

На правах рукописи

**Самарина
Лидия Сергеевна**

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРИЕМОВ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ
И СОХРАНЕНИЯ ЛИМОНА *IN VITRO***

Специальность 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в Государственном научном учреждении Всероссийском научно-исследовательском институте цветоводства и субтропических культур Российской академии сельскохозяйственных наук (г. Сочи)

Научный руководитель: кандидат сельскохозяйственных наук
Коломиец Татьяна Михайловна

Официальные оппоненты:
Калашникова Елена Анатольевна
доктор биологических наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Российский государственный
аграрный университет – МСХА имени
К.А. Тимирязева», профессор на кафедре
генетики и биотехнологии

Молканова Ольга Ивановна
кандидат сельскохозяйственных наук,
старший научный сотрудник, ФГБУН
Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина
Российской академии наук, заведующая
лабораторией биотехнологии растений

Ведущая организация: ФГБУН Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской академии
наук

Защита диссертации состоится 25 сентября 2013 года в 16-00 на заседании диссертационного совета Д 220.043.10 при Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева по адресу: 127550, г. Москва, ул. Прянишникова, д. 15, тел/факс: (499) 976-24-92, e-mail: genetics@timacad.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И. Железнова РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева

Автореферат разослан 23 августа 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Л.С. Большакова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Цитрусовые культуры занимают третье место в мире по распространению среди плодовых культур (FAO, 2009). Основными цитрусо-производящими странами являются США, Япония, Испания, Италия и другие, с теплым влажным климатом.

Среди субтропических районов земного шара особое место принадлежит субтропикам Краснодарского края, которые по своему географическому положению (43–44° с. ш.) являются самыми северными в субтропическом земледелии. В результате многолетних исследований по возделыванию и селекции цитрусовых на базе ГНУ ВНИИЦиСК Россельхозакадемии создана коллекция, в которой собраны все виды рода *Citrus*, имеющие важнейшее экономическое значение – всего более 120 таксонов (Зорин, Лаврийчук, 1964; Фогель, 2008; Кулян, 2012). Лимон (*Citrus limon* (L.) Burm.) – один из наиболее ценных видов рода *Citrus*, пользующийся большим потребительским спросом на рынке. Наряду с известными лечебными и диетическими свойствами лимон обладает высокими декоративными качествами. При благоприятных условиях растения лимона могут цвести круглый год и с успехом использоваться для внутреннего озеленения.

Вместе с тем, Черноморское побережье России является зоной рискованного цитрусоводства, так как повторяющиеся периодические холодные зимы представляют собой угрозу для промышленных посадок. К тому же, в последние годы в результате развития г. Сочи как горно-климатического курорта и столицы XXII зимних Олимпийских игр сельскохозяйственные площади сокращаются, в том числе и под цитрусовыми культурами.

Привлечение в исследования современных методов биотехнологии может помочь решить стоящие проблемы. Культивирование растений *in vitro* в состоянии замедленного роста имеет свои преимущества: высокая степень надежности сохранения ценных генотипов, экономия площади, трудовых ресурсов, возможность безопасного обмена гермоплазмой с другими коллекциями (*Citrus genetics...*, 2008).

Известно, что разработка большинства зарубежных протоколов микро-размножения и сохранения цитрусовых *in vitro* проведена на сеянцах (Barlaas, Skene, 1982; Marin, Duran Villa, 1999; Chaturvedi et al., 2002; Avenido et al., 2004; Jajoo, 2009; Benabdesselam, 2011; Chen, 2012 и др.). При этом способе сохранения сортовые особенности утрачиваются и растения зацветают через 5–10 и более лет. В этой связи актуальным является вопрос разработки и оптимизации надежных приемов сохранения взрослых (неювенильных) тканей, а также изучение органогенного потенциала различных типов эксплантов в условиях *in*

in vitro на примере *C. limon* для сохранения геноресурсов и использования их в селекционных целях.

Объекты исследований: *Citrus limon* (L.) Burm., сорта: Новоафонский, Ударник, Бесколючий; *Citrus x meyeri* лимон Мейера коллекции ГНУ ВНИИ-ЦиСК Россельхозакадемии.

Цель исследований: оптимизировать приемы микроразмножения и сохранения лимона *in vitro* для создания депонированной коллекции и дальнейшего использования ее в селекционной работе.

Задачи исследований:

1. Определить эффективный способ стерилизации побегов. Выявить возможные пути прямого морфогенеза эксплантов лимона *in vitro*.
2. Оптимизировать минеральную основу и гормональный состав питательной среды для микроразмножения лимона.
3. Установить оптимальный режим хранения микропобегов лимона *in vitro*.
4. Оценить эффективность ISSR-праймеров для определения генетической стабильности сортов в процессе хранения лимона *in vitro*.
5. Разработать протокол поддержания депонированной коллекции лимона в культуре тканей.

Новизна исследований. Впервые установлена возможность использования микропрививки лимона для повышения продуктивности микроразмножения. Выявлены сортовые особенности микроразмножения лимона. Модифицирована минеральная основа среды для размножения. Определены оптимальные сроки и условия среднесрочной консервации микропобегов. Для определения жизнеспособности растений при хранении лимона *in vitro* впервые использован метод медленной индукции флуоресценции хлорофилла. В процессе хранения *in vitro* изучена жизнеспособность лимона, в зависимости от типа экспланта. Впервые с помощью ISSR праймеров проведена оценка полиморфизма изученных сортов лимона.

Практическая значимость. Оптимизация приемов клонального микроразмножения цитрусовых позволит создать и поддерживать резервную коллекцию, сохранить на небольших производственных площадях накопленный генофонд для дальнейшего использования в селекционных и практических целях.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Микропрививка – как способ омоложения эксплантов от взрослых растений лимона;
2. Условия культивирования и составы питательных сред на всех этапах – от введения *in vitro* до адаптации *ex vitro*;

3. Оптимизированы приемы клонального микроразмножения и среднесрочного хранения микропобегов лимона *in vitro*.

Апробация работы и публикация результатов исследований. Результаты исследований докладывались и обсуждались на ежегодных отчетных сессиях ГНУ ВНИИЦиСК Россельхозакадемии, Сочи, 2009 – 2012 гг., на конференции «Научное обеспечение АПК», Краснодар, 2011 г., на летней школе молодых ученых «AgroBioTech», Москва, 2012, на Всероссийской выставке «Золотая Осень», Москва, 2011 г., на конкурсе научно-исследовательских проектов молодых ученых «AllTech Young Scientist», 2012 г., конкурсе инновационных проектов молодых ученых «У.М.Н.И.К.», Краснодар, 2011 г. По теме диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них четыре – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 118 страницах печатного текста, состоит из введения, 6 глав, рекомендаций для практического применения, выводов и 6 приложений. Работа содержит 18 таблиц, 35 рисунков. Список литературы включает 218 источников, в том числе 185 на иностранных языках.

Личный вклад автора. Автором обосновано направление научно-практических исследований, проведены исследования по оптимизации условий микроразмножения и сохранения лимона *in vitro*, определены возможные пути прямого органогенеза различных типов эксплантов, обобщены и проанализированы результаты исследований, разработаны рекомендации для практического применения результатов исследования.

Глава 1. КУЛЬТУРА ТКАНЕЙ ЦИТРУСОВЫХ: ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В главе рассматриваются вопросы основных биологических особенностей цитрусовых культур и актуальные вопросы культуры тканей как инструмента биотехнологии цитрусовых культур, а именно: проблема получения стерильной культуры, микроразмножение цитрусовых из различных типов эксплантов, вопросы сохранения гермоплазмы.

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Объекты исследований. *Citrus limon* (L.) Burm., сорта: Новоафонский, Ударник, Бесколючий, *Citrus x meyeri* лимон Мейера коллекции ГНУ ВНИИЦиСК Россельхозакадемии. Работа проводилась на базе ГНУ ВНИИЦ и СК Россельхозакадемии с 2009 по 2012 гг.

Методы исследований.

Получение стерильной культуры микропобегов. Источник эксплантов – донорные растения открытого грунта возрастом 6 – 10 лет. Экспланты для введения в культуру: 1. Вегетативные почки с сегментом побега длиной 0,5 – 0,7 см, 2. Меристемы молодых побегов, 3. Семена зрелых плодов (для получения подвоев).

Побеги стерилизовали с использованием различных веществ: гипохлорита Са (7 %), сулемы, диацида, велтолена, новодеза (0,2-0,5 %), доместоса (10 %) в сочетании с тетрациклином (0,1-0,2 %).

Микропрививку осуществляли по методике L. Navarro (Navarro, 2008) модифицированной. В качестве подвоя выступали сеянцы лимона Мейера, выращенные *in vitro*. Основа питательной среды – DKW с добавлением регуляторов роста БАП 0,1 мг/л + НУК 0,5 мг/л.

Микроразмножение. На данном этапе изучали: **1.** Влияние минеральной основы: МС (Murasige et al., 1962), WPM (Lloyd et al., 1980) DKW (Driver et al., 1984) и комбинированной минеральной основы (КМО – МС с пониженным содержанием нитрата аммония (250 мг/л) без нитрата калия, но с добавлением сульфата аммония 1500 мг/л); **2.** Влияние регуляторов роста (БАП, кинетин, ГК, тидиазурон, НУК – в различных комбинациях) на размножение микропобегов; **3.** Возможность повышения коэффициента размножения путем повторяющихся микропрививок. Измеряли коэффициент размножения и прирост микропобегов через 1,5 месяца культивирования.

Сохранение *in vitro*. В качестве модельного сорта использовали лимон Новоафонский. Минеральная основа питательной среды для культивирования МС (или ½ МС) с добавлением БАП 0,1 мг/л + НУК 0,5 мг/л, сахарозы 25,0 г/л, агара 7,0 г/л. Хранение растущих образцов проводили в двух режимах: 1. В стандартных условиях при температуре $+ 22 \pm 2$ °С и освещении 5 000 люкс (5 клк); 2. В условиях климатической камеры при температуре $+ 10 \pm 2$ °С, освещении 1 000 люкс (1 клк). Пробирки закрывали фольгой и герметично заматывали пленкой (Высоцкая, 1994).

Изучение фотосинтетической активности проводили методом медленной индукции флуоресценции хлорофилла (на приборе LPT-3С) и методом А.А. Шлыка (1972). В процессе хранения измеряли прирост (разница между конечной и начальной высотой микропобегов) и индекс жизнеспособности F_m/F_t , где F_m – максимум флуоресценции, F_t – стационарный уровень флуоресценции.

Оценка эффективности ISSR праймеров. Анализ проводили на базе лаборатории мониторинга генетической эрозии растительных ресурсов ВНИИ растениеводства имени Н.И. Вавилова (г. Санкт-Петербург). Кроме сортов ли-

мона в анализ был включен каламондин (*Citrus × microcarpa* Bunge) с целью определить степень различий между лимонной группой и этим видом с точки зрения оценки эффективности ISSR-праймеров. ДНК выделяли из листьев двухмесячных, адаптированных к нестерильным условиям растений и из листьев 10-летних донорных растений – источников эксплантов. Степень сходства/различия ISSR-фрагментов у образцов оценивали с помощью коэффициента попарного сходства по Dice (Dice, 1945) и визуализировали методом UPGMA с помощью программного обеспечения DARwin5.9 (Perrier et al., 2006). **Укоренение микропобегов** проводили на питательной среде ½ МС с использованием ауксинов НУК и ИМК.

Все эксперименты проводили в трех-четыре повторностях, по 15–20 образцов в каждой. Статистический анализ полученных данных проводили по методике Б.А. Доспехова (1985) и с помощью программы MS Excel 2007.

Глава 3. ПОЛУЧЕНИЕ СТЕРИЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ И ПРЯМОЙ ОРГАНОГЕНЕЗ ЭКСПЛАНТОВ ЛИМОНА

3.1. Получение стерильной культуры. Вегетативные почки – наиболее надежный тип эксплантов с точки зрения генетической стабильности сортов. Однако получение стерильной культуры из этих эксплантов проблематично из-за высокого уровня эндофитной контаминации. В связи с этим изучали различные варианты стерилизации побегов. Наиболее высокий процент стерильных почек получен в вариантах IVб (0,3 % велтолен 25 минут), VIIа и VIIб (тетрациклин 0,1-0,2 % 10 мин + Доместос 10 % 15 мин) (табл. 1). Различия между этими тремя вариантами незначительны, и выход стерильных эксплантов составил 27,7 – 33,0 %.

Таблица 1.

Выход жизнеспособных эксплантов в результате стерилизации побегов лимона (средний по сортам)

Вариант	Стерилизующие вещества	Выход стерильных эксплантов, %
I	Гипохлорит Са 7% 20 мин	9,4 ± 1,4
II	Сулема 0,2% 10 мин	15,9 ± 3,9
III	Диацид 0,2 % 15 мин	13,2 ± 3,0
IVа	Велтолен 0,2% 25 мин	12,0 ± 2,1
IVб	Велтолен 0,3% 25 мин	27,7 ± 4,0
IVв	Велтолен 0,5% 25 мин	1,4 ± 0,9
Vа	Новодез 0,2% 25 мин	9,9 ± 1,1
Vб	Новодез 0,3% 25 мин	15,7 ± 2,0
Vв	Новодез 0,5% 25 мин	4,8 ± 1,0
VI	Доместос 10% 15 мин	12,8 ± 1,5
VIIа	Тетрациклин 0,1 % 10 + Доместос 10 % 15мин	28,4 ± 3,0
VIIб	Тетрациклин 0,2 % 10 мин + Доместос 10 % 15мин	33,0 ± 4,6

Для повышения выхода стерильных эксплантов в питательную среду добавляли тетрациклин. Добавление 400 мг/л тетрациклина позволило повысить процент стерильных эксплантов до 65,4 % по сравнению с контролем, а органо-генез стерильных почек составил 48,5 %. Таким образом, добавление тетрациклина в питательную среду повысило выход стерильных жизнеспособных эксплантов на 20,8 % (табл. 2).

Таблица 2.

Эффективность получения стерильной культуры и органо-генез почек лимона сорта Ново-афонский (стерилизация 0,3 % Велтолен 25 мин)

Антибиотик в питательной среде, мг/л	Выход стерильных эксплантов, %	Органо-генез, %
Без антибиотика	27,7	27,7
Тетрациклин 200	33,2	31,6
Тетрациклин 400	65,4	48,5
Тетрациклин 900	77,6	24,3

3.2. Особенности органо-генеза эксплантов лимона.

Органо-генез из пазушных почек. Пазушные почки от 6-летних растений лимона характеризовались более активным побегообразованием, по сравнению с 10-летними. Срок наступления массового роста (СНМР) 10-летних почек был на 7-9 дней больше, чем у почек 6-летних донорных растений, а частота побегообразования была на 2-19 % ниже, в зависимости от сорта (табл. 3). В дальнейшем побеги росли неактивно.

Таблица 3.

Влияние генотипа и возраста донорных растений на частоту и продолжительность побегообразования из почек лимона

Сорт	Возраст дерева, лет	СНМР, дней	Побегообразование, %
Бесколючий	6	15,5 ± 0,4	84,5
	10	22,4±0,4	76,8
Ударник	6	17,2±0,6	61,1
	10	26,5±0,6	59,2
Новоафонский	6	20,4±0,4	83,5
	10	29,2±0,4	64,8
Мейер	6	12,6±0,3	87,7
	10	19,0±0,8	85,0

Для повышения ростовой активности использовали альтернативный способ прямого органо-генеза – микропрививку.

Органо-генез лимона путем микропрививки. В результате микропрививки на подвой лимон Мейера через 10-20 дней образовывалась общая сосудистая система и меристемы трогались в рост (рис. 1). Меристемы от *in vitro* культивируемых почек приживались лучше, чем меристемы из открытого грунта (*in*

vivo). Приживаемость составила 65,8-81,6 % и 21,4-35,1 %, соответственно. Различия между сортами несущественны (табл. 4).

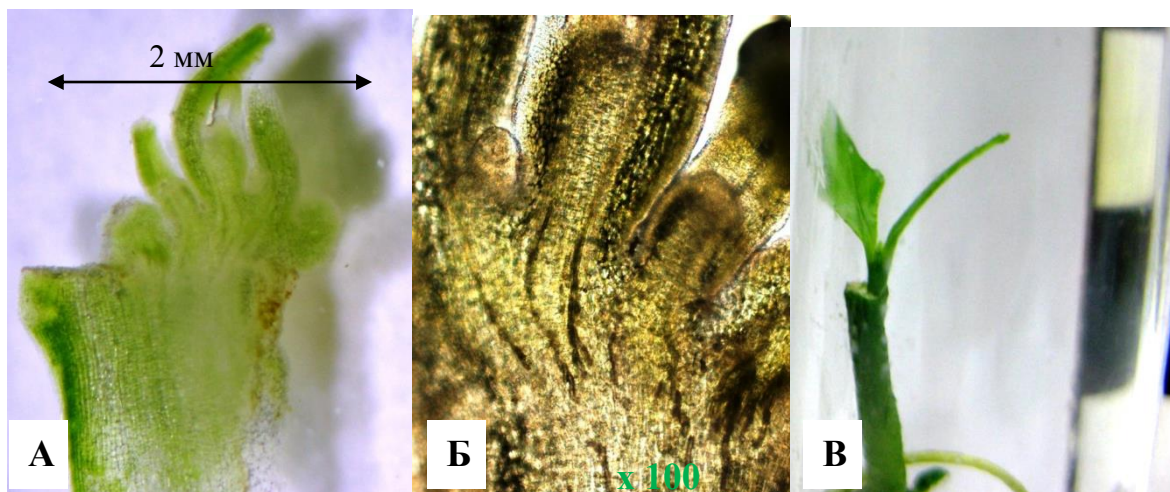


Рис 1. Микропрививка лимона Новоафонский на лимон Мейера: А, Б – образование общей проводящей системы (через 10 дней); В – начало роста (через 20 дней).

В результате дисперсионного анализа установлено, что доля влияния сорта на приживаемость меристем составила лишь 5 %, в то время как влияние источника привоя – 92 % (табл. 4). Все полученные данные достоверны $F_{\phi} > F_{05}$. Таким образом, в результате микропрививки были получены высокие показатели приживаемости, что делает этот способ перспективным для дальнейшего культивирования лимона *in vitro*.

Таблица 4.

Приживаемость микропрививки на подвой лимон Мейера (% , $НСР_{05}=8,33$).

Сорт привоя	Источник привоя		
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	
Новоафонский	25,5	75,2	
Бесколючий	21,4	73,3	
Ударник	24,8	65,8	
Мейер	35,1	81,6	
Результаты дисперсионного анализа			
Фактор	F_{ϕ}	F_{05}	Доля влияния фактора, %
Сорт привоя	19,62	2,99	4,8
Источник привоя	1134,74	4,24	92,4
Взаимодействие	3,05	2,99	0,7

Глава 4. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ЛИМОНА *IN VITRO*

4.1. Микроразмножение побегов из пазушных почек. Для повышения эффективности культивирования *in vitro* микропобегов из пазушных почек оптимизировали состав питательной среды. Из четырех базовых сред наиболее

эффективными оказались КМО и DKW, где коэффициент размножения (1,8 – 2,8) существенно превышал контроль (на среде МС – 1,4 – 1,7) (рис. 2).

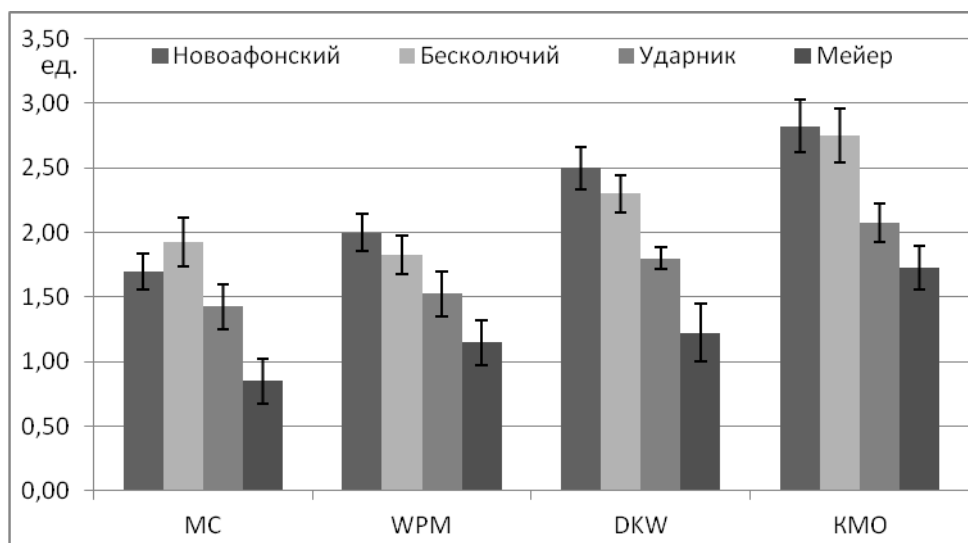


Рис. 2. Коэффициент размножения микробов в зависимости от минеральной основы питательной среды (БАП 2,0 мг/л + ГК 2,0 мг/л).

При изучении влияния регуляторов роста установлено, что наиболее эффективными для размножения вариантами оказались VII и VIII (табл. 5).

Таблица 5.

Коэффициент размножения микробов из почек лимона в зависимости от регуляторов роста в питательной среде (базовая среда КМО)

Генотип	Концентрации регуляторов роста, мг/л									
	Контроль без регуляторов роста	НУК 0,5					БАП+ГК		БАП 1	
		БАП			Кинетин		1,0+1,0	2,0+2,0	ТДЗ	
		1,0	2,0	3,0	1,0	2,0			0,01	0,10
<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>	<i>VII</i>	<i>VIII</i>	<i>IX</i>	<i>X</i>	
Новоафонский	1,0	1,4	1,7	1,2	1,1	1,1	1,9	2,4	1,2	1,5
Бесколючий	0,9	1,2	1,7	1,4	1,0	1,2	1,8	2,4	1,5	1,0
Ударник	1,0	1,2	1,7	0,9	1,1	1,4	1,7	2,1	1,6	1,8
Мейер	1,0	1,2	1,3	1,0	0,9	1,1	1,6	1,9	1,1	1,1
<i>Значения F критерия и НСР при 0,05% уровне значимости</i>										
Фактор	F факт.	F теор.	НСР		Доля фактора, %					
Сорт	25,21	4,40	0,1		6					
Регуляторы роста	109,31	8,58	0,1		74					
Взаимодействие	5,36	2,18	0,2		11					

Наибольший коэффициент размножения микробов был получен при добавлении в среду БАП 2 мг/л + ГК 2 мг/л и составил в зависимости от сорта

1,9-2,4 побега на эксплант через 1,5 месяца культивирования. На питательных средах с другими комбинациями регуляторов роста коэффициент размножения принимал меньшие значения, но при этом он был выше, чем в контрольном варианте. Проведенная статистическая обработка результатов опыта достоверно показала, что различия между вариантами существенны и наиболее оптимальной питательной средой для размножения является КМО с добавлением БАП 2 мг/л + ГК 2 мг/л.

Следует отметить, что, в целом, микропобеги из пазушных почек взрослых растений лимона характеризовались низкими значениями коэффициента размножения. В связи с этим изучали возможность повышения их продуктивности путем микропрививки.

4.2. Микропрививка как способ размножения лимона

В наших экспериментах способность к омоложению микропобегов проверялась с помощью сравнения роста привоя от 1го, 2го и 3го циклов субкультивирования в микропрививке. Характер роста и размножения микрочеренков, полученных от каждого цикла, сравнивали с микропобегами и сеянцами от 10-летнего лимона Новоафонский *in vitro*. В целом, микропобеги привоя характеризовались более быстрым ростом, чем побеги, полученные из почек взрослых растений. После третьего цикла микропрививки коэффициент размножения микрочеренков в 2 раза превышал аналогичный показатель микропобегов из пазушных почек растений-доноров и составил 4,6 шт/побег, тем самым приближаясь к сеянцам (рис. 3).

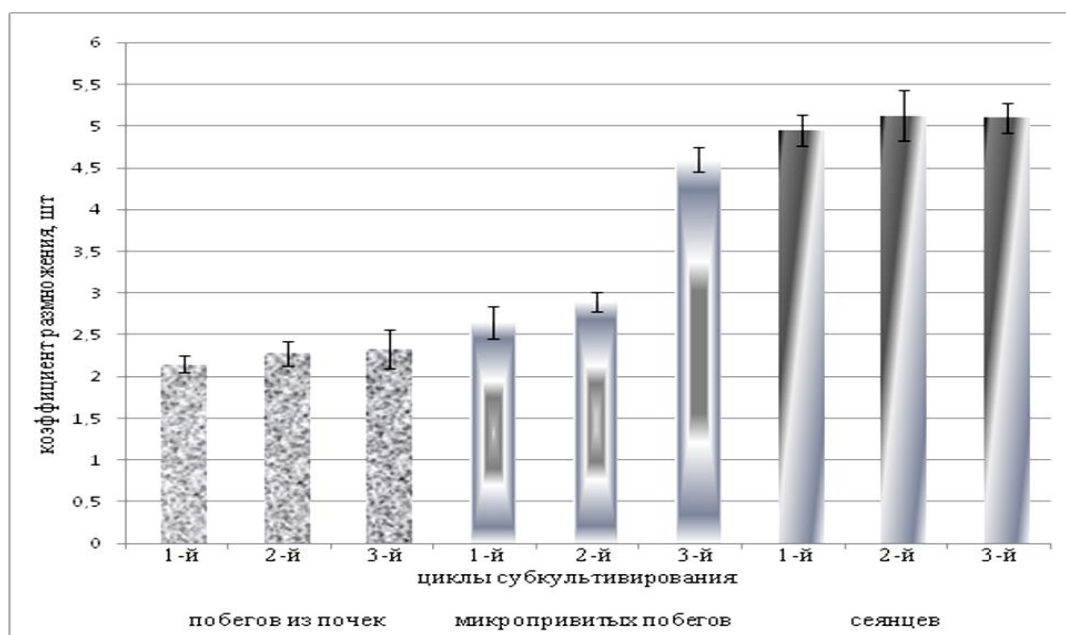


Рис. 3. Коэффициент размножения микропобегов лимона в зависимости от их источника и цикла субкультивирования

Также отмечено, что коэффициент размножения микропобегов из почек взрослых растений после третьего пассажа существенно не повышался. Таким образом, с помощью перепрививок происходила активизация ростовых процессов, связанная с физиологическим омоложением. Следовательно, данный путь морфогенеза открывает большие возможности для массового размножения и оздоровления генотипов лимона.

ГЛАВА 5. ОСОБЕННОСТИ СОХРАНЕНИЯ МИКРОПОБЕГОВ ЛИМОНА *IN VITRO*

5.1. Оптимизация режимов и условий хранения *in vitro*.

Высокие показатели роста микропобегов являются главной целью микро-размножения, но для длительного хранения *in vitro* необходимо определить условия, замедляющие рост побегов без потери их жизнеспособности. В процессе хранения *in vitro* было установлено, что микропобеги из пазушных почек взрослых растений характеризовались низкой жизнеспособностью. Через 4 месяца на среде $\frac{1}{2}$ МС осталось 83,0–88,1 %, а на среде МС – 76,6–81,8 % жизнеспособных микропобегов лимона Новоафонский (табл. 6). При этом их средний прирост составлял 4,7 и 2,3 мм, соответственно. Спустя 10 месяцев хранения на этих средах при стандартных световом и температурном режимах большая часть микропобегов погибла.

Таблица 6.

Влияние сроков хранения микропобегов *in vitro* на рост и жизнеспособность лимона сорта Новоафонский

Среда	Продолжительность консервации, мес.	Прирост, мм	Выжило микропобегов, %
$\frac{1}{2}$ МС	2	6,4±0,6	93,9–98,3
	4	4,7±0,7	83,0–88,1
	6	1,9±0,6	60,0–65,8
	8	0,3±0,2	34,0–40,8
	10	0	13,6–15,6
МС	2	5,0±0,4	81,3–88,9
	4	2,3±0,4	76,6–81,8
	6	0,5±0,2	48,0–54,0
	8	0	20,4–25,0
	10	0	5,0–7,0

*± ошибка выборочной средней

С целью повышения продолжительности хранения без пересадок на свежую среду определяли наиболее оптимальный тип эксплантов: микропобегов от микропрививки, сеянцев и микропобегов от взрослых растений-доноров лимона Новоафонский. Через 4 месяца хранения наибольший прирост был отмечен у сеянцев (14,8 мм) и у микропривитых растений (12,0 мм) на среде $\frac{1}{2}$ МС при стандартных условиях освещения и температуры (табл. 7). У микропобегов

из почек отмечен наименьший прирост (4,7 мм). В условиях пониженного светового и температурного режима (1 клк и $t +10 \pm 2^\circ\text{C}$) прирост снижался: от 0,0 (побеги из почек) до 4,3 (сеянцы) мм.

Таблица 7.

Прирост и индекс жизнеспособности у микропобегов лимона Новофонский через 4 месяца хранения

Тип экспланта	5 клк, $+22 \pm 2^\circ\text{C}$		1 клк, $+10 \pm 2^\circ\text{C}$	
	Прирост (мм)	Индекс жизнеспособности	Прирост (мм)	Индекс жизнеспособности
Почки взрослых растений	$4,7 \pm 0,7$	$1,33 \pm 0,09$	$0,0 \pm 0,0$	$1,73 \pm 0,07$
Сеянцы	$14,8 \pm 2,5$	$1,81 \pm 0,08$	$4,3 \pm 1,0$	$2,46 \pm 0,44$
Микропривитые растения	$12,0 \pm 1,4$	$1,61 \pm 0,17$	$3,8 \pm 0,5$	$1,99 \pm 0,11$

* \pm ошибка выборочной средней

Таким образом, хранение в условиях пониженных температуры и освещения более оптимально для замедления роста микропобегов, чем культивирование при стандартных условиях. Этот вывод подтверждается индексами жизнеспособности. При интенсивности освещения 1 клк и $t +10 \pm 2^\circ\text{C}$ этот показатель был выше, чем при 5 клк и $t +22 \pm 2^\circ\text{C}$. Наибольший индекс жизнеспособности отмечен у сеянцев и составил 1,81–2,46. У микропривитых растений отмечены меньшие его значения – 1,61–1,99. И наименьшим индексом жизнеспособности характеризовались микропобеги из почек – 1,33–1,63.

В зависимости от типа эксплантов определяли оптимальную продолжительность хранения *in vitro* без пассирования. Наибольшее количество жизнеспособных микропобегов (95 %) через 12 месяцев хранения наблюдалось у сеянцев (рис. 4).

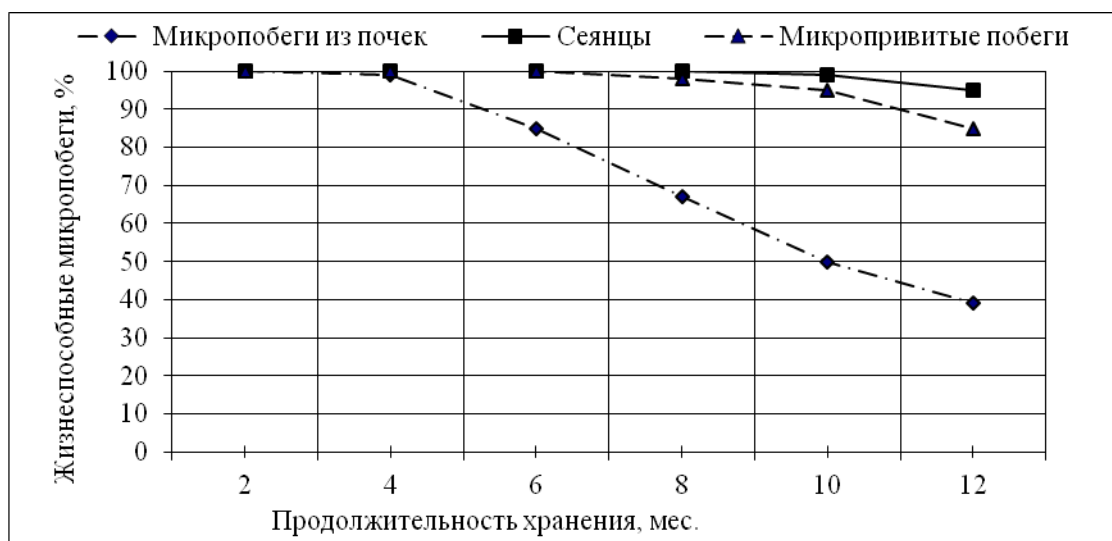


Рис. 4. Выход жизнеспособных микропобегов лимона Новофонский на среде $\frac{1}{2}$ МС при 1 клк и $+10 \pm 2^\circ\text{C}$ ($n=120$)

Оптимальный срок хранения микропривитых растений составил 10 месяцев. К 12 месяцу хранения количество их снизилось до 85 %. У микропобегов из почек резкое снижение жизнеспособности происходило после 4 месяцев хранения *in vitro* и к 12 месяцу осталось лишь 40 % жизнеспособных побегов. Таким образом, наибольшей продолжительностью хранения *in vitro* без пассирования характеризовались сеянцы и микропривитые побеги.

Важным показателем, отражающим особенности физиологической адаптации растений к различным факторам среды, является пигментный состав листьев. При изучении содержания хлорофилла *a* (Ch *a*) и каротиноидов в листьях сеянцев лимона отмечено постепенное снижение этих пигментов в процессе хранения *in vitro*. Однако, было обнаружено, что в условиях пониженных температуры и освещенности это снижение происходило медленнее, чем при хранении в обычных условиях (рис. 5).

В условиях пониженной температуры и освещения содержание хлорофилла *a* снижалось с 1,81 до 1,56 мг/г, то есть на 0,25 мг/г сырой массы листьев через 6 месяцев культивирования. В стандартных условиях хранения за аналогичный период количество хлорофилла *a* снижалось с 1,59 до 1,18 мг/г – в среднем на 0,41 мг/г. На 12-й месяц хранения при стандартных условиях содержание этого пигмента составляло 1,14 мг/г, то есть снизилось на 0,45 мг.

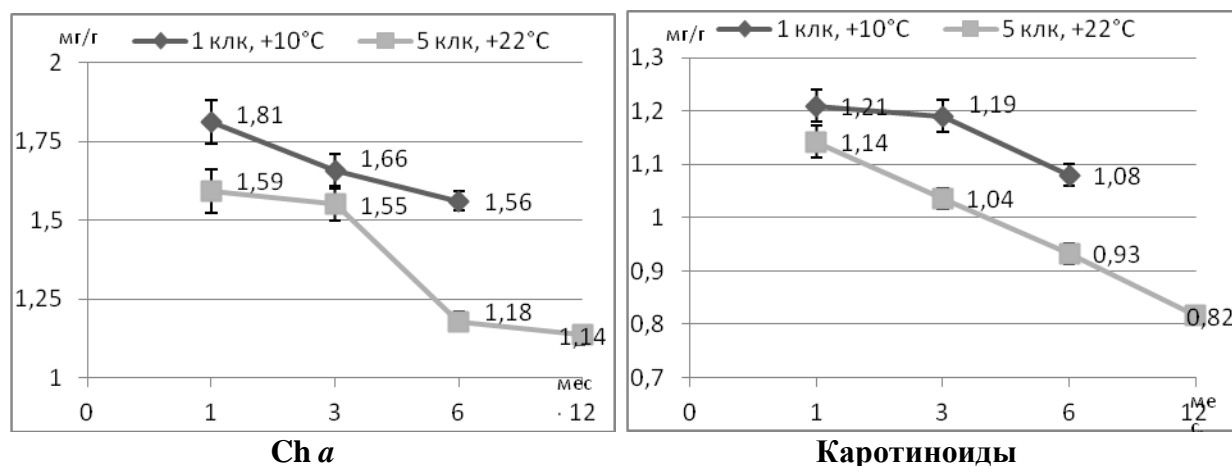


Рис. 5. Динамика содержания хлорофилла *a* и каротиноидов (мг/г сырого вещества) в процессе хранения сеянцев лимона сорта Новоафонский *in vitro* (на среде ½ МС + БАП 0,1 мг/л + НУК 0,5 мг/л)

Концентрация каротиноидов с 1-го по 3-й месяц хранения при пониженных температуре и освещении практически не изменялась, ее снижение на 0,11 мг происходило с 3-го на 6-й месяцы культивирования. В стандартных условиях хранения происходил постепенный спад каротиноидов с 1,14 до 0,82 мг/г, то есть их концентрация снизилась на 0,32 мг за 12 месяцев хранения.

Анализ изменения содержания пигментов показал, что условия пониженной температуры (+10 °С) и интенсивности освещения (1000 люкс) более оптимальны для сохранения фотосинтетического аппарата и пластических веществ в листьях микропобегов лимона, и, как следствие, более высокого уровня жизнеспособности микропобегов. Такие условия позволяют сохранять их 10 –12 месяцев без пассирования.

4.3. Анализ внутрисортного полиморфизма. В процессе хранения коллекций *in vitro* важным является вопрос генетической стабильности сортов. Для идентификации сортов лимона и степени их стабильности при хранении *in vitro* изучали эффективность девяти ISSR праймеров. В результате анализа трех сортов лимона – Новоафонский, Бесколючий и Ударник в сравнении с формой каламондина *Citrus x microcarpa* Bunge, с помощью девяти ISSR праймеров в сумме получили 92 четких фрагмента высокой интенсивности (табл. 8). Количество таких фрагментов варьировало от 7 (праймер М6) до 17 (праймер М3) при арифметическом среднем 10,2. Число полиморфных фрагментов варьировало от 0 (праймер М13С) до 13 (М 3) и в среднем составляло 4,8, то есть 47 %.

Таблица 8.

Уровень полиморфизма девяти ISSR праймеров у *Citrus limon* (L.) Burm и *Citrus mitis* Blan.

Праймер		Количество фрагментов		Полиморфизм, %
		Всего	Полиморфных	
М1	(AC) ₈ CG	12	9	75
М3	(GA) ₈ (C/T)C	17	13	76
М6	(CAC) ₅	7	1	14
М7	(CAG) ₅	8	1	13
М8	(GTG) ₅	9	4	44
М9	(GACAC) ₄	9	8	89
М10	(CA) ₆ (A/G)G	10	4	40
М13С	(AGC) ₄ C	9	0	0
М13Т	(AGC) ₄ T	11	3	27
Среднее		10,2	4,8	47
Всего		92	43	-

На электрофореграмме праймера М1 видны различия между каламондином (дорожка 1) и лимонной группой (дорожки 2 – 9), а также различия между сортами Бесколючий, Ударник и Новоафонский (рис. 6).

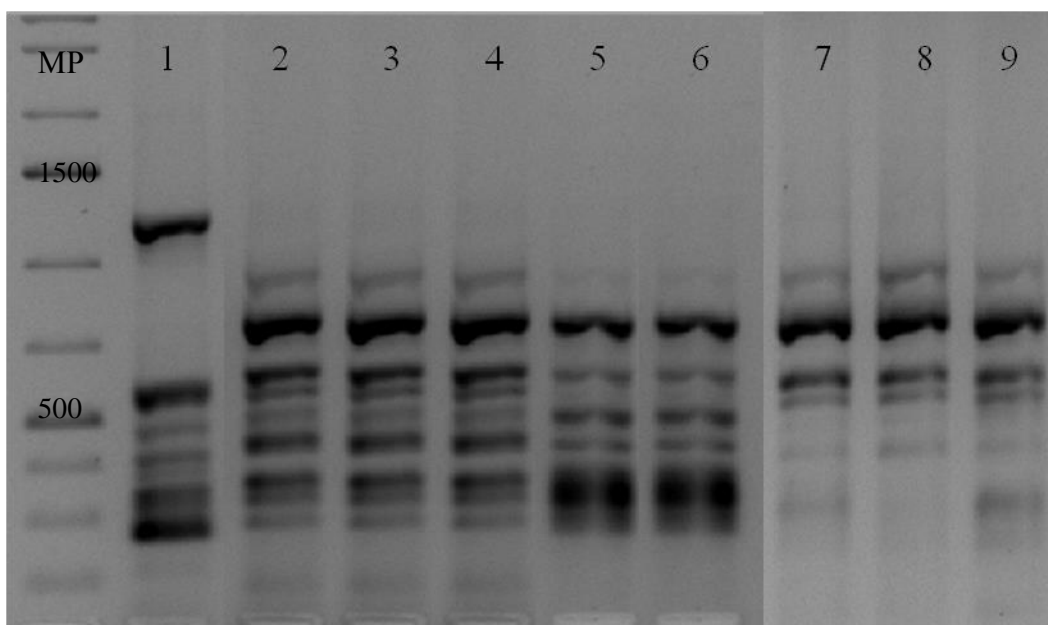


Рис. 6. МР – маркер размера; 1 – Каламондин, 2 – Бесколючий Мат., 3 – Бесколючий *in vitro*1, 4 – Бесколючий *in vitro*2, 5 – Ударник Мат., 6 – Ударник *in vitro*1, 7 – Новоафонский Мат., 8 – Новоафонский *in vitro*1, 9 – Новоафонский *in vitro*2,

В результате проведенного кластерного анализа методом UPGMA все сорта разделяются на отдельные кластеры. Выявлено, что микропобеги после хранения *in vitro* 6 месяцев (обозначены *in vitro*1) и 12 месяцев (*in vitro*2) идентичны исходным маточным растениям (Мат.1) (рис. 7).

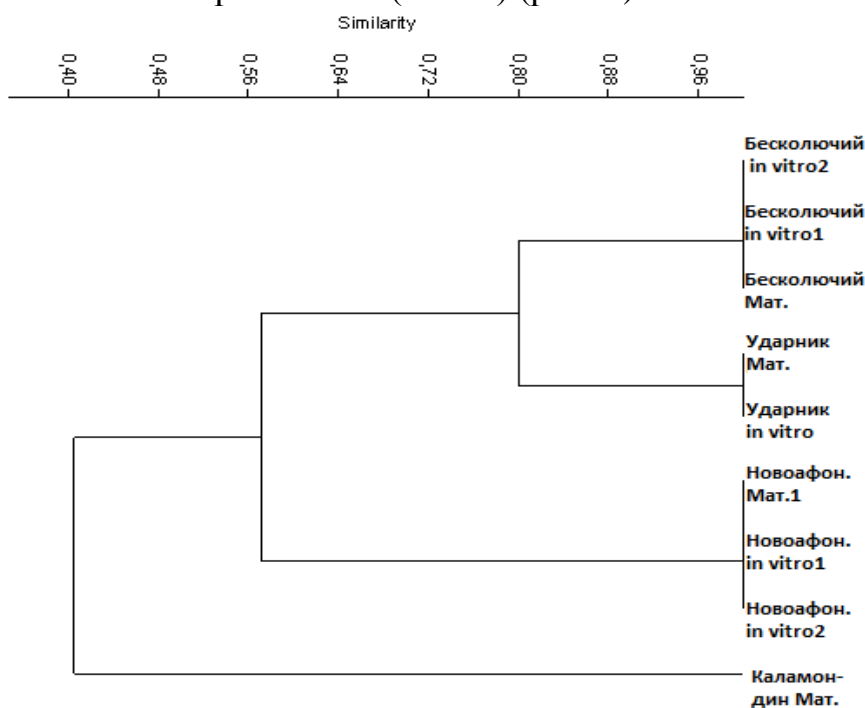


Рис. 7. UPGMA дендрограмма лимона и каламондина на основе коэффициентов попарного сходства по Dice, 1945.

У сортов Бесколючий и Новоафонский после 12 месяцев хранения *in vitro*, и у сорта Ударник после 6 месяцев хранения не было выявлено генетических отклонений от исходных маточных растений. Таким образом ISSR праймеры позволяют оценить генетическую стабильность изученных сортов.

Глава 6. УКОРЕНЕНИЕ И АДАПТАЦИЯ ПОБЕГОВ К НЕСТЕРИЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ

Изучение влияния ИМК и НУК в питательной среде на длину корневой системы микропобегов из пазушных почек показало, что при добавлении только НУК длина корней была больше, чем когда использовали сочетание двух ауксинов (рис. 8). Максимальные показатели длины корней у всех сортов наблюдали в варианте с 3,0 мг/л НУК, при этом длина составляла 4,2 – 5,2 см. В этом варианте между сортами различия несущественны.

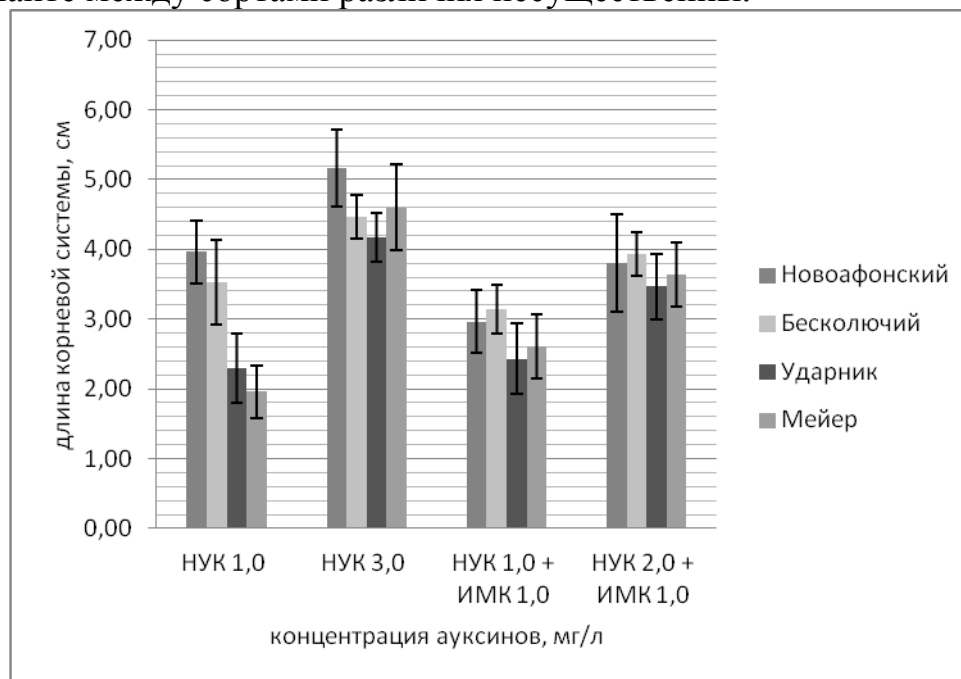


Рис. 8. Длина корневой системы (см) микропобегов лимона на среде $\frac{1}{2}$ МС через 30 дней культивирования.

Количество корней, образованных у микропобегов зависело от наличия/отсутствия ИМК в питательной среде. Оно было больше в вариантах, где присутствовали два ауксина. Там же, где был только НУК, количество корней на микропобег было значительно меньше (рис. 9). Максимальным этот показатель оказался в вариантах с НУК 1,0 – 2,0 мг/л + ИМК 1,0 мг/л и в среднем по сортам составил 3,1 – 3,8 корней на микропобег.

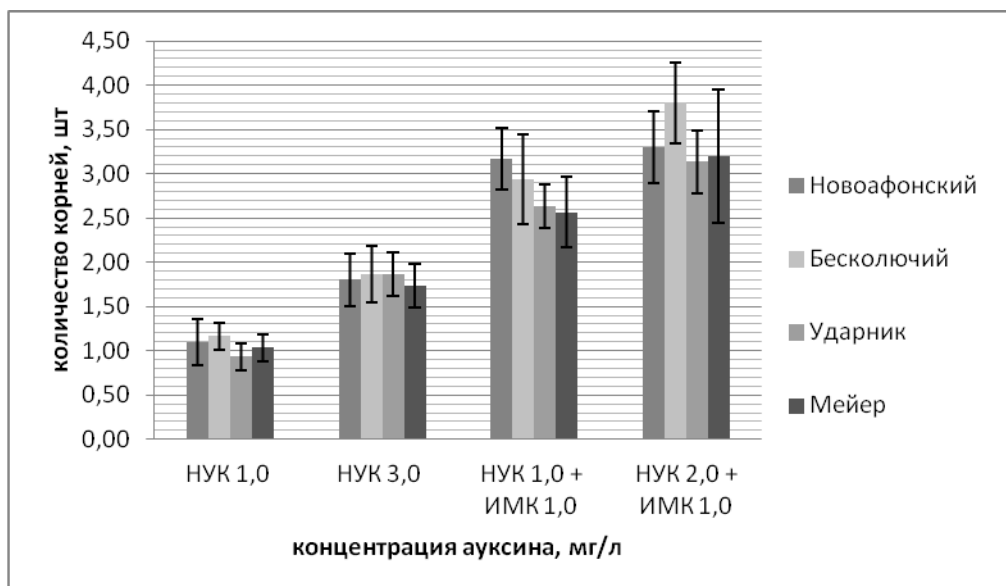


Рис. 9. Количество корней на микропобег (шт) у лимона на среде $\frac{1}{2}$ МС через 30 дней культивирования.

Таким образом, наиболее оптимальным сочетанием регуляторов роста в питательной среде $\frac{1}{2}$ МС является НУК 1,0 – 2,0 мг/л + ИМК 1,0 мг/л. Такая комбинация позволяет получить 83,7 – 95,1 % укорененных микропобегов с длиной корневой системы 4,2 – 5,2 см и количеством корней на побег 3,1 – 3,8 штук. В результате наших исследований были получены укорененные, адаптированные к нестерильным условиям растения, готовые к высадке в теплицу или для выращивания в комнатной культуре.

РЕКОМЕНДАЦИИ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

С целью получения полноценных растений лимона, микроразмножения и сохранения их в культуре тканей предлагается следующая последовательность операций (рис. 10):

1. Для введения в культуру тканей:

а) Молодые побеги весеннего (апрель – май) прироста освободить от листьев, промыть с хозяйственным мылом и в проточной воде в течение 30 минут. Затем в условиях стерильного помещения обработать побеги 0,3 % растворе Велтолен 25 мин, с последующей трехкратной промывкой стерильной дистиллированной водой. Сегменты побегов длиной 0,7 см с почкой помещаются вертикально на питательную среду – МС + 0,1 мг/л БАП + 0,5 мг/л НУК + сахароза 25,0 г/л + агар 7,0 г/л. Культивирование при световом режиме 16/8 – 5 клк, $t +22 \pm 2$ °С до получения микропобегов.

б) Для получения сеянцев – семена стерилизуют 0,3 % раствором велтолен 30 мин. Стерильными инструментами снимают обе семенные оболочки, и

помещают семядоли на питательную среду МС + БАП 1,0 мг/л + НУК 0,1 мг/л + сахара 25,0 г/л + агар 7,0 г/л, световой режим 16/8 – 5 клк, t + 22 ± 2 °С.

в) Для получения побегов путем микропрививки отдельно готовят подвой и привой. Подвой – сеянцы лимона четырех недель культивирования *in vitro*, привой – микропобеги из пазушных почек *in vitro*. Сеянцы декапitiруют, оставляя 1,0 – 1,5 см эпикотиль, на месте среза которого делают L-образный разрез коры длиной 1 – 2 мм. В этот разрез помещают привой – меристему с 2–3 примордиями. Микропривитые побеги помещают на среду DKW + БАП 0,1 мг/л + НУК 0,5 мг/л + сахара 30,0 г/л + агар 7,0 г/л, и культивируют при световой режиме 16/8 – 5 клк, t + 22 ± 2 °С.

2. Для омоложения микропобегов проводят цикл из не менее трех микропрививок, продолжительностью 2-3 месяца каждый. В каждой последующей прививке используют почки предыдущего привоя. После третьей перепрививки микрочеренки привоя высаживают на среду для размножения.

3. Для микроразмножения микропобеги культивируют на среде DKW (или КМО) + БАП 2,0 мг/л + ГК 2,0 мг/л + сахара 25,0 г/л + агар 7,0 г/л световой режим 16/8 – 5 клк, t + 22 ± 2 °С.

4. Для депонирования *in vitro* используют следующие условия – среда ½ МС + БАП 0,1 мг/л + НУК 0,5 мг/л, сахара 20,0 г/л, освещение 16/8 – 1 клк, t + 10 ± 2 °С.

5. Для укоренения микропобеги помещают на среду ½ МС + НУК 2,0 мг/л + ИМК 1,0 мг/л + сахара 20,0 г/л + агар 7,0 г/л, световой режим 16/8 – 5 клк, t + 22 ± 2 °С.

6. Адаптацию следует проводить в 2 этапа: 1. Высадка укорененных растений в адаптационные камеры с вермикулитом, закрытые полиэтиленовой пленкой; 2. Высадка на стеллажи или в горшки в тепличные или комнатные условия.

ВЫВОДЫ

1. Установлен эффективный режим стерилизации побегов взрослых растений лимона – обработка 0,3% раствором Велтолен 25 мин и добавление антибиотика тетрациклина 400 мг/л в питательную среду.

2. Оптимизирован минеральный и гормональный состав питательной среды для микроразмножения лимона – КМО + БАП 2,0 мг/л + ГК 2,0 мг/л.

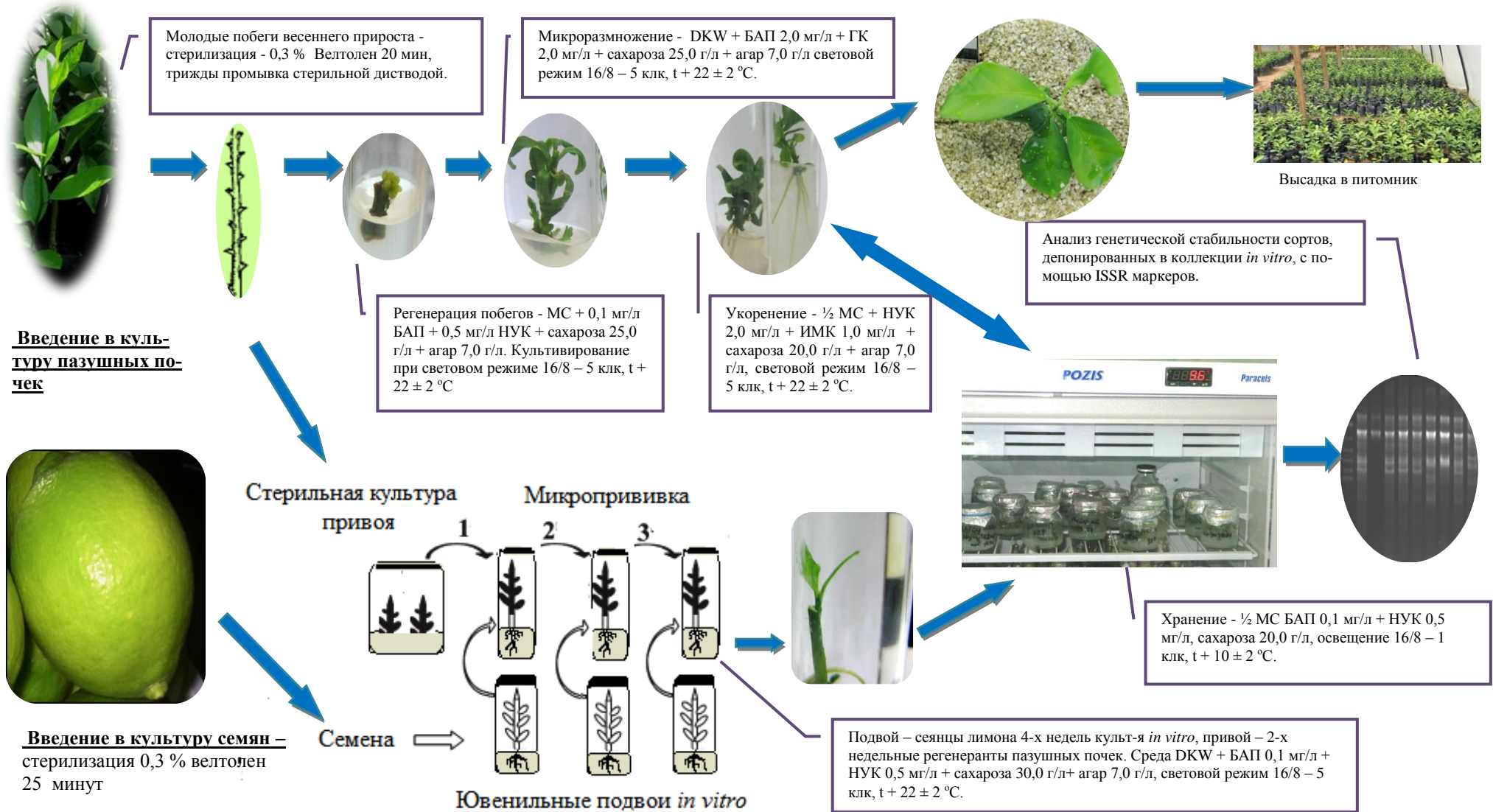
3. Установлено, что после трех циклов микропрививки в почках происходит активизация ростовых процессов, и коэффициент размножения лимона повышается в 2 раза, что является критерием физиологического омоложения. Микропрививка является наиболее перспективным способом микроразмножения и сохранения лимона *in vitro*.

4. Выявлены оптимальные условия, позволяющие сохранять микропобеги лимона *in vitro* 10–12 месяцев на среде $\frac{1}{2}$ МС + БАП 0,1 мг/л + НУК 0,5 мг/л, при температуре $+ 10 \pm 2$ °С, освещении 1 000 люкс, фотопериоде 16/8 часов.

5. Определена эффективность ISSR праймеров для оценки генетической стабильности сортов лимона в процессе хранения *in vitro*. У сортов Новоафонский, Бесколючий и Ударник не было выявлено генетических отклонений после 6-12 месяцев хранения *in vitro*.

6. Разработан и рекомендован для практического применения протокол поддержания депонированной коллекции лимона в культуре тканей.

**Рис. 10. ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА
микроразмножения и сохранения *Citrus limon* (L.) Burm. в условиях *in vitro***



Список работ, опубликованных по теме диссертации.

1. Samarina, L. S. Regeneration and micropropagation of lemon cultivars *in vitro* from nodal explants / L. S. Samarina [et al.] // Russian Agricultural Science – 2010. – 36(6). – P. 417-420.
2. Самарина Л. С. Биотехнология цитрусовых культур: достижения и перспективы (обзор) / Л. С. Самарина, Т. М. Коломиец, В. М. Горшков // Садоводство и виноградарство. – 2011 г. – № 6. – С. 27-30.
3. Самарина, Л. С. Оценка регенерационной способности эксплантов цитрусовых *in vitro* / Л. С. Самарина, Т. М. Коломиец, В. М. Горшков // Садоводство и виноградарство. – 2011. – Вып. 24, № 6. – С. 23-26.
4. Самарина Л. С. Идентификация размноженных *in vitro* сортов лимона и регенерантов семядолей с помощью ISSR маркеров / Л. С. Самарина, Е. К. Потокина // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2013. – № 1. – С. 39-41.
5. Самарина, Л. С. Особенности микроразмножения *C. limon* в условиях *in vitro* / Л. С. Самарина, Т. М. Коломиец // Материалы IX молодежная научная конференция «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». – ВНИИ СБ, Москва – 2009. – С. 25-26.
6. Горшков В. М. Экологические и биологические особенности основных видов рода *Citrus* для промышленного возделывания / В. М. Горшков, Л. С. Самарина, Т. М. Коломиец // Субтропическое и южное садоводство России. – 2009. – Т. 2. – С. 250-255.
7. Самарина, Л. С. Регенерация лимона *in vitro* из стеблевых почек и нуцеллярных зародышей / Л. С. Самарина, Т. М. Коломиец // Сб. тез. IV науч.-практ. конф. молодых ученых «Научное обеспечение АПК». – Краснодар, 2010 г. – С. 220-222.
8. Горшков, В. М. Последствия погодных стрессов для цитрусовых культур на примере *Citrus unshiu* Marc. в прибрежно-черноморской зоне субтропиков / В. М. Горшков, Л. С. Самарина, Т. М. Коломиец // Сб. тез. Всероссийский симпозиум «Растение и стресс», Москва, 2010. – С. 115-116.
9. Самарина, Л. С. Медленнорастущие коллекции *in vitro* как способ сохранения цитрусовых культур в российских субтропиках / Л. С. Самарина, Т. М. Коломиец // Сб. тез. Всероссийский симпозиум «Растение и стресс», Москва, 2010. – С. 311-312.
10. Самарина, Л. С. Микроклональное размножение цитрусовых культур и их подвоев / Л. С. Самарина, Т. М. Коломиец, Н. С. Налбантова // Сб. тез. VI науч.-практ. конф. молодых ученых «Научное обеспечение АПК». – Краснодар, 2012 г. – С. 51-53.

11. Самарина, Л. С. Разработка приемов культивирования цитрусовых *in vitro* / Л. С. Самарина, Т. М. Коломиец, Н. С. Налбантова // Сб. трудов ГНУ ВНИИЦиСК Россельхозакадемии. – 2012. – Вып. 46. – С. 175-179.

12. Samarina, L.S. *In vitro* conservation of *Citrus limon* (L.) Burm. / L.S. Samarina, [et al.] // Biological Agriculture & Horticulture, UK (in press).

Благодарности. Автор выражает особую благодарность своему научному руководителю кандидату с.-х. наук Коломиец Татьяне Михайловне, за неоценимую помощь в написании диссертации и в достижении результатов. Также отдельная благодарность за оказанные содействие и консультативную помощь в выполнении данной работы д.с.-х.н. Горшкову В.М., к.б.н. Карпун Н.Н., к.б.н. Гутиевой Н.М., д.б.н. Малюковой Л.С., д.с.-х.н. Бесединой Т.Д., к.б.н. Малярской В.И., к.б.н. Слепченко Н.А., д.с.-х.н, чл.-корр. Россельхозакадемии Рындиной А.В., и другим сотрудникам ГНУ ВНИИЦиСК Россельхозакадемии. Отдельная благодарность сотрудникам ФГБУН Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева к.б.н. Бургутину А.Б., к.б.н. Моисеевой Н.А. за детальное изучение работы, ценные замечания и оказанную консультативную помощь, а также сотрудникам РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева к.б.н. Чередниченко М.Ю., д.б.н. Соловьеву А.А., д.б.н. Карлову Г.И. Автор выражает отдельную благодарность оппонентам д.б.н. Калашниковой Е.А. и к.б.н. Молкановой О.И. за детальное изучение работы и ценные замечания.

Отдельное спасибо автор адресует к.б.н. Потокиной Е.К. и сотрудникам лаборатории мониторинга генетической эрозии растительных ресурсов ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова за помощь в проведении ISSR анализа.