

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение
«Средняя общеобразовательная школа № 68 г. Челябинска
имени Родионова Е.Н.» (филиал 2)

Челябинская область
Челябинский городской округ
МБОУ «СОШ № 68 г. Челябинска» (филиал 2)

Номинация «Биотехнология»
2 возрастная группа (15-18 лет)

Тема работы:
Микроклональное размножение «in vitro»
орхидеи Фаленопсис

Автор:
Воронцова Дарья Игоревна,
МБОУ «СОШ № 68 г. Челябинска»
(филиал 2), класс 9
Научный руководитель:
Рудакова Татьяна Михайловна,
педагог дополнительного образования
МБОУ «СОШ № 68 г. Челябинска»
(филиал 2)

Челябинск, 2020 г.

Оглавление

Введение.....	3
I. Теоретическая часть.....	4
1.1 Историческая справка о методе культуры клеток <i>in vitro</i>	4
1.2 Основы микрклонального размножения растений.....	4
II Практическая часть.....	5
2.1 Микрклональное размножение <i>in vitro</i> орхидеи Фаленопсис.....	5
Заключение.....	9
Список литературы.....	10
Приложение	11

Введение

В последнее время цветочные магазины предлагают большой ассортимент комнатных цветов – от самых заурядных до редчайших разновидностей. Одним из самых популярных цветов является орхидея. Она привлекает внимание покупателей своей нежной и хрупкой красотой, большим разнообразием оттенков. И, наверное, каждый ее ценитель мечтал когда-нибудь вырастить это чудо самостоятельно. В оранжерее мы узнали, что большинство привезенных на продажу орхидей Фаленопсис выращено методом «*in vitro*», так как их вегетативное размножение затруднено.

Термином «микроразмножение» называют методы размножения растений в лабораторных или искусственно созданных условиях. Проще говоря, культуру размножают «*in vitro*», т.е. «в пробирке». В основе метода лежит уникальная способность каждой растительной клетки давать начало новому растению. Достаточно взять образец ткани с определенных участков растения-маточника (растение с ценными признаками, которое необходимо размножить) и поместить в стерильные условия на питательную среду. Из него получают микроскопическое, генетически идентичное исходному экземпляру, растение, которое позже разовьется в нормальный отросток и который можно вернуть в условия естественного произрастания.

Актуальность данного проекта состоит в том, что способ клонального микроразмножения позволяет быстро размножить любое растение, даже если у вас есть не только один экземпляр, а лишь один лист редкого сорта.

Цель работы: получить растения-регенеранты орхидеи Фаленопсис методом *in vitro*.

Объект – орхидея Фаленопсис *Orchidaceae Phalaenopsis*.

Предмет – экспланты, полученные из орхидеи Фаленопсис.

Для достижения поставленной цели определены следующие *задачи*:

- 1) проанализировать литературные и Интернет-источники по теме исследования;
- 2) подобрать методику клонального микроразмножения орхидеи, включающую подбор концентрации стерилизующих агентов, состава среды, условий культивирования эксплантов;
- 3) провести все этапы микроклонального размножения орхидеи Фаленопсис;
- 4) обобщить полученные данные.

Для решения поставленных задач были использованы следующие *методы*: анализ теоретического материала, математические расчеты, эксперимент, наблюдение, сравнительный анализ, обобщение и систематизация.

Практическая значимость проекта состоит в том, что методом микроклонального размножения можно получить за короткий срок трудно размножающиеся культуры, в том числе и орхидеи Фаленопсис, что позволяет снизить себестоимость посадочного материала

I Теоретическая часть

1.1 Историческая справка о методе культуры клеток *in vitro*

Идеи о возможности культивирования кусочков ткани и отдельных клеток в искусственной среде (*in vitro*, «в пробирке») впервые возникли на рубеже XIX и XX веков, но, чтобы воплотить их в жизнь, потребовалось много экспериментов. Самые ранние работы по изолированию культур принадлежат Блочишевскому (1876 г.), Брауну и Моррису (1892 г.), Боннэ, Саксу (1893 г.). В этих исследованиях зародыши вычленились из семени и выращивались в искусственных условиях. Первым исследователем, занявшимся установлением минимального размера экспланта, был *Карл Рехингер* (1893 г.). Он выращивал тонкие срезы корня свеклы и одуванчика и сегменты стебля тополя на песке с применением водопроводной воды, без стерильных условий. Эти исследования показали, что каллус образуется при толщине среза не менее 1,5 мм [1]. В 1922 году один из учеников Рехингера *Коттэ* начал эксперименты с лишенными пигментов меристематическими тканями – изолированными кончиками корней, и добился успеха. Практически одновременно и независимо от Коттэ *Роббинс* подобрал состав питательной среды, обеспечивающий в культуре рост апикальной меристемы корня томатов и кукурузы. Эти опыты положили начало культивированию изолированных органов растений на питательных средах.

Способность культур растительных тканей к неограниченному росту в 30-е годы показал французский исследователь *Роже Готре* и независимо от него – американец *Филипп Уайт*. Как известно, культура каллусной ткани моркови, полученная Готре, сохранила жизнеспособность до наших дней (Приложение 1).

Период 1940-1960 гг. значительно расширил список видов, выращиваемых *in vitro*. Были разработаны составы питательных сред, изучено значение микро- и макроэлементов для поддержания нормальной ростовой активности тканей, определено влияние витаминов и стимуляторов роста. Изучением этих вопросов занимались такие учёные, как Р. Хеллер, И. Нич, Ф. Скуг, Ф. Стевард [2].

Начиная с 1976 года, разрабатывались методы электрослияния протопластов и селекции гибридных клеток, культивирования гаплоидных клеток и получения новых форм и сортов сельскохозяйственных растений. Ведутся работы по переносу генов в растительные клетки и получению трансгенных растений [1].

1.2 Основы микрклонального размножения растений

Термин «клон» был предложен в 1903 году Уэбстером (от греческого *klon* – черенок или побег, пригодный для размножения растений). В соответствии с научной терминологией *клонирование* подразумевает получение идентичных организмов из единичных клеток [2].

В основе культивирования растительных клеток лежит свойство *тотипотентности*, благодаря которому соматические клетки растения способны полностью реализовать наследственную информацию, то есть обеспечить развитие всего растения. Изменяя условия (добавляя в состав питательной среды те или иные гормоны), можно вызвать дифференциацию недетерминированных

клеток. Основным типом культивируемой растительной клетки является *каллус*. Каллусная ткань – один из видов клеточной дифференцировки, возникает путем неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток органов растения. У растений в природе каллусная ткань возникает в исключительных обстоятельствах (например, при травмах) и функционирует непродолжительное время. Эта ткань защищает место поранения, может накапливать питательные вещества для анатомической регенерации или регенерации утраченного органа.

Образование каллуса не всегда связано с травматическим воздействием. Каллус может возникнуть и в результате пролиферации внутренних тканей экспланта без связи с поверхностью среза из-за нарушения гормонального баланса. Для получения культивируемых каллусных клеток фрагменты тканей различных органов высших растений – корней, листьев, стеблей, пыльников, зародышей (экспланты) помещают на искусственную среду, содержащую ауксины, в пробирки, колбы, чашки Петри (*in vitro*) [5].

Основной метод, использующийся при клональном микроразмножении растений – *активация развития уже существующих в растении меристем*. Часто в качестве экспланта используют верхушечные или пазушные почки, которые изолируют из побега и помещают на питательную среду с цитокининами. Образующиеся пучки побегов делят, при необходимости черенкуют и переносят на свежую питательную среду. После нескольких пассажей, добавляя в питательную среду ауксины, побеги укореняют *in vitro*, а затем переносят в почву, где создают условия, способствующие адаптации растений (Приложение 2).

Выращивать новые растения из культуры клеток (такие растения называют *регенерантами*) можно различными способами. Если из каллуса развиваются органы растения – корни или побеги, а из побега, в свою очередь, вырастает целостное растение, то говорят об органогенезе. Одна из возможных схем – микропобеги укореняют в растворе или среде с ауксином, а когда корневая система становится достаточно развитой, маленькое растение извлекают пинцетом или специальным крючком и высаживают в простерилизованный грунт. Этот сценарий напоминает вегетативное размножение в природе (Приложение 2) [2].

Итак, клональное микроразмножение – это возможность получать генетически однородный и свободный от инфекций посадочный материал, причем быстро, в огромном количестве при небольших затратах, независимо от сезона, и метод подходит даже для тех растений, которые плохо размножаются обычными способами. В производстве цветов сейчас лидирует Голландия, которая практически отказалась от традиционных технологий и получает посадочный материал *in vitro*.

II Практическая часть

2.1 Микрклональное размножение *in vitro* орхидеи Фаленопсис

Большинство орхидей занесены в Красную книгу (Приложение 3). Нельзя просто так пойти и накопать их. Так, правда, еще делают в странах Ближнего Востока, Пакистане, Турции (для изготовления горячего напитка под названием салеппе), поскольку в тех странах еще сохранились многочисленные популяции

этих растений, но и там уже экологи бьют тревогу. Чтобы в природе появилась орхидея, нужно, чтобы в месте, где находится семя, оказался определенный гриб. Рост начинается в результате симбиоза. В противном случае семя просто не прорастает, поэтому орхидеи относятся к трудноразмножающимся культурам [4].

Принципиальную возможность клонального микроразмножения впервые показал на орхидеях французский ученый *Жорж Морель* (1960 г.). Из одного *протокорма* – шарообразной структуры, которая образуется после прорастания семени орхидеи, – за год он получил миллионы растений. Культивируя в стерильных условиях верхушку побега орхидеи, размером всего 0,5 мм, он наблюдал формирование сферических структур, напоминающих видоизмененные почки. Эти структуры можно было делить, подрачивать на искусственной питательной среде, опять делить и получать из них целые растения. Французские фирмы, занимающиеся разведением орхидей, использовали этот метод, и очень скоро орхидеи из мериклонов появились на цветочном рынке в огромном количестве, превратив орхидею из дорогого и редкого цветка в широко распространенное растение. В нашей стране в Ботаническом саду ННГУ одна из самых больших коллекций орхидей в стране [3].

Многие орхидеи, такие, как *Cattleya*, имеют симподиальный рост и, следовательно, легко могут быть разделены. Другие орхидеи, *Phalaenopsis*, – моноподиального роста и не могут быть разделены и размножены вегетативно (Приложение 4). Гибридизаторы экспериментировали годами, ища эффективные способы воспроизведения орхидей *Фаленопсис* и клонирование совершенных гибридов.

Материалы и оборудование для проведения эксперимента: дезинфицирующие растворы, дистиллированная вода и резиновые перчатки. Дезинфицирующий отбеливатель (9-11%-ный гипохлорит натрия), разведенный в дистиллированной воде до 5%-ной концентрации, используют для стерилизации рабочей поверхности, после чего промывают ее дистиллированной водой. 1-2%-ный раствор служит для дезинфекции микрочеренков, которые затем обмывают дистиллированной водой. На всех этапах работать следует в хирургических перчатках. Для получения микрочеренков определенных размеров можно применять обычные лезвия для безопасной бритвы; в качестве посадочных рабочих емкостей (у нас их 7 штук) используют стеклянные сосуды с широким горлышком и притертой крышкой (Приложение 5).

Субстраты, стимуляторы роста и специальные удобрения. Субстрат, обычно используемый для микроразмножения, – агар-агар – лучший природный гелеобразователь, получаемый из красных морских водорослей. К субстрату (питательной среде) добавляют антибиотики (мы использовали тетрациклин), гормоны (в качестве ауксина – гетероауксин, цитокинина – цитокининовую пасту) и удобрения. Уже готовые среды (мы купили среду Мурасиге-Скуга) можно найти в аптеках или на фирмах, продающих химические вещества для медицинского использования. Полученные растения – всходы высаживают в торфяной почвогрунт с рН 5.5 (мы купили готовый грунт для орхидных) [6].

Начало эксперимента – март 2018 года. Лучше начинать эксперимент весной, так как освещение в помещении должно быть не менее 12 часов в сутки (Приложение 5).

Этапы микроклонирования орхидеи Фаленопсис

Стерилизация является наиболее важным шагом во всей этой процедуре!

1. Прежде всего, надо подготовить среду для роста. Мы воспользовались готовой питательной средой Мурасиге-Скуга (расчеты вели на 1 л среды). Отварить смесь, добавить в нее антибиотики (тетрациклин, в концентрации 100 мг/л, т.е. 1 таблетку, чтобы подавить размножение бактерий), гормоны (гетероауксин 0,5 мг/л и цитокининовую пасту 1 мл/л), а затем в горячем виде влить в подготовленные простерилизованные банки (вливать субстрат на 5-7 см глубины) и опять стерилизовать. Для стерилизации банок можно приспособить обычную кастрюлю с кипящей водой или прогреть в духовке не менее получаса при температуре в 90-100°C.

2. Прежде чем поместить в подготовленные банки растения, нужно пройти контроль стерильности, так как без осуществления данного мероприятия экспланты могут быть уничтожены вредными микроорганизмами. После заполнения банок субстанцией (субстратом), их плотно закрывают притертыми крышками, ставят на контроль в течение 4-5 суток. Если внутри содержатся споры микроскопических грибов, то за эти дни они образуют колонии (плесень). Такой субстрат для использования не годится. Придется все повторить с самого начала. В нашем эксперименте не прошли контроль стерильности 2 банки из 7 (для них мы повторили все процедуры сначала).

3. Для дезинфекции инструментов приготовить смесь из 3 частей воды, 1 части отбеливателя (хлорки) и пары капель мыла. Добавить эту смесь в прямоугольный пластиковый лоток и заполнить распылитель. Поместить подготовленные пробки, щипцы, зубную щетку, бритвенные лезвия в дезраствор.

4. Подготовить еще одну смесь для обработки растения: 9 частей воды, 1 часть хлорки, 2 капли мыла. Добавить эту смесь в лоток. Поместить отрезанный цветонос в подготовленный лоток с раствором отбеливателя. Аккуратно почистить стебель снизу доверху простерилизованной мягкой зубной щеткой. Если щетка будет слишком жесткая – вы повредите спящие почки. Положить цветонос обратно в лоток.

5. Отрезать цветонос на 1 см сверху и снизу у каждой почки под углом стерильной бритвой. Аккуратно удалить прикрывающую чешуйку зародыша в почке.

6. Поместить подготовленные почки в лоток с отбеливателем (на 15-20 минут).

7. Вынуть почки из контейнера и отрезать примерно 3 мм от края стебля.

8. Воспользовавшись пинцетом, поместить почки в банки так, чтобы зародыш касался среды. Для снижения вероятности заражения, помещайте в одну банку только одну почку. Все действия выполняются предельно быстро. Ставим банки в теплое (22-25°C) и светлое место (но не под прямые лучи). Каждый день просматривайте банки и если не заметили никаких помутнений, то все прошло на

высшем уровне. На этом этапе из 7 ростков осталось 3 (остальные были заражены грибком).

9. Когда листья станут длиной 1,5-2 см и корни 3-4 см (в нашем эксперименте это произошло в середине июля), выньте маленькие растения из банок предельно аккуратно при помощи щипцов, промойте в воде от смеси и выдержите микропобеги в течение нескольких часов (2-24 ч) в стерильном концентрированном растворе гетероауксина (20 мг/л). После этого пересадите их в отдельные горшочки или общую емкость (готовят субстрат, состоящий из сфагнового мха, смеси торфа, листьев бука или дуба, сосновой коры или покупают готовый, который проходит нагревание в сушильном шкафу 30 мин при температуре 90-100°C). Сверху накройте контейнером. После посадки молодым росткам необходимо создать особые условия – подсветку и высокую влажность (опрыскивание).

10. После того, как листья вырастут на 4-5 см, растение необходимо перенести в нестерилизованный грунт, где ухаживать соответствующим образом до полного вырастания во взрослое растение. Через 20-30 дней после посадки растения подкармливают комплексным минеральным удобрением. При правильном и своевременном уходе орхидея начнет цвести только через 2-3 года, но время компенсируется необычайной красотой и оригинальностью цветков.

Итог – 3 клонированных растения.

Заключение

Проведенные нами лабораторные эксперименты подтвердили: целое растение можно вырастить из крохотного кусочка ткани *in vitro* – в пробирке или колбе в стерильных условиях на питательной среде. Эксплантом, то есть родоначальником культуры, может быть пазушная (боковая) почка. Нам осталось дождаться цветения орхидеи Фаленопсис, которое планируется через год.

Микроклонирование – это реальная альтернатива среди традиционных методов размножения растений. *Метод клонального микроразмножения растений* имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- размножение медленно растущих и трудно размножающихся культур;
- сохранение редких видов растений;
- стабильное сохранение сортовых особенностей;
- высокий коэффициент размножения (105-107 ед. – для травянистых, цветочных растений, 104-105 ед. – для кустарниковых древесных, 104 ед. – для хвойных в год);
- получение генетически однородного посадочного материала;
- методы биотехнологии позволяют снизить стоимость посадочного материала, что делает доступным его для большинства покупателей (в среднем себестоимость выращивания одного растения орхидеи в лабораторных условиях составляет 50 рублей, так как они содержатся в лабораторных условиях 2-3 года. В магазине орхидеи продают в среднем за 500 рублей, цена за коллекционные виды достигает \$ 3000);
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры (оздоровление растений);
- сокращение продолжительности селекционного периода; ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- возможность проведения работ в течение круглого года;
- растения, полученные методом клонального микроразмножения, безопасны для человека и окружающей среды.

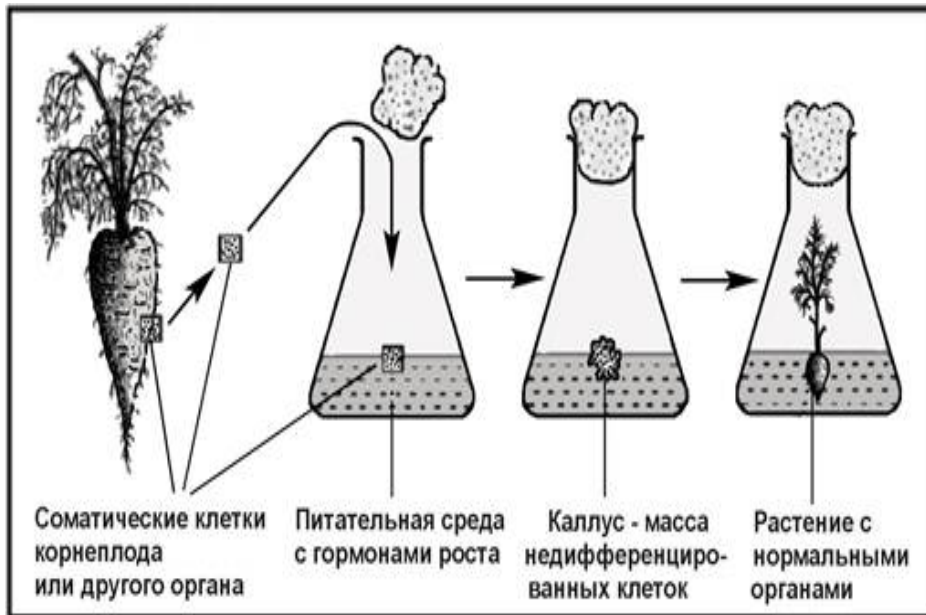
Коллекция редких, находящихся на грани исчезновения, и эндемичных растений, собранная в пробирках, занимает значительно меньше места, чем традиционные коллекции. Кроме того, трудозатраты на содержание такого «банка» ниже, чем на ежегодное полевое культивирование. Микроклонирование позволяет сохранить тысячи образцов, сохранив на будущее внутривидовое разнообразие.

Список литературы

1. In vitro размножение тканевой культурой [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://cvetutcvety.ru> (дата обращения: 12.01.2018).
2. Клещенко Е. Из чего делают растения / Е. Клещенко // Химия и жизнь. - 2011. - №8. – 67 с.
3. Калашникова Е.А. Клональное микроразмножение редких и лекарственных растений / Е.А. Калашникова. – М.: Просвещение, 1999. – 268 с.
4. Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве / под ред. Е. Куминова. – Мичуринск: НИИ Садоводства им. Мичурина, 1989. – 201 с.
5. Основы микроразмножения [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://elementy.ru> (дата обращения: 04.01.2018).
6. Размножение орхидей черенками от Линды Фортер [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://orchids.green-drop-home.com/src/propagation/orchids-StemPropogation.html> (дата обращения: 20.01.2018).
7. Фаленопсис [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://ru.wikipedia.org/wiki/Фаленопсис> (дата обращения: 12.01.2018).

Приложение 1

Рис. 1 Культура каллусной ткани моркови (опыты Готре) [5]



Приложение 2

Этапы микроклонального размножения растений

Процесс клонального микроразмножения можно разделить на 4 этапа:

1. Выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры. 2. Собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов. 3. Укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2°C - +10°C). 4. Выращивание растений в тепличных условиях и подготовка их к реализации. Для культивирования тканей на каждом из четырех этапов требуется применение определенного состава питательной среды [5].

На первом этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Первое, что происходит с клетками в культуре, – *дедифференциация*. Они утрачивают характерные признаки клеток листа или корня и становятся «просто клетками», способными дать начало каждой из тканей растения. Как правило, на этом этапе используют среду *Мурасиге-Скуга* (она названа в честь Тосио Мурасиге и Фольке Скуга, работавших в Висконсинском университете в Мэдисоне) и ее модификации. Среда содержит *агар-агар* (по консистенции она похожа на твердый холодец), *сахарозу и минеральные вещества*. В нее также добавляют *антибиотики* (тетрациклин, бензилпенициллин и др.) в концентрации 100-200 мг/л, чтобы подавить размножение бактерий, и, главное, растительные гормоны, или *фитогормоны*, – вещества, регулирующие рост и направление развития клеток. Продолжительность первого этапа может колебаться от 1 до 2 месяцев, в результате которого наблюдается рост меристематических тканей и формирование первичных побегов.

2 этап – *собственно микроразмножение*. На этом этапе необходимо добиться получения максимального количества мериклонов, учитывая при этом, что с увеличением субкультивирований увеличивается число растений-регенерантов с ненормальной морфологией и возможно наблюдать образование растений-мутантов. Как и на первом этапе, используют питательную среду по рецепту Мурасига и Скуга, содержащую различные биологически активные вещества, а также регуляторы роста. Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду *цитокининов и ауксинов*. Сравнительно высокие концентрации ауксинов стимулируют рост, причем особенно активно влияют на корнеобразование. Из цитокининов наиболее часто используют БАП в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов – ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л (чередуют циклы культивирования на средах с низким и высоким уровнем фитогормонов).

3 и 4 этапы – *укоренение микропобегов*, их последующая адаптация к почвенным условиям и высадка в естественные условия являются наиболее трудоемкими этапами, от которых зависит успех клонального микроразмножения. На третьем этапе, как правило, меняют основной состав среды: уменьшают в два,

а иногда и в четыре раза концентрацию минеральных солей по рецепту Мурасига и Скуга или заменяют ее средой Уайта, уменьшают количество сахара до 0,5-1% и полностью исключают цитокинины, оставляя один лишь ауксин. В качестве стимулятора корнеобразования используют β -индолил-3-масляную кислоту (ИМК), ИУК или НУК [2].

Укоренение микропобегов проводят двумя способами:

1) выдерживание микропобегов в течение нескольких часов (2-24 ч) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20-50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка); 2) непосредственное культивирование микропобегов в течение 3-4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1-5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта). В последнее время предложен метод укоренения пробирочных растений в условиях гидропоники. Этот метод позволяет значительно упростить этап укоренения и одновременно получать растения, адаптированные к естественным условиям.

Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений – весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом с длинными концами или специальным крючком. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85-90°C в течение 1-2 ч. Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1). Приготовленным заранее почвенным субстратом заполняют пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20-22°C), освещенностью не более 5 тыс. лк и влажностью 65-90%. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают до полной адаптации растений.

Через 20-30 дней после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают комплексным минеральным удобрением. Нередко после пересадки растений в почву наблюдается остановка в росте, опадение листьев и гибель растений. Эти явления связаны, в первую очередь, с тем, что у пробирочных растений нарушена деятельность устьичного аппарата, вследствие чего происходит потеря большого количества воды. Во-вторых, у некоторых растений в условиях *in vitro* не происходит образования корневых волосков, что приводит, в свою очередь, к нарушению поглощения воды и минеральных солей из почвы. Индийскими учеными предложен простой метод предотвращения быстрого обезвоживания листьев растений, выращенных *in vitro*, во время их пересадки в полевые условия. Метод заключается в том, что листья в течение

всего акклиматизационного периода следует опрыскивать 50%-ным водным раствором глицерина или смесью парафина. Применение этого метода помогает избежать длинных и затруднительных процессов закаливания пробирочных растений и обеспечивает 100%-ную их приживаемость [4].

Рис. 2 Этапы микроклонального размножения растений



Приложение 3

Описание орхидеи ФАЛЕНОПСИС [7]

Фаленопсис (лат. *Phalaenopsis*) – род эпифитных травянистых растений семейства Орхидные из Юго-Восточной Азии, Филиппин и северо-востока Австралии. В природных условиях обитают во влажных равнинных и горных лесах.

Орхидея Фаленопсис впервые была обнаружена на островах Малайского архипелага. Ученый, исследовавший остров, издалека принял цветы за бабочек, однако, приблизившись, понял, что это удивительные орхидеи. Таким образом, цветок получил свое название, которое в переводе с греческого языка означает «Сходство с бабочкой».

Это обширный род насчитывает около 70 видов. Представители рода – моноподиальные растения с сильно укороченным стеблем и широкими кожистыми листьями. Рост растения происходит только в одном направлении – вверх. Из пазух между листьями растение выпускает воздушные корни и цветоносы. У взрослого растения, как правило, 4-6 листьев. Листья вечнозеленые, длиной 5-30 см. Цветоносы пазушные, длинные, часто ветвящиеся, у многих видов с большим количеством довольно крупных цветков. Корни воздушные с толстым слоем веламена, иногда уплощенные, у некоторых видов зеленоватые за счет присутствия в них хлорофилла.

В комнатных условиях фаленопсисы выращивают либо в пластиковых горшках (часто прозрачных). Большую часть видовых и гибридных фаленопсисов можно содержать при относительной влажности воздуха 40-50%. Большинство гибридов относятся к теплой температурной группе. Зимой и летом для них благоприятна температура 22-25°C, ночью – не ниже 21°C. Большинство фаленопсисов – растения без четко выраженного периода покоя, поэтому в течение всего года полив должен быть умеренный, но регулярный. Подкормки комплексным минеральным удобрением производятся 1 раз в одну-две недели.

Рис. 3 Орхидеи Фаленопсис



Приложение 4

Рис. 4,5 Особенности строения орхидеи Фаленопсис



Приложение 5

Этапы размножения орхидеи методом *in vitro* (рис. 6-13)

Этапы размножения орхидеи из пазушных спящих почек

НАЧАЛО ЭКСПЕРИМЕНТА – 1 марта 2018 г.

Материалы и оборудование:



- среда Мурасиге-Скуга (агар-агар, сахароза, минеральные вещества, витамины)
- антибиотики (тетрациклин)
- фитогормоны (цитокинин и гетероауксин)
- дезраствор



Приготовление питательной среды (на 1 л среды Мурасиге-Скуга)

Отварить смесь, добавить в нее антибиотики (тетрациклин, в концентрации 100 мг/л, т.е. 1 таблетку, чтобы подавить размножение бактерий), гормоны (гетероауксин 0,5 мг/л и цитокининовую пасту 1 мг/л).

Этапы размножения орхидеи из пазушных спящих почек

Стерилизация является наиболее важным шагом во всей этой процедуре!

1. Подготовить среду для роста - питательную среду Мурасиге-Скуга (1 л) + антибиотики (тетрациклин для подавления размножения бактерий) + гормоны (гетероауксин и цитокининовая паста), в горячем виде влить в простерилизованные банки (влить субстрат на 5-7 см глубины) и опять стерилизовать.
2. Прежде чем поместить в подготовленные банки растения, нужно пройти контроль стерильности. После заполнения банок субстратом, их плотно закрывают притертыми крышками, ставят на контроль в течение 4-5 суток. Если внутри содержатся споры микроскопических грибов, то за эти дни они образуют колонии (плесень). В нашем эксперименте не прошли контроль стерильности 2 банки из 7 (для них мы повторили все процедуры сначала).
3. Для дезинфекции инструментов приготовить смесь из 3 частей воды, 1 части отбеливателя (хлорки) и пары капель мыла. Поместить подготовленные пробки, щипцы, зубную щетку, бритвенные лезвия в дезраствор.
4. Подготовить еще одну смесь для обработки растения: 9 частей воды, 1 часть хлорки, 2 капли мыла. Поместить отрезанный цветонос в подготовленный лоток с раствором отбеливателя. Аккуратно почистить стебель снизу доверху простерилизованной мягкой зубной щеткой. Положить цветонос обратно в лоток.
5. Отрезать отцветший цветонос на 1 см сверху и снизу у каждой боковой почки под углом стерильной бритвой. Аккуратно удалить прикрывающую чешуйку зародыша в почке.
6. Поместить подготовленные микропобеги в лоток с отбеливателем (на 15-20 минут).
7. Воспользовавшись пинцетом, поместить почки в банки так, чтобы зародыш касался среды. Ставим банки в теплое (22-25°C) и светлое место (но не под прямые лучи). Каждый день просматривайте банки и если не заметили никаких помутнений, то все прошло на высшем уровне. На этом этапе из 7 ростков осталось 3 (остальные были заражены плесневым грибом из-за несоблюдения условий стерильности).

Этапы размножения орхидеи из пазушных почек



стерилизация банок!!!



стерилизация инструментов!!!



стерилизация цветоноса!!!

отделение микрочеренков (по 1 пазушной почке у каждого) от отцветшего цветоноса



микрочеренки по 2 см
(на каждом по одной
спящей почке)



зародыш прикрыт почечной
чешуйкой



зародыш без чешуйки
(она была удалена)

заложено 7 эксплантов



Этапы размножения орхидеи из пазушных спящих почек

8. Когда листья станут длиной 1,5-2 см и корни 3-4 см (в нашем эксперименте это произошло в июле), выньте маленькие растения из банок предельно аккуратно при помощи щипцов, промойте в воде от смеси и выдержите микробеги в течение нескольких часов (2-24 ч) в стерильном концентрированном растворе гетероауксина (20 мг/л).

9. После этого пересадите их в отдельные горшочки или общую емкость (купили готовый для орхидных, который прошел стерилизацию в сушильном шкафу 30 мин). Сверху накройте контейнером. После посадки молодым росткам необходимо создать особые условия – подсветку и высокую влажность (опрыскивание).

10. После того, как листья вырастут на 4-5 см, растение необходимо перенести в нестерилизованный грунт, где ухаживать соответствующим образом до полного вырастания во взрослое растение. Через 20-30 дней после посадки растения подкармливают комплексным минеральным удобрением. При правильном и своевременном уходе орхидея начнет цвести только через 2-3 года, но время компенсируется необычайной красотой и оригинальностью цветков.

Итог – 3 клонированных растения от одного отцветшего цветоноса с маточного взрослого здорового растения





Выводы:

Проведенные нами лабораторные эксперименты подтвердили:

- целое растение можно вырастить из крохотного кусочка ткани методом *in vitro* – в банке в стерильных условиях на правильно подобранной питательной среде (нарушение стерильности в 4-х банках привело к появлению плесневого грибка);
- эксплантом, то есть родоначальником культуры, может быть пазушная (боковая) спящая почка орхидеи

