

Россия, Краснодарский край
Муниципальное автономное общеобразовательное учреждение
средняя общеобразовательная школа № 5 имени Анатолия Ивановича
Пахайло г. Курганинска

Россия, Краснодарский край
Муниципальное автономное общеобразовательное учреждение
средняя общеобразовательная школа № 2 имени Юрия Алексеевича Гагарина
г. Курганинск

**Культивирование Голубики высокой
на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга
с последующим микроклональным размножением сорта
(научно-исследовательский проект)**

Авторы:

Доценко Милена Александровна,
11 класс, МАОУ СОШ № 5
им. А.И. Пахайло, г. Курганинска

Силантьева Анастасия Алексеевна
9 класс, МАОУ СОШ № 2
им. Ю.А. Гагарина, г. Курганинск,
Курганинский район

Научные руководители:

Пономарева Анна Сергеевна, учитель
биологии МАОУ СОШ № 2
им. И.М. Суворова ст. Павловской.

Силантьев Алексей Николаевич,
учитель биологии МАОУ СОШ № 5
им. А.И. Пахайло г. Курганинска,
кандидат биологических наук

г. Курганинск, ст. Павловская, 2025

Содержание

№	Наименование	стр.
1.	Аннотация.....	3
2.	Введение.....	5
3.	1. Выращивание культуры тканей <i>Vaccinium corymbosum</i> L. сорта Denis Blue на питательной среде Мурасиге-Скуга в условиях личного подсобного хозяйства.....	7
4.	1.1 План исследования. Оборудование лаборатории и культуральная посуда.....	7
5.	1.2 Асептика.....	8
6.	1.3 Методики забора культуры тканей (эксплантов).....	9
7.	2. Изготовление питательных сред Мурасиге-Скуга (1962).....	11
8.	2.1 Набор компонентов для приготовления 5 литров питательной среды Мурасиге-Скуга (1962).....	11
9.	2.2 Процесс приготовления 5 литров агаризованной среды Мурасиге-Скуга (1962).....	12
10.	2.3 Дневник экспериментального наблюдения.....	13
11.	Выводы.....	14
12.	Заключение.....	15
13.	Список литературы.....	17
14.	Приложение	18

Аннотация. Микрклональное размножение растений на данный момент является самым передовым и научно обоснованным способом вегетативного размножения растений. Его применение в сельском хозяйстве открывает перед наукой новые возможности селекции растений, их генной модификации. Позволяет сохранять и восстанавливать популяции редких и исчезающих растений. Новый импульс получила возможность создания криобанка растений [1]. До недавнего времени широкое применение меристемного размножения ограничивалось требованием применения дорогостоящего оборудования, сложностью технологического процесса, наличия углублённых узкоспециализированных знаний в области биотехнологий.

Цель нашего исследования заключалась в разработке основ технологии получения каллусных культур и клонального микроразмножения *V. corymbosum* сорта Denis Blue в культуре *in vitro*, в получении стерильного материала для его использования в производственных и возможно в дальнейшем селекционных целях в условиях личного подсобного хозяйства. Исследование проводилось в следующих направлениях:

- 1) подбор эксплантов, обладающих высокими тотипотентными свойствами;
- 2) подбор состава питательной среды для культивирования изолированных эксплантов;
- 3) выявление оптимального сочетания факторов среды, необходимых для клонального микроразмножения и получения каллуса (температура, освещенность).

Для этого из подручных средств была создана биолоборатория. Используя общую методику меристемного культивирования, нами были получены каллусные клетки в условиях *in vitro*. В качестве биоматериала использовалось растение Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) сорта Denis Blue Новозеландской селекции (Австралийской). «Чистым» сортом его назвать нельзя, так как он является результатом транскрипции. Для

экспериментальных исследований микрклонального размножения Голубики высокой (*Vaccinium corymbosum* L.) (сорт Denis Blue) взята модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга, содержащая 6-БАП (0,5 мг/л) + ИУК (1 мг/л) + тиамин (0,1 мг/л) + аденин (1мг/л) + 2% сахараза. С грибковым и бактериальным заражением боролись с помощью ультрафиолетового облучения и применением комбинированного антибактериального и антимикотического препарата «Амфотерицин В».

На первом этапе для получения каллусных клеток из верхушечных почек и срезов, использовалась модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга.

На втором этапе полученные каллусные ткани были пересажены в два культуральных сосуда (пассирование). В первом сосуде содержалось повышенное содержание гетероауксина (индолил-3-уксусную кислота+индолил-3-масляная кислота) а во втором увеличенное содержание цитокинина и гиббереллина.

Данные сосуды были размещены в специальной «умной» мини-теплице при постоянных параметрах (температуре 25°C, влажности 60-70% и применении специализированной фитолампы 2000 лк.). Через 5 дней в сосуде, содержащим цитокинин и гиббереллин было замечено появление зеленых ростков (морфогенез), а в другом сосуде с гетероауксином наблюдалось появление корнеподобных выростов (ригогенез). (Приложение А, рисунок 5,6).

Таким образом, в ходе проведения эксперимента было опытным путем подтверждена возможность микрклонального размножения растений в условиях на питательной среде личного подсобного хозяйства.

Ключевые слова. Биотехнология, меристемное культивирование, регенеранты, *in vitro*, *Vaccinium corymbosum* L., сорт Denis Blue, микрочеренкование, культура тканей, клеточная инженерия.

Введение

Проект проведен в муниципальных образованиях Курганский район и Павловский районы. Сроки проведения исследования с сентября 2023 года по март 2024 года.

Клеточные и тканевые культуры позволяют исследовать такие важные для медицины проблемы, как перерождение нормальных клеток в опухолевые, всесторонне изучать их свойства, чувствительность клеток к физическим и химическим факторам, в том числе к лекарствам, а также определять потенциальную мутагенность и канцерогенность этих факторов, т.е. их способность вызывать мутации и опухоли [1].

Разработка методов длительного культивирования позволяет формировать банки клеточных линий, обладающих определёнными генетическими и биохимическими свойствами. На этой основе создаются методы криоконсервации (от греческого «криос» – холод) – сохранение в условиях глубокого охлаждения клеток, тканей и органов для трансплантации (пересадки), в качестве резервного генофонда редких и исчезающих биологических видов, а также для других целей. Клеточные культуры служат также удобными объектами для изучения проблем тканевой несовместимости и других иммунных реакций.

Таким образом, культура клеток и тканей применяется для решения как фундаментальных научных проблем (таких, например, как клеточная дифференцировка), так и различных практических задач, особенно в области медицины и селекции. Этот метод – неотъемлемая составная часть генной инженерии, клеточной инженерии, клонирования и других направлений экспериментальной биологии [2]. Все вышеперечисленное и стало той отправной точкой нашего исследования.

Гипотеза исследования.

В условиях личного подсобного хозяйства возможно выращивать растительные организмы методами клеточной инженерии.

Цель нашего исследования заключалась в разработке основ технологии получения каллусных культур и клонального микроразмножения *V. corymbosum* сорта Denis Blue в культуре *in vitro*, в получении стерильного материала для его использования в производственных и возможно в дальнейшем селекционных целях в условиях личного подсобного хозяйства. Исследование проводилось в следующих направлениях:

- 1) подбор эксплантов, обладающих высокими тотипотентными свойствами;
- 2) подбор состава питательной среды для культивирования изолированных эксплантов;
- 3) выявление оптимального сочетания факторов среды, необходимых для клонального микроразмножения и получения каллуса (температура, освещенность).

Задачи исследования:

- провести подбор необходимого оборудования;
- подобрать растительный материал для забора каллусной культуры;
- изучить методики забора раневых меристем;
- провести анализ и выбрать питательные среды для выращивания культуры тканей;
- самостоятельно изготовить питательную среду;
- провести опыты, наглядно показывающие развитие растения;
- составить рекомендации по выбору сред и методикам выращивания культуры тканей, проанализировав результаты исследования.

Методы исследования:

- анализ научной литературы по проблеме исследования;
- постановка опытов и наблюдение за процессом роста и развития культуры тканей;
- подробное ведение протоколов и описание явлений, и изменений, происходящих с предметом исследования;
- микроскопическое изучение культуры тканей.

1. Выращивание культуры тканей Голубики высокой (VACCINIUM CORYMBOSUM L.) сорта Denis Blue на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга в условиях лаборатории личного подсобного хозяйства

1.1 План исследования. Оборудование лаборатории и культуральная посуда

Для начала был составлен план исследования:

1. Подбор оборудования и необходимой культуральной посуды.
2. Асептика оборудования и инструментов.
3. Приготовление питательной среды Мурасиге-Скуга и ее модификации.
4. Подготовка эксплантов растений к высадке в питательную среду.
5. Высадка в питательную среду растительных образцов, с соблюдением строгих условий асептики для получения каллусной ткани.
6. Пересадка, полученной каллусной ткани, в отдельные культуральные сосуды, в одном из которых находится питательная среда Мурасиге-Скуга с повышенным содержанием ауксинов, в другом цитокининов.
7. Выращивание регенерантов.
8. Анализ полученных результатов.

Для проведения эксперимента нам понадобится следующее оборудование: колбы Эрленмейра, чашки Петри стерильные пластмассовые лабораторные однократного применения, медицинские скальпели, стерильные пробирки, фольга, спиртовка. Для обработки поверхности и инструментов были использованы дезинфицирующее средство «Авансепт» в форме спрея, 70- и 96-процентные раствора этилового спирта.

В качестве основы ламинарного бокса использовался металлический стеллаж, покрытый высококачественной эмалью. Сама камера бокса самостоятельно собрана из металлических полок. Стыки загерметизированы антибактериальным силиконовым герметиком бельгийской фирмы Soudal.

Фронтальная часть выполнена из силикатного стекла, закрепленного в алюминиевых направляющих с силиконовыми уплотнителями.

Собранный нами двухконтурный антибактериальный фильтр состоит из двух частей: в первом контуре применен автомобильный воздушный фильтр от автомобиля «Газель», основное назначение которого задержка пыли и мелких частиц. Второй контур изготовлен с применением медицинского облучателя-рециркулятора «СН111-115 Армед», мощностью 15 Вт. Он обеспечивает обеззараживание воздушного потока в процессе его принудительной циркуляции через корпус, внутрь которого размещена ультрафиолетовая лампа низкого давления. Данный облучатель применяется в медицинских учреждениях для обеззараживания помещения категорий I, II, III, IV и V. Производительность 30 м³/ч.

После прохождения через двухконтурный фильтр, воздушный поток направляется внутрь рабочей камеры по направлению к оператору, что позволяет защитить предметы и материалы внутри камеры от внешних и перекрестных загрязнителей в условиях «беспылевой» чистой воздушной среды.

1.2 Асептика

Стерилизация ламинар-бокса. За 20 минут до начала работы внутренний объем ламинар-бокса облучался ультрафиолетовыми лампами. Предварительно в ламинаре размещались спиртовая горелка, фарфоровый стакан с 96% спиртом, колбы с питательной средой, протертые 70% спиртом. Через 20 минут выключался УФ и включался двухконтурный биофильтр. Для работы в ламинар-боксе использовался стерильный халат, руки обрабатывались по Спасокукоцкому-Кочергину с обработкой 96% спиртом [3].

Стерилизация посуды. Стерилизацию проводили с помощью автоклавирования в медицинском бьюксе. Процесс проводился под давлением 202 кПа в течение 30 минут. (Приложение А, рисунок 7).

Стерилизация инструментов. Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и т.д.) заключается в нагревании сухим горячим жаром в сухожаровом шкафу в течение 2-х часов при 160°С.

Металлические предметы нельзя автоклавировать: под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в ее процессе инструменты (пинцеты, скальпели, микробиологические петли) еще раз стерилизовались в ламинар-боксе, помещавшись в фарфоровый стакан с 96% этиловым спиртом и затем подвергались обжигу в пламени спиртовки. Стерильный инструмент использовался только для одноразовой манипуляции. Перед повторным использованием, процесс стерилизации и обжига повторялся [4].

Стерилизация питательных сред. Питательная среда стерилизовалась автоклавированием при 1 атм. в течение 20 минут.

Стерилизация растительного материала.

Первый этап – предварительная стерилизация. Фрагменты почек без чешуй, стебля, корня или листа промывались проточной водопроводной водой и помещались в спирт (70% раствор на 1 минуту).

Второй этап – стерилизация. Простерилизованные ткани или органы погружались в стерилизующий раствор «Domestos», с последующим тщательным трехкратным промыванием материала в дистиллированной воде.

Все процедуры, связанные с использованием стерилизующих веществ, проводились в асептических условиях (ламинар-боксе). Для предотвращения бактериальной и грибковой контаминации питательной среды применялись антимикотики и антибиотики («Амфотерицин В» в сочетании с «Пенициллином»).

Третий этап – отмывание объекта от стерилизующего раствора (постстерилизация). При этом растительный материал промывался 3-4 порциями стерильной дистиллированной воды, выдерживая его в каждой порции в течение 10-15 мин.

1.3 Методики забора культуры тканей (эксплантов)

Материалом для исследования послужил сорт Новозеландской (Австралийской) селекции «Denis-Blue». В 2013-2014 году Голубика высокая сорт Denis-Blue занесена в Госреестр РФ. «Чистым» сортом его назвать нельзя, так он получен при помощи варианта транскрипции.

В качестве эксплантов использовались стерильные участки стебля и верхушечные почки для выращивания каллуса. Работа с ними проводилась на питательных средах с добавлением фитогормонов в асептических условиях, в специальном ламинарном боксе.

Для пересадки первичного каллуса или поддержания культуры использовался стерильный медицинский скальпель, с помощью которого в чашках Петри отделялись некротизированные участки тканей. Затем каллусная ткань разделялась на равные кусочки размером примерно 1x1 см. и переносилась в колбы со свежей питательной средой, соблюдая строгую стерильность. В каждую колбу помещалось по 5-7 кусочков каллуса. Чашки Петри заклеивались фольгой. Температура составляла в среднем 25°C, при круглосуточном освещении 2000 лк. В среднем на питательную среду помещалось по 10 эксплантов, эксперимент проводился в трехразовой повторности. [4]. Для предотвращения накопления фенольных соединений при длительном культивировании и потемнения каллуса применяли антиоксиданты фирмы Ronoxan A от швейцарской фирмы DSM Nutritional Products Europe Ltd. Процесс сопровождался регулярными пересадками эксплантов на эти же, но свежие среды. Из каллусной ткани получены регенеранты.

Таблица 3. Морфометрические показатели регенерантов (проростков) Голубики высокой сорта Denis Blue в культуре in vitro

Длина стебля, мм	Длина корня, мм	Длина листа, мм	Время прорастан ия, дни	% прорастан ия семян	Число листьев на проростке
Питательная среда Мурасиге-Скуга (MS) без гиббереллина					
6,0 ±0,01	2,2 ±0,01	2,4 ±0,01	45	20	1 лист
Питательная среда Мурасиге-Скуга с гиббереллином (0,5 мг/л)					

8,6 0,02	4,0± 0,03	2,9 ±0,03	7	50	3 листа
Питательная среда Мурасиге-Скуга с гиббереллином (1,5 мг/л)					
10,6 0,02	7,5± 0,01	4,2 ±0,02	7	56	4 листа
Питательная среда Мурасиге-Скуга с гиббереллином (2,0 мг/л)					
9,2 0,02	5,0± 0,02	3,0 ±0,01	30	38	2 листа
Питательная среда Мурасиге-Скуга с гиббереллином (3,0 мг/л)					
6,0 0,03	3,9± 0,02	2,7 ±0,02	30	24	1 лист

2. Изготовление питательных сред Мурасиге-Скуга (1962)

Для приготовления 1 литра питательной среды использовались инструкции и набор элементов компании «РОСМЕДБИО», которая занимается оснащением биомедицинских лабораторий. Состав питательных средств представлены ниже (таблица 3).

2.1 Набор компонентов для приготовления 5 литров питательной среды Мурасиге-Скуга (1962)

Компонент 1. Раствор макроэлементов 20-кратный на 5 л среды МУРАСИГЕ-СКУГА, стерильный (фильтрация), 250 мл/фл.

Компонент 2. Раствор микроэлементов 1000-кратный на 5 л среды МУРАСИГЕ-СКУГА, стерильный (фильтрация), 5 мл/фл.

Компонент 3. Раствор витаминов 1000-кратный на 5 л среды МУРАСИГЕ-СКУГА, стерильный (фильтрация), 5 мл/фл.

Компонент 4. ХЕЛАТ ЖЕЛЕЗА для питательных сред, 100-кратный раствор на 5 л среды Мурасиге-Скуга, стерильный (фильтрация), 50 мл/фл.

Компонент 5. САХАРОЗА, на 5 литров среды, проверена на культуре клеток растений, 150 г.

Компонент 6. АГАР-АГАР, на 5 л среды, проверен на культуре клеток растений, 35 г.

Таблица 4. Состав питательных сред, применяемых при культивировании клеток и тканей (по Бутенко Р.Г., 1999; цит. по Цыренов В.Ж., 2003) [2].

Компонент сред	Концентрация питательных сред, мг/л			
	Мурасиге-Скуга, 1962	Гамборга и Эвелегга, 1968	Уайта, 1939	Нича и Нич, 1974-1975
1	2	3	4	5
KNO ₃	1900	3000	81	950
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	72
Ca(NO ₃) ₂	-	-	142	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	500	74	185
CaCl ₂ ·H ₂ O	-	-	-	166
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	-	-
KH ₂ PO ₄	170	150	65	-68
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-22,3	10	12	-
MnSO ₄ ·H ₂ O	8,6	-	-	25
MnSO ₄ ·4H ₂ O	-	-	-	-
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	6,2	2	-	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,025	3	-	10
H ₃ BO ₄	0,25	0,075	-	0,025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,25	-	0,25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		-	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	27,8	-	-	27,8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	37,3	-	-	37,3
NaEDTA·2H ₂ O	-	28	-	-
Секвестрен 330-Fe	100	-	-	200
Мезоинозит	-	-	-	3
Аскорбиновая	-	-	-	3
Тиамин – HCl	0,5	-	-	1
Пиридоксин – HCl	0,5	-	-	-
Никотиновая	0,5	-	-	60 000
Сахароза	30 000	20 000	2000	7000

2.2 Процесс приготовления 5 литров агаризованной среды Мурасиге-Скуга (1962)

К 4 литрам теплой дистиллированной воды (30-40°C) добавили в указанной ниже последовательности компоненты 1, 2, 3 и 4. Далее растворили компонент 5. Измерив полученный pH, мы его повысили до 5.6-5.8, применив 1М раствора КОН. За изменениями показателя pH следили по показаниям прибора и программного обеспечения из набора «Точки роста».

Затем, к 500 мл дистиллированной воды в отдельной колбе добавили компонент 6 (агар-агар) и полностью растворили его при нагревании до 90°C в микроволновой печи.

К первому раствору быстро прилили горячий раствор агар-агара, довели смесь до 5 литров нагретой до 90°C дистиллированной водой и быстро, не давая остыть полученной агаризованной среде, разлили ее по культуральным сосудам. Подбор оптимальной рН регулировали с помощью КОН и НСІ в диапазоне от 4,0 до 5,8. Изменения рН измеряли при помощи прибора из оборудования «Точки роста».

Готовую питательную среду (Приложение А, рисунок 1) простерилизовали автоклавированием в течение 20 минут при 1 атм.

2.3 Дневник экспериментального наблюдения

15 января 2024 года – подготовка первичного растительного материала и посадка его в культуральную среду.

В качестве первичного растительного материала мы использовали вершинные черенки растения или апикальные почки, предварительно очищенные от чешуй Голубики высокой (*VACCINIUM CORYMBOSUM L.*) сорта Denis Blue. Для исключения случайности, мы приготовили 20 черенков и 20 почек. Затем черенки были простерилизованы по описанной выше методике и воткнуты под углом примерно 45° в предварительно приготовленную питательную среду. Апикальные почек, освобожденные от покровов, аккуратно вносили в среду. Материалы помещен в тепличные условия при температуре 25°C.

20 января 2024 года – на первичном материале появились белые образования кристаллической формы (Приложение А, рисунок 2). Произведен отбор проб полученных образцов для изучения под микроскопом. Их изучение под микроскопом подтвердило, что это каллусная ткань (Приложение А, рисунок 3).

24 января 2024 года – произведен отбор каллусной ткани. Затем каллусная ткань высажена в два культуральных сосуда. (Приложение А,

рисунок 4). В первом содержалась питательная среда Мурасиге-Скуга с повышенным содержанием ауксинов, для стимуляции ризогенеза. Во втором – с повышенным содержанием цитокинина и гибберелина, для стимуляции роста побегов и стеблевых почек.

Оба культуральных сосуда были помещены в «умную» тепличку с постоянными параметрами влажности (60%-70%) и температуры (25°C). Для подсветки использовали встроенную специализированную фитолампу с увеличенным красным и синим спектральным диапазоном.

05 февраля 2024 года – в сосуде, содержащем повышенное количество цитокинина и гибберелина, замечено появление микроскопического зеленого отростка (морфогенез) (Приложение А, рисунок 5). Во втором сосуде, где в питательной среде находилось повышенное содержание гетероауксина, при рассматривании на просвет, мы заметили корневые образования (ризогенез).

Выводы

Поставив данный эксперимент, мы на практике убедились, что в условиях личного подсобного хозяйства возможно выращивать растения микроклональным способом.

Несмотря на отсутствие дорогостоящего специализированного оборудования, вполне реально проводить различные высокотехнологичные биологические эксперименты и использовать полученные в ходе них результаты в селекции и размножении растений, и в дальнейшем получать генномодифицированные гибриды.

Заключение

Микроклональное размножение растений на данный момент является самым передовым и научно обоснованным способом вегетативного размножения растений. Его применение в народном хозяйстве открывает перед наукой новые возможности селекции растений, их генной модификации. Позволяет сохранять и восстанавливать популяции редких и исчезающих растений. Новый импульс получила возможность создания криобанка растений.

До недавнего времени широкое применение меристемного размножения ограничивалось требованием применения дорогостоящего оборудования, сложностью технологического процесса, наличия углублённых узкоспециализированных знаний в области биотехнологий [5].

Целью нашего проекта стало изучение методики и реальной возможности меристемного культивирования растительных организмов в условиях лаборатории личного подсобного хозяйства.

Для этого из подручных средств была создана биолaborатория. Используя общую методику меристемного культивирования, нами были получены каллусные клетки в условиях *in vitro*. В качестве биоматериала использовалось растение *Vaccinium corymbosum*. Культивирование происходило в модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга. С грибковым и бактериальным заражением боролись с помощью ультрафиолетового облучения и применением антимикотического препарата «Амфотерицин В» в сочетании с антибиотиком «Пенициллин».

На первом этапе для получения каллусных клеток, в питательную среду Мурасиге-Скуга были добавлены в равных долях ауксины и цитокинины. Это позволило получить каллусные клетки из растения [6, 8].

На втором этапе полученные каллусные ткани были пересажены в два культуральных сосуда. В первом сосуде содержалось повышенное содержание ауксина в форме гетероауксина (ИУК+ИМК), а во втором увеличенное содержание цитокинина (цитокининовая паста) и гиббереллина

[7, 8]. Для предотвращения накопления фенольных соединений при длительном культивировании и потемнения каллуса применяли антиоксиданты фирмы Ronoxan A от швейцарской фирмы DSM Nutritional Products Europe Ltd.

Ауксины обладают аттрагирующим эффектом – «привлекают» питательные вещества к областям повышенной своей концентрации: верхушечной меристеме (апикальное доминирование), базальной части черенка (корнеобразование), завязи (разрастание околоплодника).

Цитокинины определяют деление клеток, снятие апикального доминирования, подавление роста боковых корней, прорастание семян, почек, клубней, регулируют цветение и плодообразование, определяют задержку старения листьев, стеблевой морфогенез в культуре тканей [8].

Данные сосуды были размещены в «умной» тепличке при температуре 25°C, влажности 60-70% и применении специализированной фитолампы 2000 лк. Через несколько дней в сосуде, содержащем ауксины было замечено появление зачатков корнеподобных выростов т.е. будущего корня, а в другом сосуде наблюдалось появление зеленых зачатков побега (стеблевой морфогенез).

Таким образом, в ходе проведения эксперимента было опытным путем подтверждена возможность микроклонального размножения растений в условиях личного подсобного хозяйства и различие действия ауксина и цитокинина на морфогенез каллусных тканей.

Проблема клонального микроразмножения для Голубики высокой сорта Denis Blue может быть решена не только с помощью культивируемых вегетативных органов, но и благодаря процессу непрямого эмбриогенеза для получения каллусной ткани.

Использование методов непрямого соматического эмбриогенеза и клонального микроразмножения открывает перед нами следующие возможности:

- ускорить воспроизводство маточного материала, необходимого для производства товарной продукции, с 10-12 лет до 3-4 лет;
- получать большие количества безвирусного материала для личного подсобного хозяйства, собранного с растений, генетически все-таки в большей степени идентичных родительскому растению, за достаточно короткий период времени;
- работать в лабораторных условиях и поддерживать активно растущие растения в течение всего года;
- размножать растительный материал без контакта с внешней средой, что практически исключает влияние вредных абиотических и биотических факторов;
- достичь максимального количества растений на единицу площади;
- получать большие количества растений, которые трудно размножить или которые невозможно размножить вегетативно за короткое время;
- длительно хранить растительный материал *in vitro* (1-3 года) (без переноса на новую среду);
- создать банк для долгосрочного хранения ценного растительного материала и органов.

Список литературы

1. Калашникова Е.А. Клеточная инженерия растений / Е.А.Калашникова: Учебник и практикум. – М.: Юрайт, 2020. – 333 с.
2. Цыренов В.Ж. Основы биотехнологии: Культивирование изолированных клеток и тканей растений / В.Ж. Цыренов: Учебно-методическое пособие. – Улан-Удэ: ВСГТУ, 2003. – 57 с.
3. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений. Методические рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов. / Т.И. Дитченко – Минск: БГУ, 2007 – 25 с.
4. Урманцева В.В. Культивирование каллусных тканей на твердых средах. Методы культивирования клеток. / В.В. Урманцева – Л.: Наука, 1988. – 241 с.
5. Блажевич О.В. Культивирование клеток: Курс лекций / О.В. Блажевич – Минск.: БГУ, 2004. – 78 с.
6. Мурашкина И.А. Использование культуры клеток растений в биотехнологии лекарственных средств: учебное пособие / И.А. Мурашкина, И.Б. Васильев, В.В. Гордеева; ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России, кафедра технологии лекарственных форм. – Иркутск: ИГМУ, 2015. – 83 с.
7. Черкасова Е.И., Брилкина А.А. Работа с культурами клеток / Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Издательство Нижегородского университета, 2015. – 57 с.
8. Воронина А.В., Вишнякова А.В., Комахин Р.А. и др. Основы биотехнологии садовых культур: учебное пособие. – Москва, 2023. – 139 с.

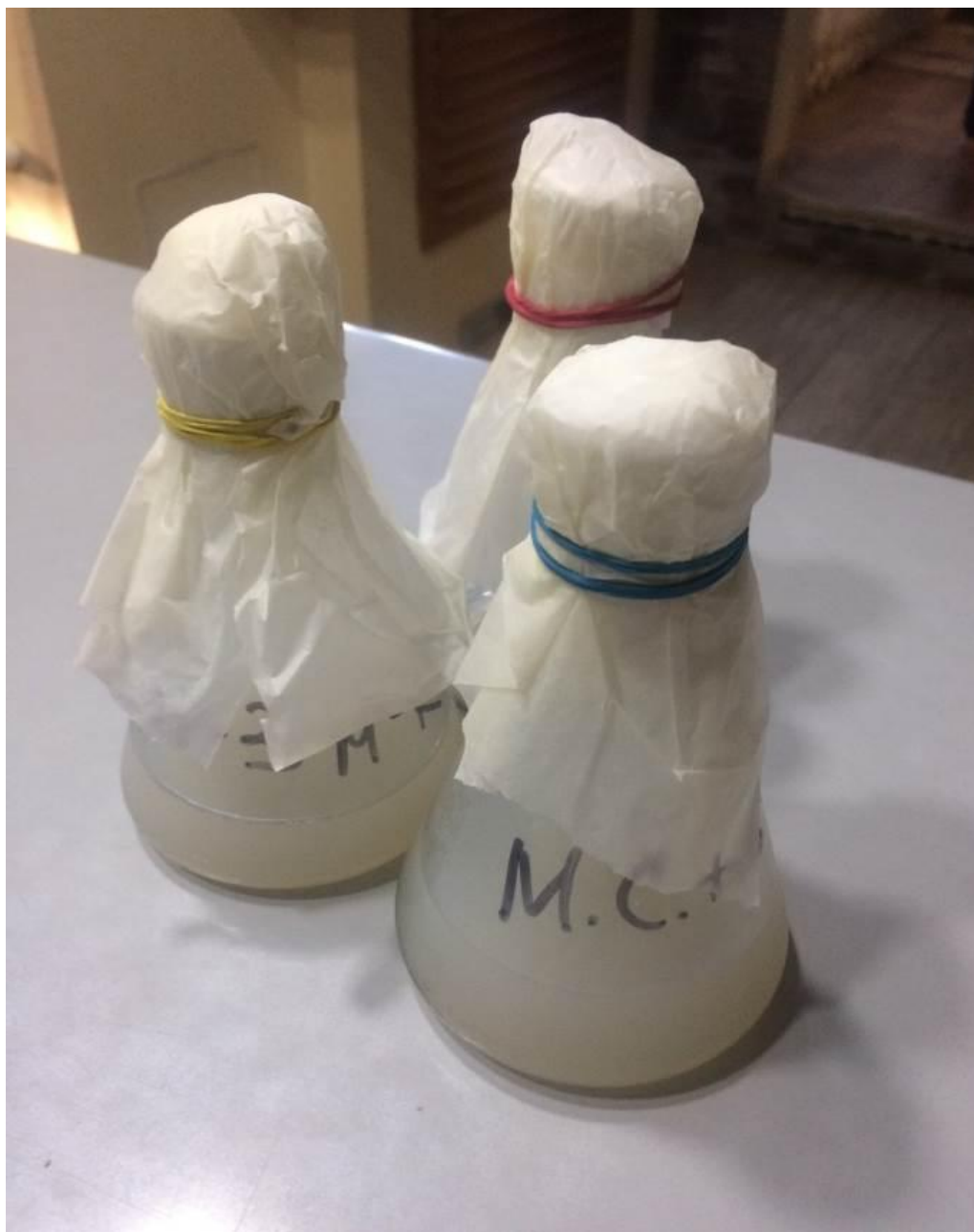


Рисунок 1. Приготовление питательной среды.



Рисунок 2. Появление каллуса на экспланте.



Рисунок 3. Посадка каллуса в колбы и чашки Петри с питательной средой.

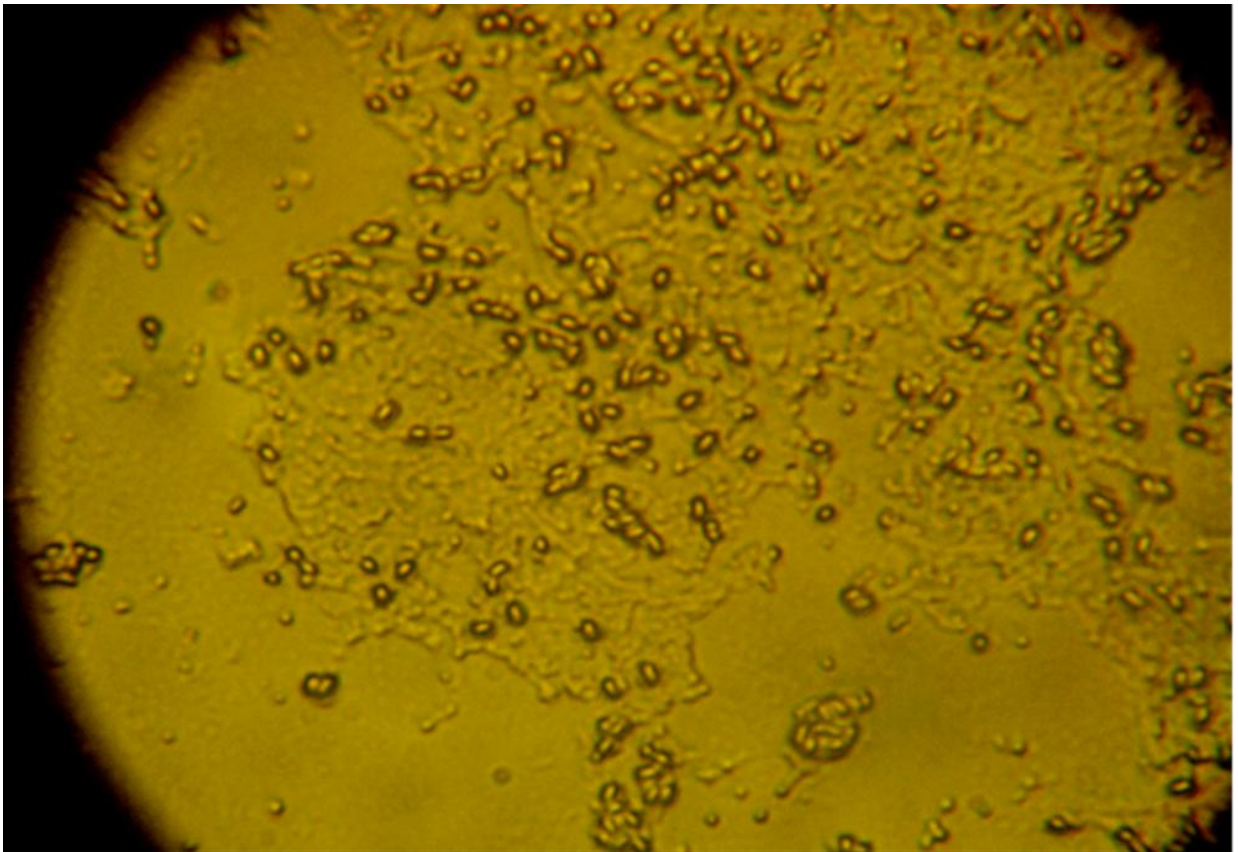


Рисунок 4. Полученный каллус под микроскопом с увеличением 40x80.

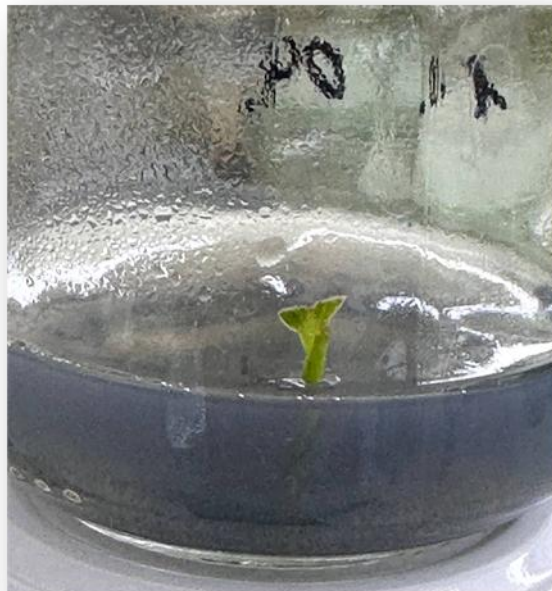


Рисунок 5. Появление корнеподобного отростка в среде с ауксином (ризогенез) и будущего побега (стеблевой морфогенез) в среде с повышенным содержанием цитокинина из недифференцированной массы каллуса.



Рисунок 6. Развитие новых растений из каллуса в пробирках с питательной средой.