

# **Всероссийский конкурс школьных лесничеств имени Г.Ф. Морозова**

«Конкурс школьных лесничеств»

## **Сохранение исчезающих растений Дагестана путем клонального микроразмножения**

**Автор:**

ученица 10а класса  
ГБОУ РД «Республиканский  
Многопрофильный лицей-интернат  
для одаренных детей », г. Махачкала  
**Салихова Хадиджа Наримановна**

**Научные руководители:**

старший преподаватель кафедры  
физиологии растений и биотехнологии ДГУ  
Мамедова Калимат Кафлановна,  
педагог-организатор  
дирекции «Экостанция» ГАОУ ДО РД  
«Центр развития талантов «Альтаир»  
, к.б.н. Бекшокова Патимат Асадулламагомедовна

<b>Введение</b>	
<b>Глава 1. Литературный обзор</b>	4
1.1. Основные направления клонального размножения	4
1.2 Размножение редких и исчезающих видов растений <i>in vitro</i>	5
<b>Глава 2. Материалы и методы исследования</b>	6
2.1 Лещина древовидная и культивирование ее в питательной среде	6
<b>Глава 3. Результаты исследования</b>	8
3.1. Микрклональное размножение лещины древовидной	8
Заключение	10
Выводы	11
Список литературы	12
Приложение	13-15

## Содержание

**Примечания:**

МС – питательная среда Мурасиге Скуга

ИМК – фитогормон индолилмасляная кислота

БАП – фитогормон 6-бензиламинопурин

**Цель исследования:** разработка научно обоснованной методики микроклонального размножения, направленной на получение высококачественного посадочного материала лещины древовидной (*Corylus colurna* L.).

Для достижения поставленной цели были определены следующие **исследовательские задачи:**

1. Провести анализ научной литературы, релевантной теме исследования, с целью выявления современных достижений и перспективных направлений в области микроклонального размножения древесных растений.
2. Изучить и систематизировать методологические подходы к микроклональному размножению растений, включая теоретические основы и практические аспекты культивирования *in vitro*.
3. Оптимизировать состав питательной среды для микроклонального размножения лещины древовидной, учитывая биологические особенности вида, требования к условиям культивирования и необходимость достижения высокой степени укореняемости эксплантов.

## Введение

### Глава 1. Литературный обзор

#### 1.1 Основные направления клонального размножения

Клональное микроразмножение представляет собой высокотехнологичный метод биотехнологии *in vitro*, направленный на создание и увеличение генетически идентичного потомства. Этот процесс является аналогом естественного вегетативного размножения растений, однако отличается начальной стадией культивирования эксплантов, включающих различные структурные компоненты. В результате применения данной методики из изолированных клеток, тканей и органов формируются многочисленные клоны, что имеет критическое значение при дефиците исходных природных растений [10].

Метод культуры клеток и тканей и эксплантов структур *in vitro* имеет ряд преимуществ перед традиционными способами размножения:

- высокий коэффициент размножения ( $10^5$ - $10^6$  – для травянистых, цветочных растений,  $10^4$ - $10^5$  - для кустарниковых древесных);
- получение генетически однородного посадочного материала и освобождение растений от вирусов, для изучения репродуктивной фазы развития;
- сокращения продолжительности селекционного процесса для поддержания и размножения, полученного редкого и уникального вида;

Вегетативное размножение представляет собой эффективный метод сохранения генетического материала материнского растения, что приводит к сокращению ювенильного периода у потомства. Тем не менее, для большинства видов, особенно древесных, данный способ размножения остается недостаточно разработанным. Это обусловлено рядом ключевых факторов:

1. Не все древесные породы обладают способностью к вегетативному размножению даже на ювенильной стадии.
2. С возрастом, после достижения десяти-пятнадцати лет, многие древесные виды утрачивают способность к успешному черенкованию.
3. Существует риск накопления и передачи инфекционных агентов через вегетативно размноженный материал, что затрудняет получение стандартного посадочного материала.
4. Операции по прививке взрослых древесных растений характеризуются высокой трудоемкостью и сложностью, что ограничивает их практическое применение.

5. Существующие технологии вегетативного размножения не обеспечивают достаточного количества генетически однородного материала в течение годового цикла, что снижает их экономическую эффективность.

Таким образом, несмотря на очевидные преимущества вегетативного размножения, его применение для древесных видов сопряжено с рядом значительных технических и биологических ограничений, требующих дальнейших исследований и разработок.

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в нескольких направлениях. Первое направление связано со способностью изолированных растительных клеток продуцировать ценные вещества при метаболизме.

Второе направление – это использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала. Этот метод, названный клональным микроразмножением растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год.

Третье направление – использование изолированных клеток и тканей в селекции растений, позволяющего ускорить подбор гибридных культур.

На рис. 1. (приложение) представлены основные отрасли народного хозяйства, в которых используются культивируемые клетки растений.

В современной агробиотехнологии наблюдается стремительное развитие клеточных технологий растений, что способствует их ускоренному внедрению в сельскохозяйственное производство [5]. В результате этого феномена во многих странах биоиндустрия микроразмножения растений достигла промышленного уровня и представлена многочисленными активно функционирующими предприятиями.

### **1.2. Размножение редких и исчезающих видов растений *in vitro***

Для сохранения редких исчезающих видов растений используют пассивное сохранение – охраняемые территории, выращивание в ботанических садах и банки семян. К активному сохранению относятся мероприятия по восстановлению нарушенных популяций и созданию популяций взамен исчезнувших.

Культивирование *in vitro*, в особенности клональное микроразмножение, может быть использовано как при пассивном, так и при активном сохранении, его следует считать эффективным и за счет вспомогательных методов: интродукция, размножение, длительное сохранение, укоренение, адаптация и получение растений типа рассады. Использование клонирования для сохранения затрудняется слабой изученностью биологии редких исчезающих видов, включая внутривидовое разнообразие, соматическое варьирование и ряд других [2].

Метод микроразмножения представляет собой высокоэффективный инструмент в контексте культивирования растений, характеризующихся низкой всхожестью семян или повышенной чувствительностью проростков к неблагоприятным условиям окружающей среды. В частности, данный метод демонстрирует свою эффективность при работе с копеечником *Hedysarum theinum*, для которого характерна низкая жизнеспособность семян и проростков [3]. Использование семян позволяет обеспечивать генетическое разнообразие видов и достичь появления соматоклональных вариаций [4].

В рамках современных биотехнологических исследований, направленных на сохранение и воспроизводство редких и ценных видов растений, значительное внимание уделяется методам клонального микроразмножения. В частности, активно изучаются особенности размножения *in vitro* представителей семейства Актинидиевые, которые являются дальневосточными культурами. Эти методы позволяют эффективно сохранять и воспроизводить генетически ценные экземпляры, включая виды берез, тополя и продуктивные гибриды осины. Были разработаны и апробированы инновационные методики клонирования взрослых деревьев, что открывает новые перспективы в области биотехнологии и селекции растений. Эти достижения способствуют устойчивому сохранению редких видов и их генетического разнообразия, обеспечивая долгосрочную стабильность экосистем и биоразнообразия [9]. Введены в культуру ткани растения, имеющие ценное хозяйственное значение. В Дагестане проводились работы по выращиванию безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур на основе методики культуры тканей [7].

В связи с этим большую актуальность приобретает необходимость разработки методов сохранения биологического разнообразия редких и исчезающих видов Дагестана по которым мало данных.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **2.1. Лещина древовидная и культивирование ее в питательной среде**

Лещина древовидная (*Corylus colurna* L.) – единственный древовидный орешник, растущий на Кавказе и в Малой Азии, в широколиственных лесах, достигающий в природе высоты 20 м. В России Лещина древовидная распространена на территории Закавказья и Северо-Западного Кавказа – на склонах Кавказского хребта, в Бежтинской впадине, Цейском ущелье, в Теберде. Высокое, красивое дерево, ствол прямой, с серовато-бурой пробковой корой, достигает в диаметре 30 (реже 90) сантиметров. Древесина Лещины весьма прочная, красивая – светлая, имеет розоватый оттенок, хорошо полируется, в связи с этим имеет большое техническое значение. Плоды лещины – одногнездные, односемянные орехи – съедобны, содержат до 62% жира и очень питательны. Вопрос об охране данного

биологического вида был впервые поднят в Советском Союзе в 1929 году [3, 7]. Вид включен в Красные книги Российской Федерации и Республики Дагестан, а также ряда субъектов Северного Кавказа. Он подлежит охране в заповедниках [7]. Информация о культуре *in vitro*, к сожалению, крайне ограничена и фрагментарна.

В естественной среде обитания лещина (*Corylus avellana*) демонстрирует низкую частоту семенного размножения, что обусловлено длительным периодом жизненного цикла и периодичностью плодоношения, зависящей от множества внешних факторов, включая климатические условия, почвенные характеристики и антропогенные воздействия. Вегетативные методы размножения также сталкиваются с рядом значительных ограничений, что существенно затрудняет их эффективное применение в естественных популяциях данного вида.

В качестве питательной среды использовали составы по прописям Мурасиге-Скуга. Компоненты питательной среды для выращивания растительных клеток и тканей можно разделить на 6 основных групп, что обычно отражает порядок приготовления концентрированных маточных растворов: макроэлементы, микроэлементы, источник железа, витамины, источник углерода, регуляторы роста. Основой всех питательных сред для культивирования растительных эксплантов является смесь минеральных солей и регуляторы роста: 3 – индолилмасляная кислота (ИМК), 6 – бензиламинопури́н (БАП) и т.д. Для получения полутвердой питательной среды применяли агар-агар в концентрации 7-8 г/л [5]. Готовую питательную среду разливали в пенициллиновые флаконы и автоклавировали. Состав питательной среды подробно представлен в табл. 1 (приложение).

Учет результатов экспериментов проводили через 30-40 суток, повторность опытов 2-3 кратная. Показателями состояния эксплантов служили: выживаемость, рост, каллусогенез и морфогенез (% от общего числа эксплантов в варианте). Работа выполнена в лаборатории физиологии и биотехнологии растений имени Юсуфова А.Г. кафедры физиологии растений и биотехнологии биологического факультета Дагестанского государственного университета. Исходным материалом служили коллекционные сборы сотрудников и дипломников биологического факультета ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный университет».

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1. Микрклональное размножение лещины древовидной

У лещины древовидной в качестве первичного посадочного материала на питательную среду использовали пазушные почки и зародыши. Методика культивирования зародышей основана на общепринятых классических приемах работы с культурой изолированных тканей и органов растений *in vitro* [2, 11]. Очищенные от деревянистого околоплодника семена предварительно промывали мыльной водой, затем 3-4 раза стерильной. Стерилизовали семена в 70 % спирте в течение 1-2 минут, после – в 10 % растворе перекиси водорода 15 минут. Почки стерилизовали в гипохлорите натрия в составе белизны, разведенном 1:1 с дистиллированной водой.

В одной серии опытов культивировали зародыши, выделенные из зрелых семян (семенная кожура имеет коричневую окраску), в другой – из незрелых (семенная кожура имеет светло - бежевую окраску), которые делили на семядоли (**рис. 2** приложение) и культивировали отдельно часть с почкой (апикальную части) на среде МС + ИМК +БАП (0.5:2.5 мг/л). Проведено сравнение жизнеспособности зрелых и незрелых семян лещины древовидной на среде МС с добавлением регуляторов роста, что позволило выявить оптимальные сроки изоляции ее семян для введения в культуру *in vitro*.

Зародыши зрелых и незрелых семян лещины древовидной на среде МС с ИМК и БАП (0.5: 2.5 мг/л) на 22 сутки культивирования характеризовались высокой выживаемостью (90 %) без каллусогенеза. Активность процессов роста у зародышей зрелых семян оказалась выше (60%), чем у незрелых (30%). Рост зародышевой почечки, стебелька, корешка с образованием стебля и первых фотосинтезирующих листьев у зародышей незрелых семян лещины древовидной не наблюдалось (**рис. 3**. приложение).

При культивировании изолированных семядолей зрелых семян на среде МС с содержанием БАП (2.5. мг/л) на 40 сутки у 90 % эксплантов на раневой поверхности наблюдали образование каллуса с хлорофилл содержащими участками. На 60 сутки культивирования из семядолей незрелых семян лещины древовидной, культивированных на среде с ИМК и БАП (0.5: 2.5 мг/л) наблюдался рост на 60% и увеличение процента каллусогенеза. Состояние изолированных семядолей представлено на **рис. 4**. (приложение)

При культивировании семядолей у незрелых семян лещины древовидной в варианте с ИМК и БАП (0.5: 2.5 мг/л) отмечено только увеличения их размеров. В последующем данные экспланты поделили на части и культивировали на среде с БАП (2.5 мг/л). На 40 сутки культивирования и в дальнейшем наблюдалось только позеленение и

рост эксплантов. На средах с добавлением только одного из регуляторов роста в разных концентрациях ИМК (0.25 и 1.25 мг/л), БАП (1.25 мг/л) или при их сочетании в разных пропорциях (1.25:0.25 и 0.5:2.5 мг/л) у эксплантов не отмечалась закладка корней (табл. 2 приложение).

### Ресурсное обоснование проекта

Любые новые технологии приобретают актуальность и жизнеспособность только при соответствующем уровне рентабельности. Опираясь на опубликованные данные по организационно-экономическому обоснованию метода микроклонального размножения лесных ягодных растений [12], можно оценить примерную рентабельность внедрения культуры лещины *in vitro* исходя из баланса затрат и доходов.

К статьям затрат на производство саженцев лещины методом микроклонального размножения можно отнести (в % от вложений):

- амортизация оборудования ~ 50%;
- заработная плата ~ 30%;
- транспортные и накладные расходы ~ 14%;
- реактивы ~ 1%;
- оплата потребленной электроэнергии и других коммунальных услуг ~ 5%;
- расходы на приобретение исходного для клонирования материала ~ 0,06%;

К статьям доходов можно отнести:

- продажа саженцев в рамках промышленного разведения лещины;
- продажа саженцев для селекционеров лещины;
- государственная поддержка за счет национального проекта «Технологическое обеспечение продовольственной безопасности»;
- финансирование за счет грантов различных фондов.

Основываясь на преимуществах микроклонального размножения, таких как получение генетически однородного и здорового посадочного материала, всесезонность производства и другие, результаты исследований по культивированию различных пищевых растений демонстрируют, что при условии оптимизации затрат и доходов рентабельность может достигать уровня от 187 до 475 процентов [12].

## Заключение

В связи с достигнутыми результатами оценивалась роль микроклонального размножения в воспроизведении редких, исчезающих и эндемичных растений. Микроклональное размножение при использовании метода культуры *in vitro* не всегда реализуема в широкой практике. Кроме того после дифференциации почек на эксплантах не менее важно получить из них потомство. Это так же требует не меньшей методической работы и дополнительного времени для поиска путей решения данной задачи.

При этом микроклональное размножение оправдано для редких и исчезающих форм при получении оздоровленного от вирусных инфекции потомства, при ограниченности семенной продуктивности и плохой всхожести семян у растений и выведения стерильных гибридных форм. Так же многие редкие растения плохо воспроизводятся в природе семенами или имеют ограниченные тенденции к размножению черенками. Во всех таких случаях микроклональное размножение трудно заменить классическими прививками вегетативного или семенного воспроизведения. Поэтому, разработка методов для микроклонального размножения редких и ценных растительных культур является актуальной задачей и будет оставаться такой.

В свете достигнутых результатов, исследование акцентировало внимание на значимости микроклонального размножения в контексте сохранения редких, исчезающих и эндемичных видов растений. Следует отметить, что данный метод, основанный на культивировании *in vitro*, не всегда применим в широких масштабах. Кроме того, после дифференциации апикальных меристем на эксплантах, не менее важным этапом является получение жизнеспособного потомства, что также требует значительных методических усилий и временных затрат на разработку и оптимизацию соответствующих протоколов.

Тем не менее, микроклональное размножение демонстрирует высокую эффективность при работе с редкими и исчезающими видами, обеспечивая получение потомства, свободного от вирусных инфекций, а также в случаях ограниченной семенной продуктивности и низкой всхожести семян. Этот метод также незаменим для размножения стерильных гибридных форм и видов с низкой способностью к вегетативному размножению или семенному воспроизводству в естественных условиях. Во всех этих аспектах, микроклональное размножение представляет собой уникальный инструмент, который трудно заменить традиционными методами прививок или семенного разведения.

Таким образом, разработка и совершенствование методов микроклонального размножения для редких и ценных растительных культур представляют собой актуальную и стратегически важную задачу, которая будет сохранять свою значимость в будущем.

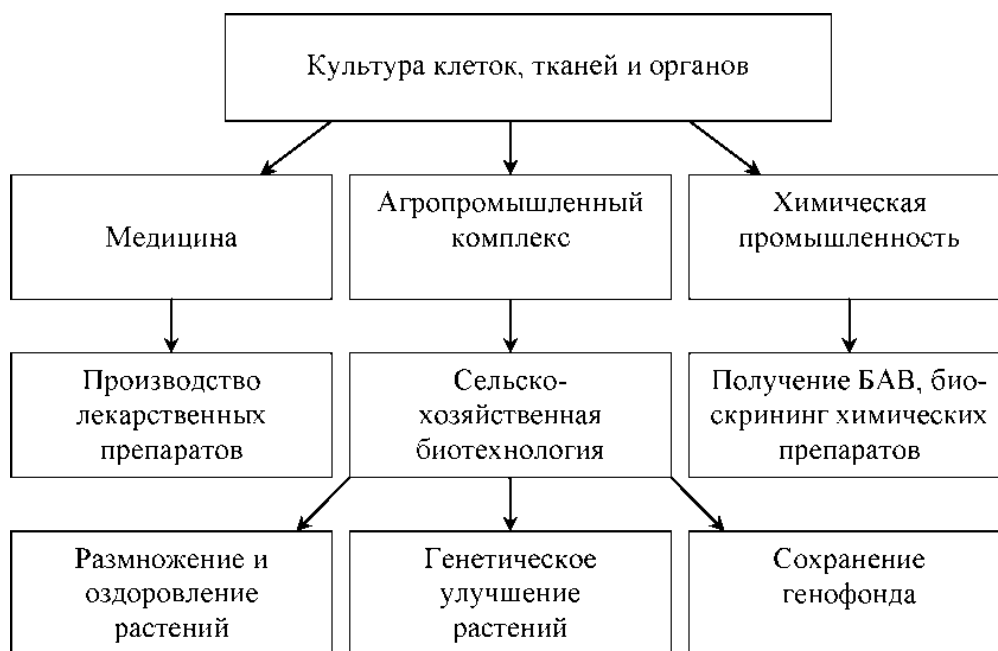
### **Выводы:**

1. Проведен всесторонний литературный обзор информации, касающейся исследуемой темы, на основе анализа данных из открытых источников.
2. В процессе микроклонального размножения орехового лещины древовидной (*Corylus colurna* L.) применялась среда Мурасиге-Скуга (MS), где ключевыми элементами для стимуляции роста и развития являются фитогормоны индолилмасляная кислота (ИМК) и 6-бензиламинопурин (БАП).
3. наиболее оптимальной средой для инициации прорастания семян *Corylus colurna* L. является питательный субстрат MS, обогащенный индолилмасляной кислотой (ИМК) и 6-бензиламинопурином (БАП) в соотношении 1.25:0.25. Данная среда продемонстрировала высокие показатели выживаемости, интенсивного роста и активной закладки каллусной ткани, что свидетельствует о ее высокой эффективности для культивирования данного вида
4. Метод культуры *in vitro* не всегда обладает достаточной масштабируемостью для широкого применения. Тем не менее, микроклональное размножение представляет собой критически важный инструмент для сохранения редких и исчезающих видов растений, таких как лещина древовидная (*Corylus colurna* L.). В ряде случаев данный метод является незаменимым для восстановления популяций и поддержания генетического разнообразия этих растений.

### Список литературы:

1. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК – ПРЕСС, 1999. 160с.
2. Василевич В.И. Альфа-разнообразие растительных сообществ и факторы его, определяющие // Биологическое разнообразие: подходы к изучению и сохранению. СПб.: ЗИН РАН, 1992. С. 162–170.
3. Гроссгейм А. А. Анализ флоры Кавказа. Баку: Изд-во АзФАН СССР, 1936.- 269 с.
4. Грубов В. И. Род 6. Лещина – *Corylus L.* // Деревья и кустарники СССР. Дикорастущие, культивируемые и перспективные для интродукции. / Ред. тома С. Я. Соколов. – М. –Л.: Изд-во АН СССР, 1951 – Т. II. Покрытосеменные. – С. 377–378. – 612 с. – 2500 экз.
5. Дитченко Т.И. / Культура клеток, тканей и органов растений: Метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов. – Минск: БГУ, 2007. –25 с.
6. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 448с.
7. Красная книга республики Дагестан / Под ред. Абдурахманова Г.М. – Махачкала: Республиканская газетно-журнальная типография, 2009. -552с.
8. Лещина – *Corylus L.* // Флора СССР. В 30 т / Гл. ред. и ред. тома акад. В. Л. Комаров. – М.–Л.: Изд-во АН СССР, 1936. – Т. V. – С. 263–264. – 762 + XXVI с. – 5175 экз.
9. Международная программа ботанических садов по охране растений. М.: Междунар. совет ботан. садов по охране растений. *Botanic Gardens Conserv. Intern.* 2000. 57 с.
10. Примак Р. Основы сохранения биоразнообразия / Пер. с англ. О.С. Якименко, О.А. Зиновьевой. М.: Издательство Научного и учебно-методического центра, 2002. 256 с.
11. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *J. Physiol. Plant.* 1962. V. 15. P. 473–497.
12. Макаров С.С., Чудецкий А.И., Кузнецова И.Б., Куликова Е.И., Кульчицкий А.Н., Сурина Е.А. Организационно-экономическая оценка метода клонального микроразмножения лесных ягодных растений рода *Vaccinium*. – Текст: электронный // Лесохозяйственная информация. 2022. № 4. С. 30–38. DOI 10.24419/LHI.2304-3083.2022.4.04.

## Приложение



**Рис. 1.** Применение культуры клеток, тканей и органов растений в народном хозяйстве

**Таблица 1**

Питательная среда Мурасиге-Скуга (мг/л)

Компоненты	МС
<i>Неорганические соли:</i>	
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650
$\text{KNO}_3$	1900
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
$\text{K}_2\text{SO}_4$	-
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
KJ	0.83
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8

Органические вещества	
Тиамин-НС1	0.1
Пиридоксин-НС1	0.5
Никотиновая к-та	0.5
Сахароза	3000
Агар	8000
рН	5.6-5.8
Регуляторы роста добавляли в зависимости от варианта питательной среды.	



Рис.2. Строение семян двудольных растений: 1 – семенная кожура; 2 – семядоли; 3 – зародышевый корешок; 4 – зародышевый стебелек с почечкой.

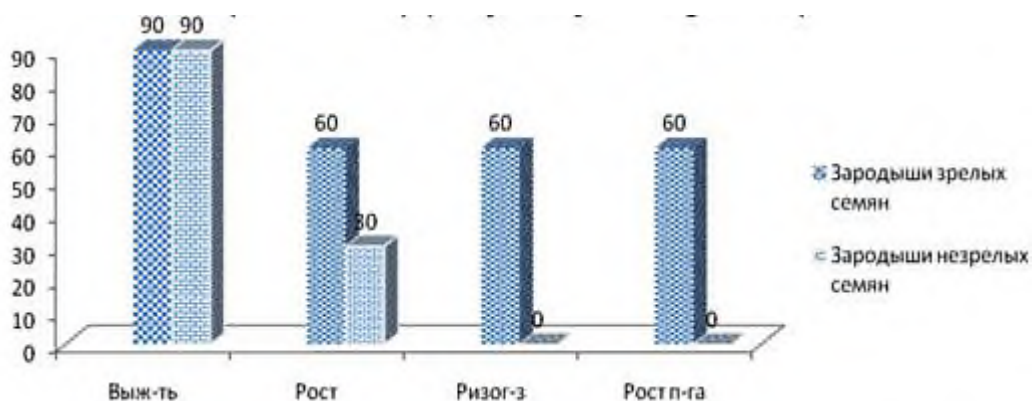


Рис. 3. Жизнеспособность семядоли с почками у зрелых и незрелых плодов лещины дровяной на среде МС+ ИМК и БАП (0.5:2.5мг/л)



а

б

**Рис. 4.** Состояние изолированных семядолей зрелых (а), незрелых (б) семян лещины древовидной

**Таблица 2**

Экспланты апикальной части семядоли лещины обыкновенной (60 сутки культивирования).

Варианты	Выживаемость	Рост	Каллус	Корни
	%	%	%	количество
<b>1-ИМК + БАП</b> (0.25:1.25);	60	60	0	0
<b>3-ИМК</b> (0.25);	80	25	25	0
<b>4- БАП</b> (1.25);	40	20	0	0
<b>5-ИМК+БАП</b> (1.25:0.25);	100	80	40	0
<b>6-ИМК</b> (1.25);	100	60	0	0
<b>7-БАП</b> (0.25);	80	20	20	0
<b>8-ИМК + БАП</b> (0.5:2.5);	60	60	20	0