

МИНИСТЕРСТВО ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН
ГБПОУ «УФИМСКИЙ ЛЕСОТЕХНИЧЕСКИЙ ТЕХНИКУМ»

Научно-практическая работа
на тему: «Особенности культивирования *in vitro*
хвойных пород»

Автор: Каскинова Айгуль Иршатовна
студент 3 курса
специальности «Лесное и лесопарковое
хозяйство»
ГБПОУ «Уфимский лесотехнический
техникум»

Уфа – 2018

Содержание

Введение	3
1 Краткая характеристика Республики Башкортостан	5
1.1 Географическое положение	5
1.2 Климатические условия	5
1.3 Почвенные условия	5
1.4 Лесорастительные условия	8
2 Литературный обзор	10
2.1 Особенности культивирования <i>in vitro</i> хвойных пород	10
3 Практическая часть	13
Заключение	18
Список использованной литературы	19

Введение

Велико значение леса в природе. Общая площадь земель лесного фонда республики Башкортостан составляет более 63 тысяч квадратных километров.

По занимаемой площади преобладающие лесные породы распределены примерно следующим образом — береза (24,9 %), липа (19,1 %), осина и другие тополя (13,7 %), сосна (13,6 %), дуб (4,8 %), ель и пихта (5,5 %), клен (2,8 %), ольха (4,1 %), ильмовые (0,8 %), лиственница (0,8%). Состав насаждений сложный, иногда состоит из пяти-семи пород. По возрастному составу наблюдается тенденция к старению лесов: молодняки занимают почти 18% лесопокрытой площади, средневозрастные составляют 27 процентов, приспевающие – 15 процентов, спелые и перестойные – 40 процентов.

Раньше леса занимали 70 процентов площади республики, причем в их составе преобладали хвойные и ценные твердолиственные породы, но в последние два столетия, площадь лесов в целом по Республики Башкортостан сократилась более чем наполовину. Основными факторами, оказывающими негативное воздействие на состояние лесов, являются рубка, выпас скота, промышленное и сельскохозяйственное загрязнение, а также распространение вредных организмов.

Хвойные породы обладают рядом свойств, определяющих их значимость в лесном хозяйстве (качественная древесина) и декоративность (декоративные формы кроны). Хвойные деревья выполняют фитосанитарную функцию, очищают воздух от загрязнений и пыли. Потребности народного хозяйства в лесопользовании постоянно возрастает. Удовлетворение их требует увеличения объемов лесоматериалов, сокращения сроков лесовосстановления, повышения продуктивности и устойчивости, улучшения качественного состава лесов. Традиционные методы восстановления лесных массивов недостаточно эффективны, так как требуют значительных затрат времени.

Клональное микроразмножение, является одним из перспективно развивающихся направлений науки XXI столетия. Этот метод имеет некоторые

преимущества перед традиционными способами вегетативного размножения.

такие как: – улучшение качества посадочного материала:

- повышение генетической однородности, повышение урожайности;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры, а также от бактериальных, грибных болезней и вредителей;
- получение в сжатые сроки достаточного количества посадочного материала;
- возможность работы в лабораториях круглый год и планирования выпуска растений к определённому сроку, длительного хранения растений без контакта с внешней средой, обмена материалом в международном масштабе без риска занести карантинные объекты.

Целью данной работы является подбор эффективных методов стерилизации вводимых в культуру эксплантов, а также питательных сред для введения в культуру хвойных пород. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- разработать наиболее эффективный метод стерилизации эксплантов вводимых в культуру *in vitro*;
- подобрать и оптимизировать состав питательных сред, обеспечивающий наилучший рост и развитие эксплантов.

Все работы проводились на базе Башкирского государственного университета, в лаборатории репродуктивной биологии и клонирования растений. Выражаем глубокую благодарность и признательность за неоценимую помощь заведующей лабораторией д.б.н профессору М.М. Ишмуратовой.

1 Краткая характеристика Республики Башкортостан

1.1 Географическое положение

Республика Башкортостан расположена на склонах Южного Урала, в Предуралье и в Зауралье. Высшая точка на территории республики – гора Ямантау (1640 метров). Протяжённость Башкортостана с севера на юг – 550 км, с запада на восток – 430 км.

1.2 Климатические условия

Климат континентальный. Среднегодовая температура: +0,3 °С в горах и +2,8 °С на равнине. Средняя температура января: –18 °С, июля: +18 °С.

Средний абсолютный минимум температуры воздуха составляет –41 °С, абсолютный максимум: +42 °С. Устойчивый переход температуры воздуха через 0° происходит 4—9 апреля весной и 24—29 октября осенью, в горных районах соответственно 10—11 апреля и 17—21 октября. Число дней с положительной температурой воздуха 200—205, в горах 188—193. Средняя дата последнего заморозка 21—30 мая, самая поздняя 6—9 июня, а в северных и горных районах 25—30 июня. Средняя дата первого заморозка 10—19 сентября, самая ранняя 10—18 августа.

1.3 Почвенные условия

Республика Башкортостан располагает огромными земельными ресурсами. По размерам территории и площади сельхозугодий на душу населения он занимает одно из первых мест среди областей, краев России. Его территория составляет 14,3 млн. га. Основной удельный вес на территории республики занимают земли сельскохозяйственного назначения. На их долю приходится 7 млн. 287 тыс. га, или 57,9% всей территории. Леса занимают 6,1

млн. га — 38%. Площадь лесов в республике за 100 лет сократилась с 68% до 38%. Площади пашни расширились в 2,5 раза. Почвенный покров республики очень разнообразен и включает в себя более 60 наименований. Характерной особенностью преобладающих почв является относительно высокая гумусированность, карбонатность и маломощность гумусового горизонта. Большое разнообразие почв республики объясняется тем, что здесь очень расчлененный рельеф, большое разнообразие форм рельефа, климата и различная хозяйственная освоенность. Хорошо выражена высотная дифференциация типов и подтипов почв. По возвышенностям и хребтам более северные растительные группировки и свойственные им почвы проникают далеко на юг, где они мозаично сочетаются с более южными растительными группировками и почвенными образованиями. В западном (равнинном) Башкортостане представлены три крупные почвенные группы: подзолистая, серая и черноземная. Подзолистая почва заходит в пределы северной части западного Башкортостана южной подзоной дерново-подзолистых почв (Аскинский, Татышлинский, Балтачевский, Калтасинский, Янаульский, Караидельский, Нуримановский, Мишкинский, Бирский районы). Дерново-подзолистые почвы представлены тремя видами: сильно, средне и слабо подзолистыми. Преобладают последние два, сильно подзолистые встречаются только в Аскинском и частично Янаульском районах. На террасах рек Белой, Уфы, Демы почвы супесчаные и песчаные; в других местах они тяжело суглинистые и глинистые. Дерново-подзолистые почвмалогумусные (3 - 4%), имеют маломощный перегнойный горизонт (10 - 15 см). Среди них заметную роль играют светло-серые лесные почвы, которые по своим свойствам приближаются к дерново-подзолистым. Эти почвы для повышения их плодородия нуждаются в известковании, внесении повышенных доз минеральных и органических удобрений. На Уфимском плато наряду с указанными почвами распространены дерново-перегнойно-карбонатные. Они отличаются высоким содержанием гумуса (6 - 8%), слабокислой реакцией (РН 5,5), но содержат мало подвижного фосфора, маломощные и легко подвержены

эрозии. Серые и темно-серые лесные почвы с включением пятен оподзоленных черноземов развиты в западных и северо-западных районах республики (Бураевский, Дюртюлинский, Бакалинский, Шаранокий, Чекмагушевский). Оподзоленные черноземы приурочены к нижним частям пологих склонов междуречий и речным террасам. Эти почвы отличаются от подзолистых значительным содержанием гумуса (6 - 11%), меньшей кислотностью (РН до 6). Лучшие показатели характерны для темно-серых лесных и оподзоленных черноземов (Бирский, Мишкинский, Иглинский районы). В юго-западных, западных районах республики доминируют выщелоченные, типичные и карбонатные черноземы. Они обладают высоким плодородием, имеют достаточно мощный гумусовый слой (до 50 см), содержат много гумуса (8 - 10%), с нейтральной реакцией (РН 6,2 - 6,8). Но они получают недостаточное увлажнение, что сдерживает микробиологические процессы и не способствует

Для горной, горнолесной зоны характерны скелетные, дерново-лесные и дерново-подзолистые почвы, развитые в наиболее возвышенной (центральной) части района гор Ирмеля, Уралтау под елово-пихтовыми и сосновыми лесами. А на вершинах хребтов развиты горно-луговые, типичные и торфяные почвы, выше 1200 м — горно-тундровые (Белорецкий, Бурзянский районы). К западу, югу, востоку от центральных районов идет снижение высот рельефа, климат становится теплее. В этой связи получают развитие широколиственные, мелколиственные и - березовые леса, иногда с пышным травостоем, в почвенном покрове которых доминируют серые и темно-серые почвы.

На востоке Республики Башкортостан почвы весьма разнообразны. Среди них много маломощных черноземных, которые отличаются меньшим гумусовым слоем (менее 40 см), но также обладают высоким плодородием (Учалинский, Абзелиловский, Баймакский, Хайбуллинский районы). Для южной части Зауралья характерны обыкновенные и южные черноземы.

1.4 Лесорастительные условия

Растительность Башкортостана состоит из: 1) естественной травянистой растительности - площадью 2,2 млн. и 2) древесной -- 6,3 млн. га.

Естественная травянистая растительность занимает 16% территории республики. Основная часть этой площади падает на горные каменистые варианты степей, далее следуют равнинные степи и луга, низинные травянистые болота, фрагменты горных тундр и болот, которые встречаются по вершинам отдельных гор Южного Урала.

Леса Башкортостана образованы 20 видами деревьев.

Мелколиственные леса слагаются березой, осиной, ольхой, ивняком. Среди них наибольшую долю по площади имеют береза и осина, которые произрастают в Башкортостане повсеместно. Благодаря - значительной морозоустойчивости, меньшей требовательности к почве по скорости роста - береза завоевывает пространства за счет хвойных и широколиственных пород.

Леса, общая площадь их в республике - 6270,9 тыс. га, что составляет 38% всей территории. Однако распределены леса очень неравномерно. Если в горах Башкирского Урала лесистость в отдельных местах достигает 90, и более, то в районах степного и лесостепного Предуралья и Зауралья она резко снижается и здесь в ряде случаев наблюдаются практически безлесные территории.

Леса разнообразны по своему составу: хвойные (ель, пихта, сосна, лиственница); широколиственные (липа, дуб, клен, ильм, вяз); мелколиственные (береза, осина, ольха, ивняки). 79,6% лесопокрытой площади приходится на лиственные породы, 20,4% - хвойные. Мягколиственные леса рассеяны по всему Башкортостану.

Третью часть всех лесов составляют широколиственные. Многие ученые полагают, что леса Южного Урала являются третичными, неогеновыми. И. М. Крашенинников (1939) считает, что эти леса в плейстоцене были оттеснены и могли вновь занять территорию в межледниковый период. Современные широколиственные леса Южного Урала и Предуралья образуются следующими древесными породами: липой мелколистной, дубом черешчатым, кленом

остролистным, ильмом шершавым и вязом гладким. Наибольшие площади в республике занимают липовые леса, исключительно ценные медоносные. Следует отметить, что в Башкортостане сосредоточена треть площадей липовых лесов России.

Хвойные леса Башкортостана образованы из светлохвойных (сосна, лиственница) и темнохвойных (пихта, ель) деревьев. Сосновые леса благодаря малой требовательности к теплу, к влаге, почвам, исключительной пластичности корневой системы занимают территории с весьма широкой амплитудой условий внешней среды от болот до лесостепи.

Уничтожение лесов, особенно хвойных, интенсивно проводившееся в последние два столетия, привело к тому, что площадь лесов в целом по Башкортостану сократилась более чем наполовину -- это в первую очередь - в Предуралье, где в иных местах хвойные леса были сведены полностью и заменены вторичными, менее ценными осиново-березовыми или широколиственными [10].

2 Литературный обзор

2.1 Особенности культивирования *in vitro* хвойных пород

Размножение – свойство всех живых организмов воспроизводить себе подобных, обеспечивая тем самым непрерывность и преемственность жизни. Выделяют три основные формы размножения растений: бесполое (спорами), половое и вегетативное.

При половом размножении вследствие комбинативной изменчивости генотипы новых растений, возникающих в результате слияния родительских половых клеток (гамет), отличаются не только от генотипа родителей, но и между собой.

При вегетативном размножении новые организмы возникают путем регенерации (восстановления) целого растения из его отдельных частей (чешуй луковиц, стеблевых черенков и т.п.). В отличие от полового, при вегетативном размножении уникальные характеристики отдельного растения сохраняются. Каждое новое растение, полученное вегетативным размножением, может считаться продолжением одной особи. Несколько таких организмов образуют клон – совокупность растений, произошедших от одного общего предка путем бесполого (вегетативного) размножения.

Традиционные методы размножения растений (семенами, черенками, отводками, прививками и др.) человечество практиковало и совершенствовало учение многих столетий. Однако до сих пор размножение многих хозяйственно-ценных или декоративных видов растений затруднено. Достижения биологии в области культивирования изолированных клеток, тканей и органов клеток и тканей привели к созданию нового метода вегетативного размножения – клонального микроразмножения, которое может быть реальной, а в ряде случаев единственной альтернативой традиционным методам размножения [4].

Размножение *in vitro* определяют термином «микроразмножение», поскольку в отличие от традиционных «макрометодов», оперирующих с достаточно крупными частями растений, в культуре *in vitro* размеры растительного материала невелики и варьируют от 0.2 – 0.5 до 2.0 – 5.0 см.

Процесс микроразмножения в культуре *in vitro*, как правило, включает следующие этапы:

- сбор эксплантов, их стерилизация, подбор и оптимизация состава питательной среды, обеспечивающей наилучший рост и развитие эксплантов;
- собственно микроразмножение – мультипликация (увеличение количества) побегов на среде для размножения;
- укоренение микропобегов в стерильных условиях;
- перенос растений-регенерантов в условия *in vivo*.

Успешность клонального микроразмножения определяется сочетанием многих факторов: генотипом исходного объекта, эпигенетическим и физиологическим состоянием экспланта, минеральным составом питательной среды, органическими добавками, в особенности, фитогормонами, и условиями культивирования. Накопленный к настоящему времени опыт размножения растений в культуре *in vitro* свидетельствует о невозможности создания единой универсальной технологии клонирования. В каждом конкретном случае для обеспечения эффективности размножения необходимо эмпирически подбирать основные факторы культивирования.

Л. Луквилл считает, что растения, отличающиеся слабым ростом впервые годы своей жизни, а также высокой зимостойкостью, засухоустойчивостью и требовательностью к освещению являются трудноукореняемыми породами. По данным же Х. Рауланда их черенки образуют корни только после соответствующей обработки; в редких случаях корни образуются без воздействия регуляторами роста. Хвойные растения традиционно считаются «трудными» для культивирования в асептической культуре, однако большой интерес к этой группе растений связан с их высокой фитонцидной активностью и способностью к очищению среды обитания на протяжении всего года. Это

сохраняет актуальность проблемы клонального микроразмножения этих ценных пород [3].

Современное состояние исследований культуры клеток и тканей растений *in vitro*. Большие успехи в биологии растений достигнуты методами культуры клеток и тканей. Во многих работах отечественных и зарубежных учёных (Уайт, 1949; Бутенко, 1964; Глеба, Сытник, 1984; Pierik, 1987; Болвелл, Вуд и др., 1989) подробно описана история развития исследований по культуре клеток и тканей. Этими же авторами обсуждены проблемы культивирования клеток и тканей различных растений *in vitro*, что зависит от ряда факторов. Это, в первую очередь, реакция генотипа, возраст, физиологическое состояние и условия выращивания материнского растения, возраст органа или ткани, сезон года, расположение экспланта на растении, размер экспланта, режим выращивания и т.п.

По данным Р.Г. Бутенко, практически любую часть растения можно успешно культивировать *in vitro* и получить регенераты, если эксплант отобран на соответствующей стадии развития. Незрелые ткани и органы всегда более пластичны с точки зрения способности к морфогенезу *in vitro*, чем зрелые ткани и органы. Более того, при выборе материала следует отдавать предпочтение меристематически активным тканям и органам, поскольку они удобнее при клонировании, легче выживают в культуре, обладают большой скоростью роста и тотипотентностью. Выбор экспланта зависит от вида используемого растения. Немаловажное значение могут иметь сезон года, фазы развития родительского растения при определении реакции экспланта, что в свою очередь зависит от того, из какого органа растений эксплант вычленен [2].

3 Практическая часть

Велико значение леса в природе. Хвойные являются основными из главных лесообразующих пород Евразии и Северной Америки. Почти 95 % лесов земного шара в своём составе имеют хвойные породы. Они являются источником кислорода и летучих противомикробных веществ.

В последнее время человек безжалостно уничтожает леса для своих нужд. Леса же восстанавливаются очень медленно. Разрушаются естественные лесные экосистемы, что пагубно сказывается на природе всей планеты. Вне сомнения, лес необходим человеку. В свою очередь, для сохранности леса нужен человек. Поэтому важнейшая задача лесного хозяйства — восстановление хвойных лесов. Традиционные методы восстановления лесных массивов недостаточно эффективны, так как требуют значительных затрат времени. К не традиционному методу восстановления леса можно отнести - клональное микроразмножение, является одним из перспективно развивающихся направлений науки XXI столетия. Для размножения в условиях *in vitro* использовались представители местных хвойных пород.

Исходным материалом для введения в культуру *in vitro* послужили свежесобранные семена некоторых видов семейства *Pinaceae*, *Picea abies* (L), *Pinus sylvestris* (L), *Larix sibirica* (L).



Рисунок 1 - Семена *Picea abies* (L)

Большое значение при введении в культуру ткани имеет эффективность стерилизации. Стерилизацию проводили дробным способом - с применением 70 % этилового спирта и без него.

Очищенные семена промыли в проточной воде, затем залили мыльным раствором и установили на магнитную мешалку - 10 минут.



Рисунок 2- Стерилизация семян *Picea abies*(L)

Обработка «Бриллиантом» (1 мл на 100 мл воды) – 15 минут.

Обработка 0,1 % раствором диоксида – 30 минут.

Обработка хлоргексидином – 15 минут.

Одну партию семян обработали 70 % раствором этилового спирта - 1 минута. Вторая партия семян не подвергалась обработке этиловым спиртом.

После каждого этапа стерилизации экспланты трижды промывали дистиллированной водой, для удаления стерилизующих веществ.

Экспланты культивировали на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга (MS). Питательные среды MS0, MS2+БАП+ИУК, MS3+БАП+НУК+Кинетин подвергались автоклавированию в течении 40 минут.

На 7 – е сутки проводился анализ жизнеспособности и инфицированности эксплантов *Picea abies* (L), *Pinus sylvestris* (L), *Larix sibirica* (L).

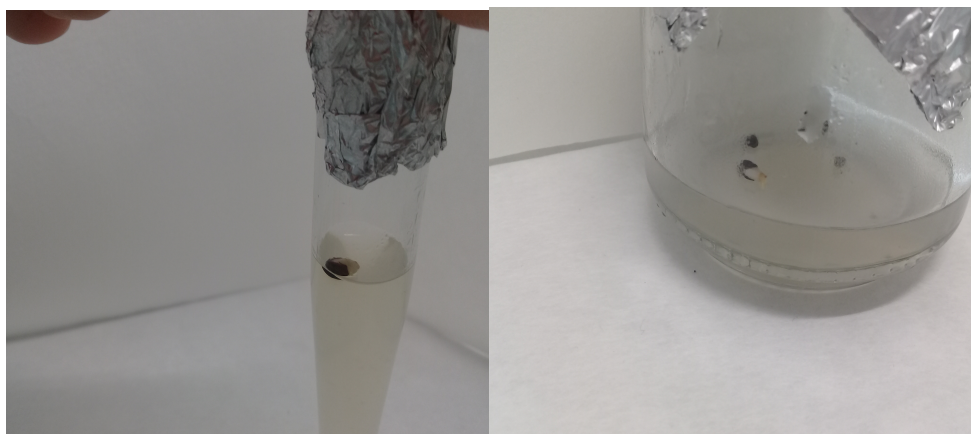


Рисунок 3 –Начало прорастания *Picea abies*

Выход стерильных эксплантов приведен ниже в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты стерилизации эксплантов

Порода	Стерильность эксплантов, %	
	Способ	
	I	II
<i>Picea abies</i>	91	86
<i>Pinus sylvestris</i>	84	79
<i>Larix sibirica</i>	87	83

В результате проведенных исследований был выделен наиболее эффективный способ с 70 % этанолом, выход стерильных растений при указанном способе стерилизации варьировал от 84 % до 91 %, т.е. 70 % этанол обладает хорошим потенциалом для удаления бактериальных загрязнений в процедурах культуры тканей растений.

В последующем стерильные экспланты культивировали на модифицированный питательной среде Мурасиге и Скуга (MS). Для этого был подготовлен ламинар-бокс. При работе в ламинаре стерильность обеспечивается бактерицидной лампой и стерильным потоком воздуха. Перед началом работы рабочую поверхность стола обработали 96°спиртом, после чего включили УФ-излучение на 40 минут, что наглядно видно на рисунке 4.



Рисунок 4 – Подготовка ламинар-бокса

Для работы в ламинар-боксе необходимо надеть лабораторный халат и шапочку, руки обработать 96 % спиртом. После чего приступили к культивированию эксплантов.



Рисунок 5 – Культивирование эксплантов

В ходе исследования была проведена апробация составов питательных сред для введения в культуру некоторых видов семейства *Pinaceae*. Согласно полученным данным приживаемость эксплантов на питательной среде MS2 была более чем в 2 раза выше, чем на остальных вариантах питательных сред.



Рисунок 6- Первые проростки *Picea abies* (L) появились на 21 день

Таблица 2 – Норма расхода компонентов

Компоненты питательной среды	Питательная среда (на 1 л воды)	
	№2	№3
ИУК	0,25	-
БАП	0,5	1,0
НУК	-	0,5
Кинитин	-	1,0

В результате проделанной работе были оптимизированы питательные среды для роста и развития семян хвойных пород в условиях *in vitro*. Было установлено, что является более благоприятные для хвойных пород питательная среда № 2.

Заключение

В результате экспериментальных исследований был подобран способ стерилизации, модифицирована питательная среда и определены эффективные регуляторы роста и их концентрации для некоторых хвойных пород.

Выводы

1. Разработан эффективный метод поэтапной стерилизации семян хвойных пород для их дальнейшего культивирования в условиях *in vitro*/
2. Наиболее эффективный способ с 70 % этанолом, выход стерильных растений при указанном способе стерилизации варьировал от 84 % до 91 %, т.е. 70 % этанол обладает хорошим потенциалом для удаления бактериальных загрязнений в процедурах культуры тканей растений.
3. Установлено, что оптимальной питательной средой для семян хвойных пород является питательная среда №2.

Используя метод микроклонального размножения хвойных пород, можно получить большое количество оздоровленного и выровненного посадочного материала в кратчайшие сроки, что значительно ускорит процесс получения товарной продукции и повысит ее качество.

Список использованной литературы

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Учебное пособие. – М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. – 160 с.
2. Ворошилова Е.В., Третьякова И.Н. Соматический эмбриогенез в культуре мегагаметофитов и зиготических зародышей *Pinus sibirica* // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: материалы X международ. конф., 14-18 октября 2013 г. – Казань. – 2013. – С. 107.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
4. Маркова И.А. Современные проблемы лесовыращивания (Лесокультурное производство): учебное пособие. – СПб.: СПбГЛТА. – 2008. – 152 с.
5. Третьякова И.Н., Белоруссова А.С., Носкова Н.Е. Перспективы применения методов биотехнологии для размножения генетически ценных форм лесных древесных видов // Хвойные бореальной зоны. – 2007, № 2-3. – С. 309-317.
6. Третьякова И.Н., Пак М.Э., Иваницкая А.С. Микрклональное размножение *Larix sibirica* и *Larix sukaczewii* с использованием биотехнологии соматического эмбриогенеза *in vitro* // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири: материалы 4-го международ. совещ., 24-29 августа 2015 г. – Барнаул. – 2015. – С. 175.
7. Технологии микроразмножения *in vitro*: Учеб.-метод. пособие. – Саратов, 2016. – 38 с.
8. Редько, Г. И. Лесные культуры. В 2 ч. Часть 1: учебник для СПО / Г. И. Редько, М. Д. Мерзленко, Н. А. Бабич; отв. ред. Г. И. Редько. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Юрайт, 2018. — 197 с.
9. Редько, Г. И. Лесные культуры. В 2 ч. Часть 2: учебник для СПО / Г. И. Редько, М. Д. Мерзленко, Н. А. Бабич. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2018. — 260 с.

10. Лесохозяйственный регламент Государственного учреждения «Уфимское лесничество» Министерства лесного хозяйства, 2010. - 185 с.