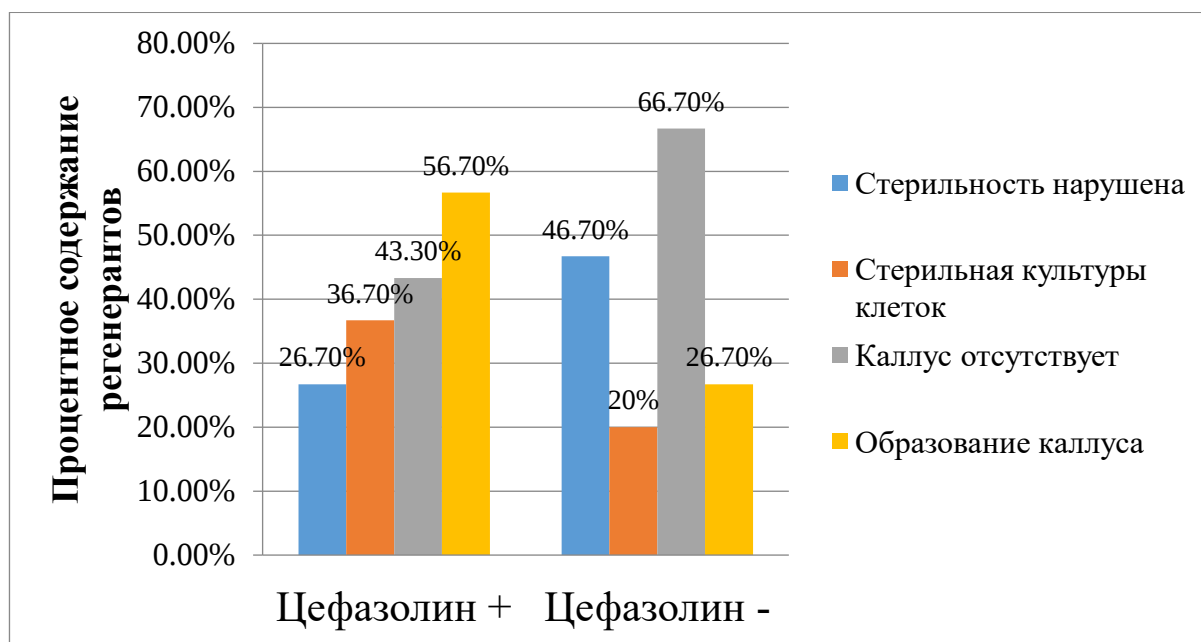


Рис. 2. Процент стерильности и каллусообразования в среде с добавлением и отсутствием Цефазолина



А

Б

Рис 3. Экспланты на среде для каллуса с антибиотиком (А)
и без антибиотика (Б)

Исходя из данных, достигнуть более высокого процента каллусообразования можно благодаря внесению на среду с содержанием 2,4 Д антибиотика цефазолина при её изготовлении. Связан такой результат вероятнее всего с тем, что цефазолин является антибиотиком широкого спектра действия, за счёт чего происходит предотвращение развития микроорганизмов в среде для культивации и исключение их пагубного влияния на развитие каллусной культуры *in vitro*.

ГЛАВА 7. ПРИМЕНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЛЯ РАБОТЫ С УЧАЩИМИСЯ ШКОЛ

Для оценки возможности проведения работ по микроклональному размножению растений были разработаны и проведены на базе ПГГПУ пробные занятия по данной теме с учениками «Лицея №9» и «СОШ №135».

Целью работ являлось микроисследование *«Влияние различных pH среды на рост и развитие растений»*.

Первое занятие проходило в виде экскурсии в ботанический музей и в лаборатории кафедры ботаники. В ходе экскурсии ученики познакомились и узнали интересные факты про разные виды растений Пермского края и других регионов. Кроме этого узнали о материальной базе лабораторий кафедры, техническом оснащении и возможности проведения тех или иных исследований в рамках университета.

На следующем занятии учащимся предлагался вводный тест по теме «Микроклональное размножение растений» (Приложение 2).

В ходе оценки первоначального тестирования был установлен очень низкий результат у всех тестируемых, что было ожидаемо, т.к. никто из учащихся не имел четких и структурированных знаний об основах микроклонального размножения растений способом *in vitro* (рис 4.).

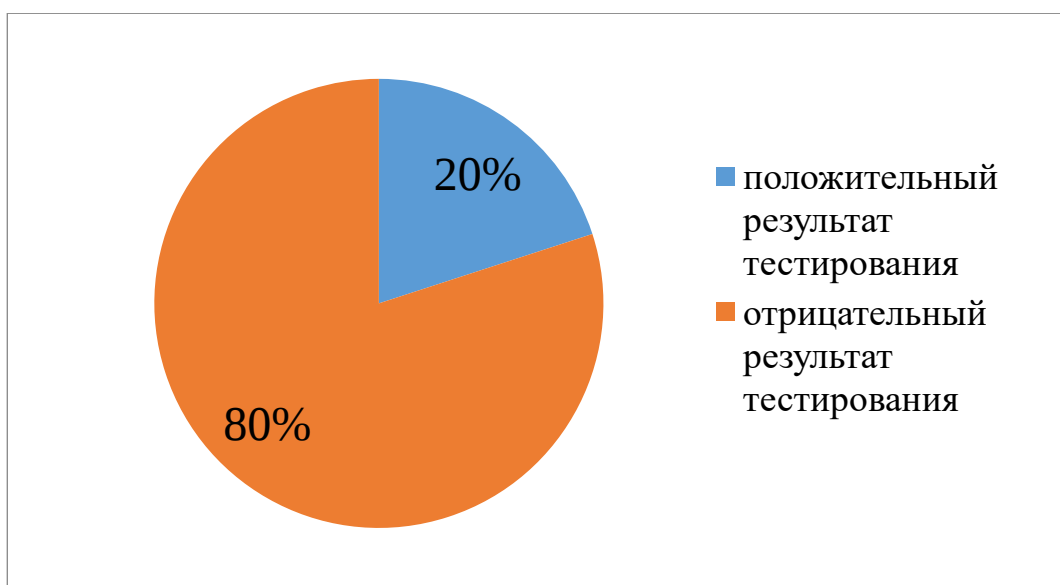


Рис.4. Результаты вводного тестирования

Перед началом практической деятельности была проведена краткая лекционная часть для учащихся, в ходе которой они познакомились с историей развития науки клонального микроразмножения растений, с основными понятиями, этапами МКР и преимуществами данного метода перед другими способами размножения растений.

На следующем занятии учащиеся узнали о том, что существуют различные составы питательных сред для выращивания разных видов растений и значение некоторых компонентов этих сред на рост и развитие растительного материала в ходе культивации. После этого ученики приступили к изготовлению питательной агаризованной среды Мурасиге-Скуга для картофеля.

На дальнейшем этапе учащиеся узнали о правилах работы в ламинар – боксе и приступили к пробным посадкам картофеля в стерильные пробирки со средой МС. Далее для получения результата практической деятельности вместе с учениками ставился опыт *«Влияние различных рН среды на рост и развитие картофеля сорта Невский»*. Учащиеся выделили следующую цель и задачи:

Цель: изучение влияния различной рН среды на рост растений при микроклональном размножении, на примере картофеля сорта «Невский».

Задачи:

- 1) Собрать информацию о микроклональном размножении и исследуемых материалах;
- 2) Приготовить питательные среды (среда Мурасиге-Скуга) со значениями рН среды: 5; 5,8; 6,5; 7,3; 8 и рассадить в них картофель сорта «Невский»;
- 3) Провести культивацию и контроль роста эксплантов в светоустановке в течение 3 недель;
- 4) Взвесить сырые и сухие растения. Составить статистику.

Гипотеза: в основе рабочей гипотезы лежит предположение о том, что повышение либо понижение рН среды от среднего значения влияет на рост растения. Предполагали, что лучше картофель растет при нейтральной среде ($pH = 6 - 6,5$).

В ходе приготовления среды рН выводились с помощью растворов гидроксида калия КОН и соляной кислоты HCl. Значения рН отслеживались, используя рН метр и датчик температурный. Использование двух датчиков сразу обусловлено тем, что значение рН может варьироваться при разных температурах раствора.

Оценка результатов исследования проводилась после трех недель культивации. Данные по взвешиванию сухой и сырой массы подвергались статистической обработке.

По итогам проведенного исследования были сделаны следующие выводы:

- Самое большое значение средней массы было отмечено при рН среды = 7,3, при этом наибольшая масса сухого остатка была отмечена при рН = 6,5. Следовательно, наибольший прирост массы растения наблюдается при рН = 7,3.
- Следует отметить, что при высоких значениях рН (7,5 и 8,0) наблюдался большой процент брака (нежизнеспособных регенерантов), что может говорить о том, что данные значения рН, которые соответствуют щелочной среде, не подходят для выращивания картофеля.
- Наибольшая массовая доля воды содержалась в растениях, выращенных на щелочной среде (98 %) при рН = 7,3 в сравнении с остальными, где массовая доля воды составляет около 91 %, следовательно, при высоких значениях рН растения вырастают с более высоким содержанием воды и с меньшей массовой долей сухой биомассы.
- Установлено, что оптимальное значение рН среды для выращивания сорта картофель «Невский» находится в нейтральных пределах и составляет 6,5.

По завершению занятий ученики прошли итоговое тестирование (Приложение 2), которое в этот раз показало хорошие результаты, представленные на рисунке 5, и написали микроисследования, одно из которых заняло 3 место в XVIII общешкольном конкурсе учебно-исследовательских работ учащихся (Приложение 3).

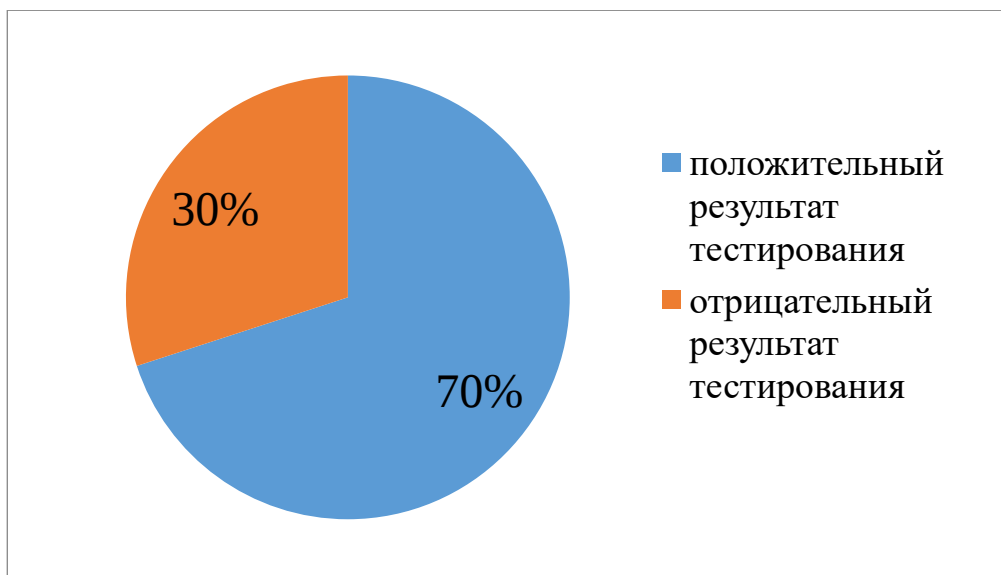


Рис.5. Результаты итогового тестирования

Результаты исследований проведенных с учащимися на базе ПГГПУ могут быть использованы учителями школ в школьной программе в виде факультативного курса по биологии: «Клональное микроразмножение растений».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате работ по введению в культуру и клональному микроразмножению бегоний можно сформулировать ряд выводов:

1) Подробный анализ источников показал, что методика МКР популярна и применима, в том числе для растений, которые плохо поддаются размножению другими способами. Изучение ботанической характеристики рода *Begonia*, анализ полученных в ходе исследований данных, показали, что растения, принадлежащие этому роду, являются перспективным биологическим объектом для введения в культуру *in vitro* и применения технологии МКР.

2) В процессе исследований по теме работы был освоен метод клонального микроразмножения растений *in vitro*, способом микрочеренкования на сем. Паслёновых (*Solanaceae*). Создан и опробован модифицированный метод на сем. Бегониевые (*Begonaceae*), а также подобран состав питательной среды с содержанием фитогормонов ауксинового и цитокининового ряда, с целью стимуляции роста побегов и корней.

3) Выбраковка посадок по нарушению асептики и нежизнеспособности эксплантов или регенерантов на данном этапе работы значительно уменьшена, за счёт применения нового режима стерилизации. Если на первоначальных этапах получали от 17,2% до 33,3% выбраковки по нарушению асептики и от 76,5% до 78,6% по нежизнеспособности, то после оптимизации режима стерилизации количество брака уменьшилось до 11,6% и 43,5% соответственно.

4) Успешно апробирован состав среды для индуцирования каллуса (МС+ 0,2 мг БАП + 1мг 2,4Д) и применена на практике методика стимуляции каллусообразования у листовых эксплантов. Добавление антибиотика цефазолина положительно сказалось на каллусной культуре. Выход составил 36,7% стерильных, 56,7% жизнеспособных.

5) Результаты исследовательской деятельности были использованы в ходе практических занятий с учащимися школ для написания микроисследования по теме: «*Влияние различных pH среды на рост и развитие растений*» и последующего участия в конференции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Баранова О.Г и др Основы микроразмножения редких растений: учеб.-метод. пособие / Ижевск: Удмуртский университет, 2009. 64 с.
2. Батыгина Т. Б. Размножение растений / Батыгина Т. Б., Васильева В. Е. – СПб.: С.-Петербург. ун-т, 2002. – 232 с.
3. Бублик О.М., Андреев Е.В., Спиридонова Е.В., Можилевская В.А., Питательные среды для культивирования *in vitro* тканей *ungernia victoris* // Ж-л «Биотехнологія» Т.4, №6, 2011 С. 68-73.
4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе, 1999, М, ФБК-ПРЕСС, 160 с.
5. Вечернина Н.А, Таварткиладзе О.К, Бородулина И.Д, Адаптация растений-регенерантов с использованием гидропоники / А.А. Эрст // Известия АлтГУ. – 2008. – №3 (55). – С. 7–10.
6. Вечернина Н.А, Носырева М.В, Таварткиладзе О.К Регенерация и размножение бегоний *in vitro*// Известия АлтГУ. – 2008. – №3 (57)
7. Виноградова Ю.К., Горбунов Ю.Н., Макридин А.И. и др. Разработка принципов сохранения и воспроизводства генетических фиторесурсов // Фундаментальные основы управления биологическими ресурсами. М., 2005. С. 343—351.
8. Висящева Л.В., Соколова Т.А. Промышленное цветоводство. М.: Агропромиздат, 1991. 386 с
9. Гиголашвили Т.С., Родькин О.Н., Реуцкий В.Г. Условия микроклонирования формируют специфический культуральный фенотип // VII Междунар. Конф. «Биология технология и сохранение генофонда»: Тез. докл. – М., 1997. – С. 413.
10. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений. Курс лекций. М., 2007.
11. Калинин Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. – К.: Наук. думка, 1980.488 с.

12. Катаева Н. В., Бутенко Р. О. Клональное микроразмножение растений//Селекция. -1983
13. Квеситадзе Г.И., Безбородов А.М. Введение в биотехнологию. – М: Наука, 2002. – 283 с.
14. Козицкий Ю.Н., Борукаева М.Ф., Смирнова Н.С. Регуляторы роста и микроразмножение цветочных культур // Цветоводство. 1980. № 2. С. 13–15.
15. Комарова Г.В Бегония — М. — Донецк: АСТ — Сталкер, 2006
16. Кузьмина Н.А. Основы биотехнологии: [Электронный ресурс].2005-2010. URL: <http://www.biotechnolog.ru>. (Дата обращения: 23.05.2018).
17. Куликов П.В., Филиппов Е.Г. О методах размножения орхидных умеренной зоны в культуре *in vitro* // Бюл. Главного ботан. сада. М.: Наука, 1998 С. 125-131.
18. Кунах, В.А. Изменчивость растительного генома в процессе дедифференцировки и каллусообразования *in vitro* // Физиология растений. — М.: Наука, 1999. — No 6. — С. 919-929.
19. Леонова Н.В. Оптимизация состава питательной среды при размножении земляники садовой *in vitro* // Вестник Брянской ГСХА. 2013 №1. С.45-48.
20. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. – СПб.: Изд-во С.Петербург. ун-та, 2010. – 240 с.
21. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского Ботанического сада // Вестник ВОГиС. – 2008. – Том 12, No 4. – С. 564-572.
22. Орлова И.Г. Основные пути воспроизводства культурной и дикорастущей флоры. – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2003. – 142 с.
23. Индукция морфогенеза и тканевая селекция плодовых и ягодных культур / Под ред. В. Е. Перфильева: Методические рекомендации / ВНИИ генетики и селекции плодовых растений им. И. В. Мичурина, 1996. С. 73.

24. Полевой В.В. Фитогормоны. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – 249с.
25. Попович Е.А. Влияние экзогенного цитокинина на жизнеспособность эксплантов голубики высокой Физиол. растений. – 1997. – Т. 44, No1.
26. Родин А.Р., Калашникова Е.А. Использование методов клеточной и генной инженерии для получения посадочного материала древесных пород. – М.: МГУЛ, 1993. – 90 с.
27. Степанюк, Г. Я. Размножение тропических и субтропических растений *in vitro* в Сибирском ботаническом саду [Текст] / Г. Я. Степанюк // Проблемы интродукции растений и отдаленной гибридизации. – М., 1998. – С. 196–197
28. Строева Н.С, Дарханова В.Г., Получение растений – регенерантов *Medicago varia* индукцией каллусобразования листовых эксплантов в культуре *in vitro* // Наука и образование г. Якутск, 2017, №1. С.110-113.
29. Тимофеева О.А, Невмержицкая Ю.Ю Клональное микроразмножение растений: Учебно-методическое пособие / – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.
30. Тихонова В.Л. Сохранение генофонда дикорастущих растений в банках семян // Семя : тез. междунар. науч.-практ. конф. 14—16 дек. М., 1999. С. 111—113.
31. Толмачева И., Анненков Б. Управление качеством продовольственных товаров при использовании современных биотехнологий // Вестник ХГАЭП. — 2008. — No6.
32. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* – Киев: Наукова думка, 2008. – 559 с.
33. Шахова Г.И Бегонии: Кладезь-Букс, 2005. – 96с.

34. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Воронин Е.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология – М.: Высш. шк., 2008. –710 с.
35. Шестибратов К.А., Лебедев В.Г., Мирошников А.И. Лесная биотехнология: методы, технологии и перспективы // Биотехнология. – 2008. – No 5. – С. 3–22.
36. Юсуфов А.Г. Культура изолированных листьев. – М.: Наука, 1988. – 103 с.
37. Lamberova M.E., Khmeleva A.N., Emelianova I.S., Lamberova A.A., Kosolapova A.S. Researching of Ultrasonic Influence to Sterilization and Plants Cells Growth of Culture *in vitro* // International Workshops and Tutorials on Electron Deviced and Materialis EDM 2006; Workshops Proceeding, Novosibirsk, 2006.
38. Marriott, P., Sarasan, V. Novel micropropagation and weaning methods for the integrated conservation of a critically endangered tree species, *Medusagyne oppositifolia*. *in vitro* Cell Dev Biol-Plant, — 2010. No46. — P. 516-523.
39. Roule D. Why does the UK lag on Rieger begonias. *Grower*, 1983. Vol. 99. №13.
40. <http://www.onlineocr.ru/default.aspx>
41. <http://открытыйурок.рф/статьи/651375/>
42. <http://www.gorodperm.ru/special/news/2011/06/29/14774-id/>
43. <http://asprus.ru/blog/page/3/?s=выращивание%20косточковых%20>
44. <http://vinograd.info/stati/stati/rol-svetovogo-faktora-pri-kultivirovanii-vinograda-in-vitro.html>
45. <http://www.prosadguru.ru/cvety-4/komnatnye-cvety-i-rasteniya-9/8012-semejstvo-begoniemyh.html>
46. <https://www.botanichka.ru/article/begonia/>
47. <http://www.findpatent.ru/patent/206/2063682.html>
48. <http://poznayka.org/s32809t1.html>
49. <http://biofile.ru/bio/21909.html>

50.<http://asprus.ru/blog/met/mikroklonalnoe-razmnozhenie/>

51.<http://ib.komisc.ru/add/old/t/ru/ir/vt/02-56/06.html>

Вариации питательных сред для МКР

Среда Уайта, pH 5,6-5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	200	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,02
MgSO_4	360	ZnSO_4	1,5
Na_2SO_4	200	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0025
KNO_3	80	KI	0,75
KCl	65	Пиридоксин-HCl	0,1
NaH_2PO_4	16,5	Тиамин-HCl	0,1
H_3BO_3	1,5	Никотиновая кислота	0,5
MnSO_4	4,5	Глицин	3,0
$\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$	2,5	Сахароза	20.000

Среда Гамборга (В-5), pH 5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150	ЭДТА- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
KNO_3	2500	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134	KI	0,75
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	28,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150	Тиамин- HCl	10,0
H_3BO_3	3,0	Пиридоксин- HCl	1,0
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,60	Никотиновая кислота	1,0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	Мезо - инозит	100
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	2,4-Д	2,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,0	Сахароза	20.000

Вводное (итоговое) тестирование по теме «Основы микрклонального
размножения растений»

1) Первые достижения в области клонального микроразмножения были получены в конце 50-х годов XX столетия. Назовите учёного:

- | | |
|----------------|--------------------|
| А. Жорж Кювье, | В. Жорж Морель, |
| Б. Луи Пастер, | Г. Эрнест Геккель. |

2) В России первые работы по клональному микроразмножению были проведены в:

- | | |
|------------------------|---------------------------|
| А. 60-х годах XX века, | В. 30-х годах XIX века, |
| Б. 90-х годах XX века, | Г. 40-х годах XVIII века. |

3) К какому типу размножения относят клональное микроразмножение растений. Выберите соответствующий вариант ответа:

- | | |
|--------------|---------------------------------|
| А. Половое, | В. Половое и бесполое, |
| Б. Бесполое, | Г. Нет верного варианта ответа. |

4) Установите последовательность этапов клонального микроразмножения растений:

- А. собственно микроразмножение, когда происходит получение максимального количества клонов;
- Б. укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям;
- В. выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадки в поле;
- Г. выбор растения – донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры клеток и тканей;

5) Выделите верные утверждения:

- А. Средние коэффициенты размножения;

- Б. Оздоровление растений от вирусов, бактерий и грибов;
- В. Получение генетически разнородного материала;
- Г. Экономия территорий для выращивания;
- Д. Высокие коэффициенты размножения;
- Е. Ограниченный по времени селекционный процесс;
- Ж. Большая выбраковка материала;
- З. Получение генетически однородного материала;

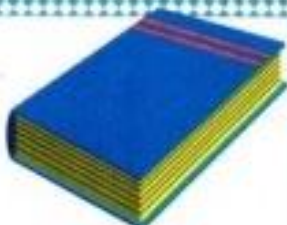
6) Какие части растения используются при микроклональном размножении растений:

- | | |
|--------------|---------------------|
| А. Корень, | Г. Побег с почками, |
| Б. Лист, | Д. Тычинки, |
| В. Лепестки, | Е. Семена, |

7) Как называется универсальная среда на которой обычно осуществляют микроклональное размножение растений:

- | | |
|------------|----------------------|
| А. Кнопша, | В. Мурасиге – Скуга, |
| Б. Нича | Г. Кнудсона, |

Сертификат участника научной конференции



МАОУ «ЛИЦЕЙ № 9»
Школьная Академия Наук «Созвездие»

СЕРТИФИКАТ

Настоящим удостоверяется, что

Гуркумов Исмаил
(фамилия, имя ученика)

ученик (ца) 10.А класса принял (а) участие в
XVIII общешкольном конкурсе учебно-исследовательских
работ учащихся.

отмечен жюри конкурса.

Директор
МАОУ «Лицей № 9»  Н.Е.Зверева

