

Муниципальное бюджетное учреждение дополнительного образования
«Станция юных натуралистов» Асбестовского городского округа

**Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей
среды «ОТКРЫТИЯ 2030»**

Номинация «Клеточная биология, генетика и биотехнология»

Исследовательская работа
**«Начальные этапы микрклонального
размножение растений»**

Автор: Краснослободцева Виктория
Евгеньевна, 10 класс, 16 лет,
обучающаяся МБУДО
«Станция юных натуралистов»,
творческое объединение «Мир вокруг нас»

Руководитель: Столярова Оксана
Александровна, МБУДО «СЮН»,
педагог дополнительного образования, 1 КК

Свердловская область, г.Асбест, 2022 г.

Содержание

Введение.....	3
Теоретическая часть.....	4
Понятие микроклонального размножения.....	4
Преимущества микроклонального размножения.....	4
Методы микроклонального размножения растений.....	5
Этапы микроклонального размножения растений.....	6
Питательные среды.....	7
Методика проведения исследования.....	9
Исследовательская часть.....	12
Заключение.....	15
Список источников информации.....	16
Приложения.....	17

Введение

Актуальность. Для семенных растений характерно два способа размножения: семенной и вегетативный. К недостаткам семенного размножения следует отнести генетическую пестроту получаемого посадочного материала и длительность процесса. При вегетативном размножении сохраняется генотип материнского растения и сокращается продолжительность ювенильного периода. Однако для большинства видов (в первую очередь для древесных пород) проблема вегетативного размножения остается до конца не решенной. [4] Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию микрклонального размножения, которое значительно ускоряет процесс и увеличивает количество получаемого посадочного материала.

Объект исследования: многолетние цветковые растения.

Предмет исследования: микрклональное размножение цветковых растений.

Цель работы: провести начальные этапы микрклонального размножения растений.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. изучить понятие микрклонального размножения растений и этапы его проведения;
2. подготовить посуду и химические реактивы для выращивания асептических проростков;
3. выбрать растения-доноры для проведения эксперимента;
4. приготовить питательную среду для выращивания асептических проростков;
5. провести стерилизацию помещения, необходимого оборудования и материалов;
6. провести процедуру посадки эксплантов на питательную среду
7. провести микрочеренкование асептических проростков
8. провести наблюдения

Теоретическая часть

Понятие микроклонального размножения растений

Одним из важных разделов биотехнологии является биотехнология растений, основанная на использовании культивируемых в пробирке (*in vitro*) органов, тканей, клеток и изолированных протопластов растений для производства различных продуктов [6].

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения – микроклональное размножение [8].

Микроклональное размножение связано со способностью изолированных клеток переходить к дифференциации, давать начало стеблевым побегам или соматическим зародышам и формировать целое растение. Высокий коэффициент размножения, освобождение от грибковой, бактериальной и вирусной инфекции обусловили важное народнохозяйственное значение этой технологии. В настоящее время производство элитного посадочного материала картофеля, овощей, плодовых и цветочных культур не обходится без этапа клонального микроразмножения и оздоровления *in vitro* [6].

Микроклональное размножение – это бесполое вегетативное размножение в культуре *in vitro*, при котором получают растения генетически идентичные исходной родительской форме, что способствует сохранению генетически однородного посадочного материала [1].

В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность [8]. Тотипатентность – это свойство изолированных клеток полностью реализовать свой потенциал развития с образованием нового организма [6].

Преимущества микроклонального размножения растений

Использование методов микроклонального размножения растений дает возможность:

- ускорять селекционный процесс, в результате этого сроки получения товарной продукции сокращаются до 2–3 лет вместо 10–12;
- получать за короткий срок большое количество оздоровленного, безвирусного материала, генетически идентичного материнскому растению;
- работать в лабораторных условиях и поддерживать активно растущие растения круглый год;
- размножать растения практически без контакта с внешней средой, что исключает воздействие неблагоприятных абиотических и биотических факторов;
- получать максимальное число растений с единицы площади;
- в короткий срок получать большое число растений трудноразмножаемых или вегетативно неразмножаемых;
- при выращивании растений с длительной ювенильной фазой можно ускорять переход от ювенильной к репродуктивной фазе развития;

- длительно (в течение 1–3 лет) сохранять растительный материал в условиях *in vitro* (без пассирования на свежую среду);
 - создавать банки длительного хранения ценных форм растений и отдельных их органов;
- разрабатывать методы криосохранения оздоровленного *in vitro* материала [3].

Методы микрклонального размножения растений

Существует много методов клонального микроразмножения. Различные авторы, проводя индивидуальные исследования по влиянию условий культивирования эксплантов на процессы морфогенеза, наблюдали разные ответные морфогенетические реакции на изменение условий выращивания, что в свою очередь привело к созданию новых классификаций методов клонального микроразмножения [10].

Н. В. Катаева и Р. Г. Бутенко (1983) выделяют два принципиально различных типа клонального микроразмножения:

- Активация уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля).
- Индукция возникновения почек или эмбриоидов *de novo*:
 1. образование адвентивных побегов непосредственно тканями экспланта;
 2. индукция соматического эмбриогенеза;
 3. дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани [5].

Основной метод, используемый при клональном микроразмножении растений, — это активация развития уже существующих в растении меристем, основывающаяся на снятии апикального доминирования. Это может быть достигнуто двумя путями:

а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде;

б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопуридин (БАП) или 6-фурфуриламинопуридин (кинетин), а также 2-изопентениладенин (2iP) и зеатин [10].

Часто в качестве экспланта используют верхушечные или пазушные почки, которые изолируют из побега и помещают на питательную среду с цитокининами. Образующиеся пучки делят на отдельные побеги, которые при необходимости черенкуют и переносят на свежую питательную среду. После необходимого числа пассажей побеги укореняют *in vitro*, добавляя в

питательную среду ауксины, а затем переносят в почву, где создают условия, способствующие адаптации растений. Так, при размножении герберы методом активации пазушных меристем можно получить до 1 млн. растений-регенерантов в год [2].

Каждая модель микроклонального размножения имеет свои преимущества и недостатки:

а) индукция развития адвентивных побегов непосредственно из ткани экспланта, метод является очень эффективным, все признаки размножаемого образца полностью сохраняются;

б) развитие пазушных побегов, это наиболее надежный способ, считается, что метод имеет минимальную степень риска для получения однородного потомства;

в) получение каллусной ткани с последующей индукцией органогенеза, теоретически этот метод наиболее перспективен с точки зрения коэффициента размножения, однако, в процессе дедифференциации появляется риск получить вегетативное потомство с вмененными формами, поэтому рекомендуется избегать длительной каллусной культуры и вести обязательный цитологический контроль растений-регенерантов [8].

В настоящее время метод микроклонального размножения широко используется в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур — как технических (сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стахис), так и овощных (томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.), а также для размножения культур промышленного цветоводства (гвоздика, хризантема, роза, гербера), тропических и субтропических растений (рододендрон, азалия, камелия, чай и др.), плодовых и ягодных культур (яблоня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, крыжовник и др.) и древесных растений (тополь, ива, ольха, береза, рябина, секвойя, туя, можжевельник и др.) [10].

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 (+20С, +10С).

4. Выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Для культивирования тканей на каждом из четырех этапов требуется применение определенного состава питательной среды [1].

На первом этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. В тех случаях, когда трудно получить исходную

стерильную культуру экспланта, рекомендуется вводить в состав питательной среды антибиотики (тетрациклин, бензилпенициллин и др.) в концентрации 100—200 мг/л. Это в первую очередь относится к древесным растениям, у которых наблюдается тенденция к накоплению внутренней инфекции.

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.

Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. 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.

При долгом культивировании растительных тканей на питательных средах с повышенным содержанием цитокининов (5—10 мг/л) происходит постепенное накопление их в тканях выше необходимого физиологического уровня, что приводит к появлению токсического действия и формированию растений с измененной морфологией. Вместе с тем, возможно наблюдать такие нежелательные для клонального микроразмножения эффекты, как подавление пролиферации пазушных меристем, образование витрифицированных (оводненных) побегов и уменьшение способности растений к укоренению. Отрицательное действие цитокининов возможно преодолеть, по данным Н.В. Катаевой и Р.Г. Бутенко, путем использования питательных сред с минимальной концентрацией цитокининов, обеспечивающих стабильный коэффициент микроразмножения, или путем чередования циклов культивирования на средах с низким и высоким уровнем фитогормонов.

3 и 4 этапы — укоренение микропобегов, их последующая адаптация к почвенным условиям и высадка в поле 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 [9].

Питательные среды

Питательная среда – основной фактор успешного культивирования изолированных органов, тканей и клеток растений. Среда по консистенции бывают твердыми или агаризованными, и жидкими, в зависимости от цели исследования [1].

Состав питательной среды необходимо подбирать для каждого вида растений. На микроклональное размножение влияют гормоны, минеральные соли, витамины и углеводы. При размножении *in vitro* часто используют среды Мурасиге и Скуга, Гамборга, Хеллера и другие [8].

Среда Мурасиге-Скуга является наиболее универсальной. Она используется для культивирования клеток многих видов растений. Среда Гамборга-Эвелега (Б5) дает хорошие результаты при культивировании тканей бобовых, а среда №6 — злаковых растений. Среда Уайта применяется для укоренения и выращивания побегов после регенерации растений. Среда Нича и Нич рекомендуется для индукции андрогенеза в культуре пыльников [6].

В качестве источника углеродного питания используют различные углеводы типа сахарозы, глюкозы, фруктозы, галактозы. Разные культуры требуют различной концентрации углеводов на разных этапах микроклонального размножения. Компоненты среды для выращивания растительных клеток и тканей можно разделить на 6 основных групп, что обычно отражает порядок приготовления концентрированных маточных растворов:

- макроэлементы,
- микроэлементы,
- источники железа,
- витамины,
- источники углерода,
- фитогормоны [8].

Питательные среды содержат железо в хелатированной форме, которая обеспечивает его доступность растению. Большинство тканей, культивируемых *in vitro*, способны синтезировать все необходимые для жизнедеятельности витамины. Но на первом этапе — при введении в культуру, обязательно добавлять витамины. Для регуляции дифференциации и морфогенеза необходимы регуляторы роста. Подбирая соотношение и концентрацию этих веществ, можно направленно регулировать их органогенное действие. Культуры растительных тканей не автотрофны в отношении углеродного питания и их необходимо выращивать на питательных средах, которые содержат сахара. Самым оптимальным источником углеродного питания для большинства тканей является сахароза в концентрации 2–5 % [1].

Очень важным компонентом питательных сред являются природные фитогормоны (ИУК, ИМК, зеатин) или синтетические регуляторы роста с гормональной активностью: ауксиновой-нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксипуксусная кислота (2,4-Д) или цитокининовой-бензиламинопурина (БАП), кинетин и др. Разработано несколько вариантов стандартных питательных сред.

Иногда в состав питательных сред включают различные растительные экстракты, например, картофельный экстракт или кокосовое молоко. Для придания средам плотности добавляют агар-агар или агарозу [6].

Методика проведения исследования

1. Подготовить посуду и химические реактивы для проведения эксперимента
2. Выбрать растения – доноры для размножения
3. Приготовить питательную среду для выращивания асептических проростков
4. Провести стерилизацию помещения, необходимого оборудования и материалов
5. Провести стерилизацию растительных эксплантов
6. Провести процедуру посадки эксплантов на питательную среду
7. Создать условия для проращивания асептических проростков
8. Провести процедуру микрочеренкования асептических проростков
9. Провести наблюдения

1. Перед началом работы нужно **проверить наличие оборудования, материалов и химических реактивов**, необходимых для проведения эксперимента. Посуда должна быть чистой, без сколов и трещин.

2. Для микроклонального размножения выбирают здоровые растения, не имеющие признаков инфекционных заболеваний и признаков поражения паразитами.

Для микроклонального размножения растений можно использовать разные части растений: лист, стебель, почка.

3. Наиболее универсальной является питательная среда Мурасиге – Скуга. Состав питательной среды Мурасиге – Скуга указан в **таблице №1 (приложение №2)**.

Для приготовления питательной среды Мурасиге-Скуга изначально готовят маточные (концентрированные) растворы макросолей, микросолей и витаминов, которые впоследствии используют многократно. Маточные растворы фитогормонов готовят непосредственно перед использованием питательной среды [7].

Маточные растворы готовят в соответствии с **таблицей №2 «Состав маточных растворов по Мурасиге - Скуга» (приложение №2)**.

Порядок приготовления питательной среды Мурасиге – Скуга представлен в **приложении №3**.

4. Все работы с культурой клеток и тканей *in vitro* проводят в **стерильных (асептических) условиях**, стерильными инструментами, в стерильной посуде, на стерильных питательных средах.

Чаще всего для **стерилизации помещений** используют ультрафиолетовое облучение в течение 0,5–2 часов (в зависимости от площади помещения). При длительном воздействии эти лучи вызывают гибель всех бактерий. Бактерии погибают очень быстро, а споры грибов значительно медленнее.

Для достижения максимальной стерильности перед обработкой УФ все поверхности тщательно отмываются моющими средствами, водой и растворами хлорсодержащих веществ, поверхности обрабатывают 70 % спиртом [1].

Стерилизация посуды

Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов, а также раствора двуххромовокислого калия в серной кислоте. Вымытую посуду ополаскивают водопроводной, а затем дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу.

Чтобы избежать заражения стерильных предметов из воздуха, перед стерилизацией их закрывают ватными пробками, заворачивают в оберточную (пергаментную) бумагу или закрывают фольгой (у стаканов и колб достаточно завернуть горлышко).

При сухом способе стерилизации посуду стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 140 °С в течении 2 часов или при температуре 180 °С – 30 минут. При более высоких температурах ватные пробки буреют, а бумага становится ломкой.

Стерилизация инструментов

Инструменты (скальпели, пинцеты, иглы и т.д.) стерилизуют в сушильном шкафу. Непосредственно перед работой и в процессе её инструменты помещают в стакан со спиртом и обжигают в пламени спиртовки.

Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции! Перед повторным употреблением его снова окунают в спирт и обжигают в пламени спиртовки

Стерилизация питательной среды для выращивания культур тканей проводят после их разлива в пробирки или колбы при температуре 115-120 °С в течение 15-30 минут, в зависимости от объёма среды. Если в результате стерилизации среда помутнела, следовательно, был неправильно выбран режим стерилизации [1].

5. Стерилизация растительного материала

Поверхностные ткани органов растений инфицированы бактериями, грибами и их спорами. В связи с этим первым шагом для получения изолированных клеток, тканей и органов растений является стерилизация растительного материала.

Перед стерилизацией объекта его тщательно моют теплой водой с мылом, промывают дистиллированной водой [11].

Для стерилизации используют широкий спектр разных стерилизующих веществ: хлорамин, «белизна», перекись водорода, ртутные препараты (сулема), перманганат калия. Правильный выбор стерилизующего вещества заключается в том, чтоб нейтрализовать эпифитную микрофлору и не повредить ткани растения. Кроме того, вещество не должно глубоко проникать в ткань и легко вымываться [1]. Растворы отбеливателей для стерилизации нужно разбавлять в 2-3 раза [11].

После стерилизации материал переносят в стерильную дистиллированную воду, выдерживают 10 минут, затем меняют воду ещё два раза, выдерживая в каждой порции по 15-20 минут.

6. Посадка эксплантов на питательную среду

В стерильных чашках Петри или на стерильных листах бумаги, или на обожженной плитке обрезают стерильным скальпелем концы сегментов

исходного материала, где клетки могут быть повреждены, и из средних зон нарезают кусочки тканей, которые с помощью пинцета помещают на подготовленную стерильную среду.

Для предотвращения попадания микроорганизмов в пробирки горлышко пробирки и пробка обжигаются в пламени спиртовки.

При помещении побега на питательную среду из пазушных меристем появятся боковые побеги.

7. Для проращивания эксплантов необходимо соблюдение некоторых условий: поддерживают температуру $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, освещённость не более 5 клк и фотопериод 16 часов [8].

В среднем от посадки на среду до появления проростков с 5-6 листочками проходит 30 -45 дней, в некоторых случаях от 2 до 8 месяцев. По мере истощения среды обновляются, и проростки периодически пересаживают на новую стерильную среду

8. Процедура микрочеренкования проводится с интервалом в 14-21 день. Для этого необходимо пробирочное растение вынуть из пробирки и поместить его в стерильную чашку Петри.

Разрезать его на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой), часть стебля над листом при этом должна быть при этом в 2-3 меньше, чем часть ниже листа. Необходимо соблюдение строгой стерильности.

Черенки переносят на свежую стерильную питательную среду в пробирки.

9. Наблюдение за развитием побега проводить ежедневно. Все наблюдения фиксировать в тетради.

Исследовательская часть

1. Согласно методике проведения исследования подготовили посуду, необходимую для проведения эксперимента: колбы, пробирки, пипетки, чашки Петри.

В соответствии с **таблицей №2** «Состав питательной среды Мурасиге - Скуга» (**приложение №2**) подготовили необходимые химические реактивы (**рис. 2, приложение №4**).

2. Для процедуры микрклонального размножения нами были выбраны цветковые растения:

- хризантема многоцветковая (*Chrysanthemum multiflora*) (**рис.7, приложение №5**);
- эустома крупноцветковая (*Eustoma grandiflorum*) (**рис.6, приложение №5**);
- роза многоцветковая (*Rosa multiflora*) (**рис.8, приложение №5**);
- камелия китайская (*Camellia sinensis*) (**рис.9, приложение №5**).

Хризантему и розы приобрели в цветочном магазине, эустома и камелия выращиваются в комнатных условиях.

Растения внешне здоровые, не имеют признаков инфекционных заболеваний и поражения паразитарными организмами.

У каждого растения взяли часть стебля длиной не более 3 см и удалили листья.

3. Согласно методике проведения исследования в соответствии с **приложением №3** приготовили питательную среду.

Для этого приготовили маточные растворы макросолей, микросолей, маточный раствор железа и растворы витаминов (**рис.3, приложение №4**).

Далее приготовили раствор агара. В колбе растворили сахарозу в небольшом количестве воды. После этого к приготовленному раствору сахарозы добавили заданные количества маточных растворов и заранее подготовленный раствор агара (**рис.4, приложение №4**).

После смешивания всех ингредиентов определили рН приготовленной питательной среды с помощью датчика водородного показателя цифровой лаборатории «Сенсор - 1».

Водородный показатель приготовленной нами питательной среды составил 6,65 ед. рН, что соответствует требованиям, поэтому корректировку рН не проводили (**рис.5, приложение №4**).

4. 20 ноября 2021 года перед проведением микрклонального размножения провели стерилизацию помещения, а также материалов и оборудования, необходимого для дальнейшей работы

Стерилизацию помещения осуществляли при помощи облучателя бактерицидного ОБН -150. В соответствии с руководством по эксплуатации облучателя исходя из объема помещения время облучения при бактерицидной эффективности 99.9% составляет 120 мин.

Всю посуду хорошо промыли и простерилизовали в сушильном шкафу при температуре 180 °С в течении 30 мин.

Посуду с приготовленной питательной средой и дистиллированную воду стерилизовали в сушильном шкафу при температуре 120 °С в течении 30 минут (рис.10, приложение №6).

Работу со стерильным материалом проводили в стерильных перчатках.

Подготовили рабочее место: (рис. 13, приложение №7)

- рабочую поверхность обработали спиртом;
- кафельную плитку обработали спиртом и обожгли (рис.12, приложение №6);
- подготовили спиртовые горелки;
- подготовили ёмкости со спиртом для обработки инструментов

5. Стерилизацию растительного материала проводили в растворе «Белизны» и 70% растворе этилового спирта.

Перед стерилизацией подготовленные экспланты тщательно промыли мылом, ополоснули в дистиллированной воде.

После этого на 10 минут поместили экспланты в раствор «Белизны», разбавленный стерильной дистиллированной водой в 3 раза. После – в раствор этилового спирта на 10 минут.

После стерилизации материал перенесли в стерильную дистиллированную воду и выдержали в ней 10 минут. Воду меняли 2 раза, с выдержкой по 15 минут (рис.11, приложение №6).

6. Стерильный материал поместили на стерильную питательную среду.

Для этого, простерилизованный растительный материал разместили на стерильной кафельной плитке.

Далее, с помощью пинцета и скальпеля провели обрезку апикальной меристемы и из средней зоны нарезали части, которые поместили на стерильную питательную среду. Эксплант каждого растения разделили на 3-4 части (рис.14, приложение №7).

Пробирки закрыли стерильной пробкой (рис.15, приложение №7).

Стерильный инструмент использовали только для одноразовой процедуры. Для повторного использования скальпель и пинцет окунали в спирт и обжигали в пламени спиртовки.

После завершения процедуры с одним растением кафельную плитку обрабатывали спиртом и обжигали. Далее, процедуру повторяли с другим видом растения.

Для выращивания асептических проростков соблюдали необходимую температуру и освещенность. Асептические проростки выращивали в домашних условиях под лампой. Соблюдали 16- часовой фотопериод (рис.15, приложение №7).

Освещенность контролировали с помощью датчика освещенности цифровой лаборатории «Сенсор -1». Освещенность на месте выращивания асептических проростков составляла в среднем 1500 лк.

7. Через 7 дней после посадки эксплантов на питательную среду появились асептические проростки у эустомы, через 15 дней – у розы (рис.16, приложение №8).

Экспланты камелии и хризантемы на данный момент находятся на первой стадии микрклонального размножения (проростки отсутствуют) (**рис.17, приложение №8**).

8. Наблюдения проводится ежедневно. Визуально оценивается стерильность среды (наличие\отсутствие колоний микроорганизмов). Проверяется состояние эксплантов: их рост, появление боковых побегов.

Заключение

В ходе проведённого исследования мы:

1) изучили понятие микроклонального размножения растений и этапы его проведения;

2) провели подготовку необходимых материалов и оборудования для проведения начальных этапов микроклонального размножения растений;

3) для размножения выбрали четыре растительных объекта: эустома крупноцветковая, роза многоцветковая, хризантема многоцветковая, камелия китайская;

4) для проращивания асептических проростков выбрали и приготовили универсальную питательную среду Мурасиге-Скуга;

5) создали стерильные условия в помещении лаборатории посредством имеющихся в наличии средств и оборудования: ультрафиолетовый облучатель (для стерилизации воздуха и поверхностей), раствор «Белизны» и этилового спирта (для стерилизации растительных эксплантов), сушильный шкаф (для стерилизации посуды и инструментов), изопропиловый спирт и обжиг (для обработки инструментов и поверхностей во время непосредственной работы с растительным материалом).

6) провели процедуру посадки эксплантов на питательную среду в пробирки. От каждого растения получили по 3-4 экспланта.

7) асептические проростки выращивали в комнатных условиях, соблюдая необходимый температурный режим и допустимую освещённость.

Наиболее активный рост показали экспланты эустомы (проростки появились уже через 7 дней), более длительный период развивались проростки из эксплатов розы (появление проростков через 15 дней), наиболее длительный период проращивание проростков наблюдается у камелии и хризантемы (в январе экспланты находятся на первом этапе размножения, проростки пока отсутствуют).

8) у эустомы и розы в ближайшее время (январь – март 2022 года) планируется проведение следующего этапа микроклонального размножения – микрочеренкование асептических проростков. Из одного экспланта растения мы получим по несколько микроклонов, которые пересадим на свежую питательную среду.

Весной и летом 2022 года планируется проведение укоренения черенков и их адаптация. А также их высадка на учебно-опытном участке «Станции юных натуралистов»

Также нам интересно провести микроклонирование древесных видов растений (особенно, хвойных). Подробно изучить и опробовать другой вид микроклонального размножения – получение каллусной ткани с последующей индукцией органогенеза.

Список источников информации

1. Авксентьева О. А., Петренко В. А. Биотехнология высших растений культура *in vitro* – учебно-методическое пособие. – Х.: ХНУ имени В. Н. Каразина, 2011. – 60 с. [Электронный ресурс] // URL: <http://plantphysiol-bio.univer.kharkov.ua/materials/Biotechnologia%20roslyn.pdf>
2. Бабилова А.В., Горпенченко Т.Ю., Журавлев Ю.Н. Растение как объект биотехнологии. – Комаровские чтения, выпуск LV, 2007. – 184-206 с. [Электронный ресурс] // URL: <https://www.biosoil.ru/Files/00006056.pdf>
3. Гвоздев М.А., Роговая В.В. Особенности микрклонального размножения косточковых культур в условиях *in vitro* [Электронный ресурс] // Cyberleninka URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-mikroklonalnogo-razmnozheniya-kostochkovyh-kultur-v-usloviyah-in-vitro>
4. Клональное микроразмножение растений [Электронный ресурс] // Medbe URL: <https://medbe.ru/materials/problemy-i-metody-biotekhnologii/klonalnoe-mikrorazmnozhenie-rasteniy/>
5. Микрклональное размножение растений [Электронный ресурс] // Микрклон URL: <https://microklon.ru/page/mikroklonalnoe-razmnozhenie-rastenij-2>
6. Назаренко Л.В., Долгих Ю.И., Загоскина Н.В., Ралдугина Г.Н. Биотехнология растений - учебник и практикум для бакалавриата и магистратуры — М. : Издательство Юрайт, 2018. — 161 с. [Электронный ресурс] // URL: <https://static.my-shop.ru/product/pdf/298/2974250.pdf>
7. Поплавская Л.Ф., Ребко С.В. Основы генетической инженерии древесных видов. – Минск, Белорусский государственный технологический университет, 2013. – 41 с. [Электронный ресурс] // URL: https://elib.belstu.by/bitstream/123456789/3285/1/osnovy-geneticheskoi-inzhenerii_rebko.pdf
8. Широков А.И., Крюков Л.А. Основы биотехнологии растений – электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 49 с. [Электронный ресурс] // URL: http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/files/Method_Shirokov_Kryukov.pdf
9. Этапы микрклонального размножения растений [Электронный ресурс] // Биотехнология URL: http://www.biotechnolog.ru/pcell/pcell6_3.htm
10. Этапы клонального микроразмножения растений [Электронный ресурс] // Studme URL: https://studme.org/353124/agropromyshlennost/etapy_klalnogo_mikrorazmnozheniya_rasteniy
11. Стерилизация растительного экспланта [Электронный ресурс] // Биотехнология для «чайников» URL: <http://practice.biotechnolog.ru/rastexpl.htm>

Микроклональное размножение растений

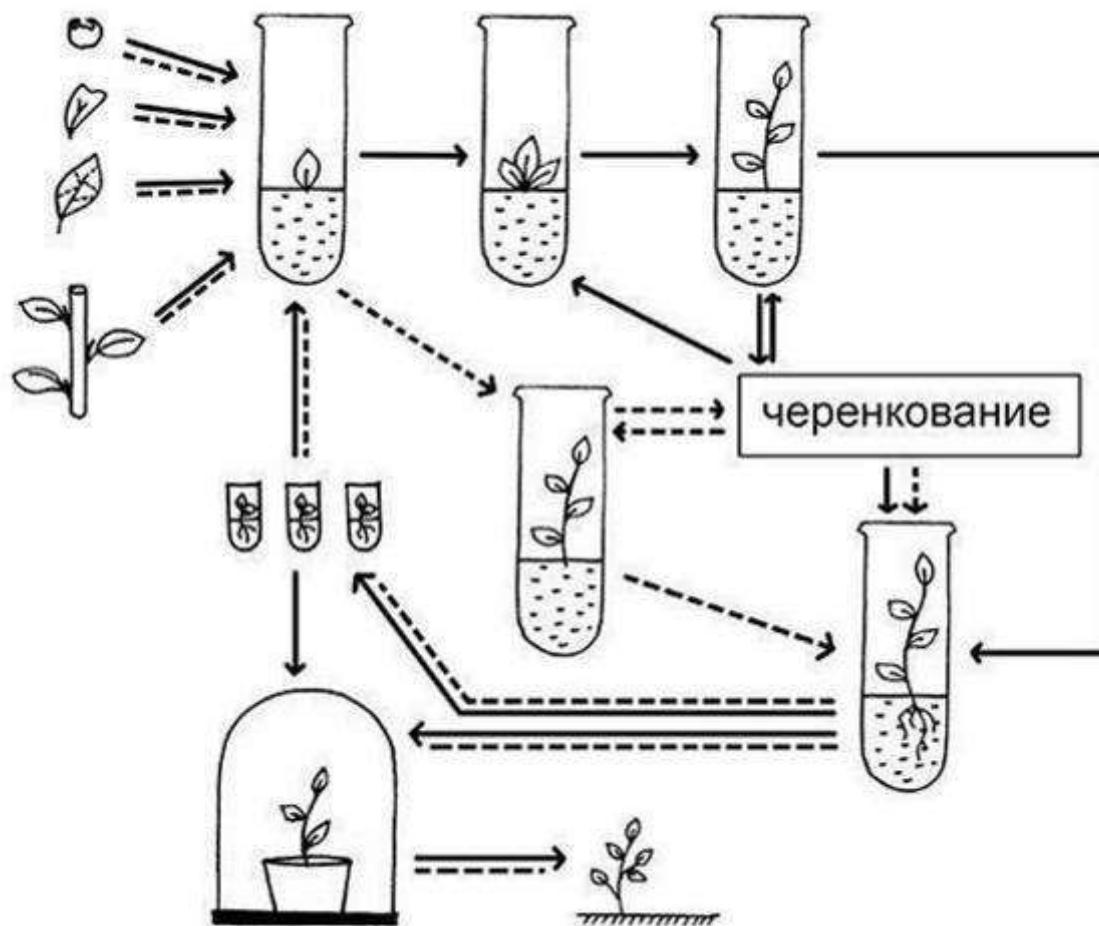


Рис. 1 Схема клонального микроразмножения растений [4]

Питательная среда Мурасиге - Скуга

Таблица №1. Состав питательной среды Мурасиге-Скуга [1,7]

№ п/п	Компонент питательной среды	Содержание вещества, мг/л
1	KNO ₃	1900
2	NH ₄ NO ₃	1650
3	KH ₂ PO ₄	170
4	MgSO ₄ *7H ₂ O	370
5	CaCl ₂ *2H ₂ O	690
6	Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,25
7	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025
8	H ₃ BO ₃	6,2
9	MnSO ₄ *4H ₂ O	22,3
10	ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6
11	KJ	0,83
12	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025
13	FeSO ₄ *7H ₂ O	27,85
14	Na ₂ ·ЭДТА (трилон Б)	37,35
15	Тиамин HCl	0,1
16	Пиридоксин HCl	0,5
17	Глицин	0,5
18	Никотиновая кислота	0,5
19	Инозитол	100
20	ИУК	2,0
21	6-БАП	0,2
22	Сахароза	30000
23	Агар-агар	7000

Таблица №2. Состав маточных растворов по Мурасиге-Скуга [7]

№ п/п	Компонент питательной среды	Количество вещества
Маточный раствор макроэлементов № 1 (г на 1 л маточного раствора)		
1	KNO ₃	38
2	NH ₄ NO ₃	33
3	KH ₂ PO ₄	3,4
4	MgSO ₄ *7H ₂ O (или MgSO ₄ безводный)	7,4 (3,6)
5	·CaCl ₂ *2H ₂ O (или CaCl ₂ безводный)	13,8 (8,8)
Маточный раствор микроэлементов № 2 (мг на 100 мл маточного раствора)		
1	·Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	25
2	·CuSO ₄ *5H ₂ O	2,5
3	H ₃ BO ₃	620
4	MnSO ₄ *4H ₂ O	2230
5	ZnSO ₄ *7H ₂ O	860
6	KJ	83
7	CoCl ₂ *6H ₂ O	2,5
Маточный раствор хелата железа № 3 (мг на 100 мл маточного раствора)		
1	FeSO ₄ *7H ₂ O	557
2	Na ₂ ·ЭДТА (трилон Б)	745
Маточный раствор витаминов № 4 (мг на 10 мл маточного раствора)		
1	Тиамин HCl	1
2	Пиридоксин HCl	5
3	Глицин	5
4	Никотиновая кислота	5
5	Инозитол	1000

Приготовление питательной среды Мурасиге – Скуга [1,7]

1. Приготовление маточных растворов

Маточные растворы готовят в соответствии с таблицей №2 «Состав маточных растворов по Мурасиге - Скуга»

1.1 Приготовление маточного раствора макросолей. Каждую соль из состава маточного раствора макросоли (согласно таблице №..) растворить в отдельном стаканчике при нагревании, затем слить в стеклянную колбу и добавить дистиллированную воду до необходимого объема (для предотвращения выпадения осадка последним компонентом добавляют раствор солей магния). Для приготовления 1л питательной среды Мурасиге-Скуга необходимо взять 50 мл маточного раствора макросоли.

1.2 Приготовление маточного раствора микросолей. Каждую соль из состава маточного раствора микросоли (см. таблицу №2) растворить в отдельном стаканчике при нагревании, затем слить в стеклянную колбу и добавить дистиллированную воду до необходимого объема (для предотвращения выпадения осадка последним компонентом добавляют раствор солей молибдена). Для приготовления 1л питательной среды Мурасиге-Скуга необходимо взять 1 мл маточного раствора микросоли.

1.3 Приготовление маточного раствора хелата железа. Для приготовления хелата железа необходимо растворить отдельно $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и трилон Б в дистиллированной воде, подогреть и постоянно помешивая раствор, затем их смешать, установить кислотность среды на уровне $\text{pH}=5,5$ и добавить дистиллированной воды до необходимого объема.

2. Приготовление питательной среды

2.1 В колбу ёмкостью 2 л поместить 30 г сахарозы, долить дистиллированной водой до объёма 400 мл и растворить

2.2 Добавить к раствору сахарозы 50 мл маточного раствора макросолей, 1 мл микросолей, 5 мл хелата железа, 1 мл каждого в отдельности витамина

2.3 Для приготовления агара нужно взять навеску массой 7 г, поместить в стакан и залить водой до 200 мл, растворить, нагревая на плитке при постоянном перемешивании

2.4 Приготовленный агар долить к раствору солей и питательную среду довести дистиллированной водой до объема 1 л

2.5 Установить кислотность среды на уровне 6,6 – 6,8 ед. рН. Регулирование величины рН осуществляется добавлением 2-3 капель 0,1N раствора HCL или 2-3 капель 0,1N раствора KOH.

Приготовление питательной среды Мурасиге – Скуга



Рис.2 Посуда и химически реактивы для приготовления питательной среды



Рис.3 Приготовление маточных растворов



Рис.4 Приготовление питательной среды



Рис.5 Определение рН питательной среды

Растения – доноры



Рис.6 Эустома крупноцветковая (*Eustoma grandiflorum*)



Рис.7 Хризантема многоцветковая (*Chrysanthemum Multiflora*)



Рис.8 Роза многоцветковая (*Rosa multiflora*)



Рис.9 Камелия китайская (*Camellia sinensis*)

Стерилизация оборудования и материалов



Рис.10 Стерилизация посуды и питательной среды



Рис. 11 Стерилизация растительного материала



Рис. 12 Обжигание (ФЛАМБИРОВАНИЕ) кафельной плитки и инструмента

Посадка экспланта на питательную среду



Рис. 13 Организация рабочего места



Рис. 14 Удаление верхушечной меристемы и нарезка частей экспланта



Рис. 15 Экспланты растений в пробирке (in vitro)

Асептические проростки



Рис. 16 Асептические проростки розы и эустомы



Рис. 17 Экспланты хризантемы и камелии