

XXXVI краевой конкурс исследовательских работ учащихся
в области естественно-математических,
социально-гуманитарных и эколого-биологических наук

Секция: Биология

Тема: Изучение особенностей бесполого размножения растений
вида *Streptocarpus Hybrida*

Автор: Сарычева Елизавета Юрьевна

Научный руководитель: кандидат биологических наук
учитель высшей категории
Елтышева Ирина Валерьевна

Научный консультант:
зав. отделом Учебного ботанического сада ПГНИУ,
Черткова Марина Анатольевна

Место выполнения работы: г. Пермь

2015-2016

Оглавление

	стр.
Введение	3
Глава 1. Обзор литературы	
§1. Характеристика растений рода <i>Streptocarpus</i>	4
§2. Сорты растений рода <i>Streprocarpus</i>	4
§3. Способы бесполого размножения цветковых растений	5
Глава 2. Объекты и методы исследования	7
Глава 3. Результаты исследования	
§1. Особенности микрклонального размножения (in vitro) растений <i>Streprocarpus</i> сорта <i>Hototogisu</i>	10
§2. Особенности вегетативного размножения (фрагментацией листа) растений <i>Streptocarpus</i> сортов <i>Пушэлье</i> и <i>Samba</i>	11
Выводы	12
Список литературы	13
Приложение	14

Введение

Стрептокарпус — цветущее травянистое растение. На сегодняшний день существует множество вариаций окраски цветков стрептокарпуса, что позволяет использовать его в декоративных целях. В последнее время популярность различных сортов стрептокарпуса неизменно растет, поэтому появилась потребность размножения стрептокарпусов в промышленном объеме. Для решения этой проблемы на помощь приходят современные методы биотехнологии, культуры растительных клеток и тканей.

Методы вегетативного и микроклонального размножения широко используются в сельском хозяйстве, промышленном цветоводстве, а также для сохранения редких и исчезающих видов растений. Метод микроклонального размножения так же позволяет решить ряд технических проблем, таких как массовое размножение оздоровленных растений или получение сортовых линий.

Цель работы: изучить особенности бесполого размножения растений вида *Streptocarpus hybrida*.

Задачи:

1. Изучить и освоить методики микроклонального и вегетативного размножения (фрагментацией листа).
2. Оценить эффективность и подобрать оптимальный вариант размножения для различных сортов *Streptocarpus Hybrida*.
3. Выработать рекомендации по применению различных способов бесполого размножения для восстановления коллекции *Streptocarpus Hybrida* в ботаническом саду ПГНИУ г. Пермь.

Глава 1. Обзор литературы

§1. Характеристика растений рода *Streptocarpus*

Streptocarpus — многолетник, принадлежащий к семейству геснериевых. Представляет собой красивоцветущее травянистое розеточное растение. При созревании семенных коробочек происходит их скручивание, отсюда название — (в переводе с греческого streptos - “скрученный», karpos - “коробочка”). Растение имеет короткий стебель, сильно опушенные листья широко-ланцетной формы. Цветки растут по одному или по паре из листовых пазух. Само растение по происхождению с Южной Африки и Мадагаскара. Там, в зоне тропического и субтропического климата, произрастает около 100 природных видов стрептокарпусов.

§2. Сорты растений рода *Streptocarpus*

Ниже представлены наиболее популярные среди цветоводов, яркие и запоминающиеся сорта стрептокарпусов.

1. *Streptocarpus Persian Carpet* (рис.1, приложение)

Растение, имеющее крупные ярко-синие (кобальтовые) цветы с серебристыми точками из белого горлышка с желтыми полосками, образующие сеточку по всей поверхности цветка. Поверхность листа достаточно сильно опушена.

2. *Streptocarpus Renia* (рис. 2, приложение)

Растение, с нежно-розовым окрасом цветов, размером 5,5 см. Особенность окраски состоит в том, что верх цветка светло-розовый, а низ желтый с лиловым обрамлением и красными полосками. Листья довольно мясистые, эллиптической формы.

3. *Streptocarpus Wendy (Dibley)* (рис. 3, приложение)

Один из самых крупноцветковых среди чисто белых сортов стрептокарпусов. Листья имеет светло-зеленую окраску, слабо опушены. На одном цветоносе могут располагаться более 5 цветков.

4. *Streptocarpus Rexii* (рис. 4, приложение)

Растение с розеткой продолговатых листьев. Листья с зубчатым краем, опушенные, темно-зеленого цвета. Цветки на высоких цветоносах около 2,5 см в диаметре, Венчик цветка воронковидной формы, пятилепестной, светло-лилового цвета с пурпурными полосками.

5. *Streptocarpus Kika* (рис. 5, приложение)

Растение с миндалевидными махровыми листьями. Цветки на высоких цветоносах около 2,5 см в диаметре, с белыми верхними лепестками, нижние желтые лепестки расчерчены насыщенным малиновым венозным рисунком.

6. *Streptocarpus Hototogisu* (рис.1) - растение японской селекции, селекционер не известен. *Hototogisu* в переводе с японского означает «Кукушка малая». Крупный розово-сиреневый цветок, усыпанный точками и темно-фиолетовыми штрихами, с волнистыми удлинёнными лепестками с тонкой светлой окантовкой. Ценится своей необычной формой — орхеевидной, поэтому предоставляет хороший спрос на рынке. По проведенным ранее исследованиям, этот сорт наиболее приспособлен к микроклональному размножению.

7. *Streptocarpus Samba* - сорт, выведенный селекционером П. Клецыньски. Имеет синечерные цветки с жилкованием, практически черного цвета. Края обрамлены каймой по краю лепестков. Размер цветков примерно 4,5 см (рис.2).

8. Селекционер сорта *Streptocarpus Ришелье* неизвестен. Растение не превышает 30 см. Имеет темно-фиолетовые цветы с черной махровой окантовкой. Листья темно-зеленые, достаточно сильно опушены (рис.3).

§3. Способы бесполого размножения цветковых растений

Важно сохранять фенотипические признаки определенных сортов растений. Для дальнейшего культивирования в данном случае лучше использовать бесполое размножение.

Бесполое размножение — это размножение, в котором участвует только одна родительская особь. Происходит без слияния гамет. Существуют несколько способов бесполого размножения у растений: размножение делением, размножение спорами, вегетативное размножение, фрагментация (частями листа), микроклональное размножение.

Вегетативное размножение растений — это образование новой особи из многоклеточной части тела родительской особи. Наиболее широко распространено у семенных растений вегетативное размножение посредством подземных побегов (корневищ, луковиц, клубней), наземных ползучих и укореняющихся побегов.

Вегетативное размножение позволяет быстро расселяться растениям на новой территории. А при затруднении семенного размножения вегетативный способ размножения является единственным. Например, ландыш, сныть и земляника, растущие в тени, практически не цветут и не образуют семян.

Микроклональное размножение — это использование техники *in vitro* для быстрого неполового получения растений, идентичных исходному. Большим преимуществом этого размножения являются значительно более высокие коэффициенты размножения, миниатюризация процесса, приводящая к экономии площадей, занимаемых размножаемыми растениями.

Особенно важно, что микроклональное размножение часто оздоравливает растения от грибных и бактериальных патогенов, вирусов и других инфекций (Бутенко, 1999). Стоит отметить еще одно преимущество клонального микроразмножения — в технологии *in vitro* размножаются и укореняются растения, которые совсем не размножаются или плохо размножаются в обычных условиях.

Основные модели размножения растений микроклональным способом:

- Получения каллуса с последующей индукцией органогенеза или соматического эмбриоидогенеза;
- Индукция развития побегов или соматических эмбриоидов непосредственно из ткани экспланта;
- Пролиферация пазушных побегов.

Сам процесс клонального микроразмножения можно разделить на несколько этапов:

1. Выбор растения-донора, изолирование и стерилизация экспланта, создание условий для его роста на питательной среде *in vitro*.
2. Собственно микроразмножение, цель которого - получение максимального количества меристематических клонов.
3. Укоренение размноженных побегов и адаптация пробирочных растений к условиям *in vivo*.
4. Выращивание извлеченных из культуральных сосудов растений в условиях теплицы в почве или искусственном субстрате. Подготовка к реализации или высадке на открытый грунт.

Глава 2. Объекты и методы исследования

Исследование и размножение растений вида *Streptocarpus hybrida* проводили в лаборатории биотехнологии растений Учебного ботанического сада ПГНИУ в период с октября 2014 г. по ноябрь 2015 г.

В ходе исследования изучено бесполое размножение сортов *Streptocarpus hybrida*, которые имелись в коллекции учебного ботанического сада ПГНИУ:

- *Streptocarpus Hototogisu* (рис. 1)
- *Streptocarpus Samba* (рис. 2)
- *Streptocarpus Ришелье* (рис.3)



Рис.1. Сорт *Streptocarpus Hototogisu*



Рис.2. Сорт *Streptocarpus Samba*



Рис.3. Сорт *Streptocarpus Ришелье*

Для микроклонального размножения использовались предварительно выбранные части листа. Сам лист проходил несколько ступеней стерилизации перед последующей высадкой на питательную среду. Стерилизация посадочного материала проводилась с целью обеззараживания поверхностных тканей органов растений от бактерий, грибов и их спор. Способы стерилизации представлены в таблице 1 (приложение).

Простерилизованные экспланты высаживались в пробирки в твердую питательную среду с минеральной основой по Т. Murashige и F. Skoog (МС) (табл. 2, приложение), витаминами по Р.Г. Бутенко, 3% сахарозой, 0,7% агар-агаром. В процессе приготовления питательной среды сначала разогревался агар-агар (рис.4), далее добавлялись остальные добавки и витамины С, В1, В6, РР.



Рис.4. Подготовка питательной среды

С под давлением 2 атмосферы в течение 30 минут (рис. 5). Стерилизацию культуральных сосудов, инструментов и оборудования осуществляли так же в автоклаве.



Рис.5. Стерилизация питательной среды в автоклаве

Процесс высадки эксплантов на питательную среду производили в ламинар-боксе в соответствии с правилами работы со стерильным материалом (рис. 6).



Рис.6. Ламинар-бокс перед высадкой эксплантов

После высадки эксплантов на питательную среду пробирки делились на две группы и помещались в разные условия содержания с целью выявления наиболее оптимальных для культивирования. Первая группа пробирок содержалась при 24-х часовом фотопериоде при температуре +30°C под флуоресцентными лампами (вариант 1). Вторая группа пробирок находилась при 12-ти часовом фотопериоде при температуре +22°C (вариант 2). Через 10-14 дней после пассажа материал, имеющий признаки инфицирования, выбраковывали. Через 2 месяца вычисляли отношение числа стерильных объектов к общему числу подвергнутых стерилизации.

Вегетативное размножение растений осуществляли методом фрагментации листа. Иссечение листа материнского растения выполнялось вдоль главной жилки. Сама жилка впоследствии удалялась, оставшиеся фрагменты листа первично сажались в два контейнера из почвосмеси из торфа и перлита. Перлит добавлялся в качестве инертной высокоэффективной разрыхляющей добавки в почву, для улучшения ее структуры, воздухо- и влагообмена.

В первый контейнер высаживались фрагменты материнского листа с предварительной обсыпкой срезанной части биостимулятором - «Корневин». Его применяют на растениях с целью симуляции образования корней на черенках различных культур (как декоративных и цветочных, так ягодных и плодовых). Обработка корневинном способствует более быстрому укоренению черенков и саженцев, а также повышает приживаемость растений после пересадки или при размножении делением. Во второй контейнер высаживались фрагменты листа без какой-либо предварительной обработки (рис.7).



Рис.7. Посадка фрагментов листа

Спустя месяц после посадки, из материнского листа начали произрастать дочерние растения (рис. 8-9). Сам лист постепенно отмирал. Еще через 2 месяца молодые растения имели уже полностью сформировавшуюся корневую систему и листья длиной до 15 см. Затем новые побеги пересаживались в отдельные горшки из почвосмеси торфа и дробленого кокоса для дальнейшего роста и укоренения в качестве самостоятельных растений (рис.10). На дно горшка засыпался дренаж для оттока влаги из почвы, чтобы предотвратить загнивание корневой системы при чрезмерном поливе.

Рассчитывали процент эффективности бесполого размножения как отношение количества дочерних растений к количеству высаженных фрагментов материнского листа.



Рис. 8-9. Появление и развитие новых растений



Рис.10. Рассаживание молодых растений

Глава 3. Результаты исследования

§1. Особенности микроклонального размножения (in vitro) растений

Streptocarpus сорта *Hototogisu*

По результатам исследований микроклонального размножения стрептокарпусов, проведенных в 2014 году (Ступникова А.С.), было выявлено, что наибольшая выживаемость эксплантов характерна для сортов *Hototogisu* и *Valor*. В связи с этим в 2015 году была поставлена задача продолжить исследование особенностей микроклонального размножения этих сортов. Однако, растения сорта *Valor* впоследствии погибли, и работа продолжась с сортом *Hototogisu*.

Определяющую роль на начальном этапе микроклонального размножения играет схема стерилизации культуры, а так же условия содержания. Учет проводился спустя 2 месяца, после высадки эксплантов на питательную среду. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Выживаемость эксплантов при различных условиях культивирования

Объект	Схема стерилизации	% выживших эксплантов	
		вариант 1	вариант 2
<i>Hototogisu</i>	I	25	0
	II	25	36
	III	11	30
	IV	0	0
	V	33	25
	VI	0	0

Таким образом, гибель всех эксплантов произошла на средах, стерилизованных по схемам IV, VI. Наибольший процент выживших эксплантов характерен для сред, стерилизованных по схемам: II, V. При схемах стерилизации I и V процент выживших эксплантов выше при первом варианте культивирования (24-х часовой фотопериод при температуре +30° С под флуоресцентными лампами), при схемах стерилизации II, III процент выживаемости эксплантов выше при втором варианте (12-ти часовой фотопериод при температуре +22° С).

§2. Особенности вегетативного размножения (фрагментацией листа) растений *Streptocarpus* сортов *Пишелье* и *Samba*

По результатам вегетативного размножения наибольшее количество новых растений дал сорт *Samba*. Из 8-ми фрагментов материнских листов взрослого растения были получены 3 дочерних растения при использовании корневища, из других 8-ми фрагментов были получены еще 3 дочерних растения без использования корневища. Процент эффективности вегетативного размножения составил 37,5 % как с использованием корневища, так и без него.

Сорт *Пишелье* из 8-ми материнских листов дал 2 новых растения без использования корневища, на среде с корневищем посадочный материал не дал дочерних побегов. Таким образом, процент эффективности вегетативного размножения составил 25 % и 0 %.

К сожалению, к моменту постановки эксперимента крупных растений сорта *Hototogisu* не оказалось в наличии, так они были использованы для изучения микрклонального размножения.

Выводы

1. Для клонирования растений *Streprocarpus* сорта *Hototogisu* стерилизацию сред лучше проводить по схемам: II, V (с использованием лизоформина). Гибель всех эксплантов происходит на средах, стерилизованных по схемам IV, VI.
2. Процент эффективности вегетативного размножения (фрагментацией листа) оказался выше для растений *Streprocarpus* сорта *Samba*, чем для растений сорта *Ришелье*.
3. Для вегетативного размножения растений *Streprocarpus* сорта *Ришелье* фрагментами листа не является эффективной обработка посадочного материала биостимулятором «Корневин».

Список литературы

1. Бутенко Р.Г., Клеточные технологии для получения экономически важных веществ растительного происхождения // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 3–20.
2. Бутенко Р.Г., Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. С. 23-27.
3. Высоцкий, В.А. Клональное микроразмножение растений // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986. С. 91-102.
4. Тугуда А. «Размножение растений». М.: АСТ, 2005. С. 47-56.
5. Ступникова А.С. Изучение микроклонального размножения растений вида *Streptocarpus hybrida*. Пермь: УИР, 2014. С. 22.
6. Конспект лекций по дисциплине «Биотехнология растений» для студентов специальности 050701 «Биотехнология» очной формы обучения. Павлодар, 2009 год. С. 8
7. Сорокина И.К. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учебное пособие. Саратов: рекомендовано к изданию УМК биологического факультета СГУ им. Н.Г.Чернышевского. 2002. 34с.
8. <http://biofile.ru/bio/16215.html>
9. http://knowledge.allbest.ru/biology/2c0a65625a3bc79b4d43a89421316c37_0.html
10. <http://biofile.ru/bio/4630.html>
11. <http://www.do.gendocs.ru/docs/index-11580.html?page=3>

Приложение

Рис.1-6. Некоторые сорта рода *Streptocarpus*

Рис.1 Streptocarpus Persian Carpet

Рис.2 Streptocarpus Renia



Рис. 3 Streptocarpus Wendy (Dibley)

Рис. 4 Streptocarpus Rexii



Рис. 5 Streptocarpus Kika

Схемы стерилизации растений *Streptocarpus hybrida*

Схема	Описание
I	20 мин мыльный раствор, 10 мин проточная вода, 10 мин белизна 3,5%, 3-х кратная промывка в стерильной дистиллированной воде
II	20 мин мыльный раствор, 10 мин проточная вода, 10 мин лизоформин 2,5%, 3-х кратная промывка в стерильной дистиллированной воде
III	20 мин мыльный раствор, 10 мин проточная вода, 10 мин лактосепт 0,5%, 3-х кратная промывка в стерильной дистиллированной воде
IV	20 мин мыльный раствор, 10 мин проточная вода, 2 с этанол 70%, лактосепт 1% 10 мин, 5-ти кратная промывка в стерильной дистиллированной воде
V	20 мин мыльный раствор, 10 мин проточная вода, 2 с этанол 70%, лизоформин 2,5% 10 мин, 5-ти кратная промывка в стерильной дистиллированной воде
VI	20 мин мыльный раствор, 10 мин проточная вода, 2 с этанол 70%, белизна 3,5% 10 мин, 5-ти кратная промывка в стерильной дистиллированной воде

Состав питательной среды по Т. Murashige и F. Skoog (МС)

Название соли	Концентрация
Макросоли (г/л)	
KNO_3	38
NH_4NO_3	33
KH_2PO_4	3,4
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	7,4
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8,8
Микросоли (мг/100мл)	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	25
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
H_3BO_3	620
$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	2410
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2230
KI	83
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	2,5
FeSO_4	557
Na_2 -ЭДТА	745