

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 44.03.05 Педагогическое образование
Профиль Биология. Химия
Форма обучения очная

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ В
УСЛОВИЯХ *IN VITRO* ПРИ ОРГАНИЗАЦИИ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ СО ШКОЛЬНИКАМИ»**

Студент  Честнова Анастасия Александровна

Руководитель  Солдатов С.А.

Нормоконтролёр  Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 09.06.22 № 12)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 29.06.22 № 11)

Секретарь ГЭК  Клыченков С.В.

Пенза, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Сорты картофеля, районированных в Пензенской области	5
1.2. Метод культуры изолированных тканей	7
1.3. Методика культивирования растительных клеток на искусственных питательных средах в условиях <i>in vitro</i>	11
1.4. Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений.....	12
1.5. Роль гормональной регуляции при культивировании растений в условиях <i>in vitro</i>	17
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	21
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	25
3.1. Специфика приготовления питательных сред для культивирования растений картофеля.....	25
3.2. Особенности стерилизации и закладки растительных эксплантов.....	31
3.3. Получение микроклубней картофеля <i>in vitro</i>	35
ГЛАВА 4. ОРГАНИЗАЦИОННАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ УЧАЩИХСЯ В РАМКАХ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИИ.....	39
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	49

ВВЕДЕНИЕ

Культуры растительных клеток являются сравнительно новым объектом биологических технологий, которые основаны на получении необходимых продуктов для многих сфер человеческой деятельности.

Методы размножения растений (черенками, прививками, семенами и т.д.) люди изучали и совершенствовали в течении многих веков. Реализовывали их на практике. При этом, до сих пор размножение многих сельскохозяйственных культур затруднено. Изучение биологии в области культивирования изолированных клеток, тканей и органов клеток и тканей достигло огромных результатов. Был создан новый метод вегетативного размножения – клональное микроразмножение.

Данный метод может быть единственной и реальной альтернативой традиционным методам размножения. Культивирование растительных клеток *in vitro* позволяет сохранить, а также поддержать неограниченно долго генетические коллекции растений без изменения их наследственной информации. При этом, возможность получить ряд соматоклональных линий, сортов и форм растений с ценными хозяйственными признаками увеличивается. Новые сорта растений становятся устойчивыми к вирусам, различным болезням, гербицидам и отличаются высокими питательными свойствами, высокой продуктивностью и повышенной адаптацией к стрессовым факторам окружающей среды. В отличие от традиционных методов размножения, размеры растительного материала варьируют от 0,2-0,5 до 2,0-5,0 см.

Картофель является одной из технических пропашных сельскохозяйственных культур, которая представляет собой источник питания как для человека, так и для животных. Его также называют «вторым хлебом». Клубни картофеля используют для получения крахмала, спирта, глюкозы и каучука, которые встречаются в пищевой, текстильной и бумажной промышленности.

Для получения хорошего качества высоких устойчивых урожаев требуется правильно подобрать сорт для определенных почвенно-климатических условий. Учитываются как отрицательные, так и положительные свойства картофеля. Также, нужно обратить внимание на соответствие генетических данных различных сортов местным природным условиям. Повышение экономической эффективности картофелеводства произойдет за счет внедрения в производство новых сортов картофеля, которые имеют такие качества, как: устойчивость к жаре и засухе, высокая устойчивость к болезням, высокая продуктивность.

Проблема выбора сортов и разработки оптимальных условий для возделывания клубней картофеля является актуальной и на сегодняшний день.

Цель: «Изучить особенности культивирования растений картофеля в условиях *in vitro* при организации научно-исследовательской работы со школьниками»

Задачи:

- 1) овладеть методом культивирования растений в условиях *in vitro*;
- 2) установить сорта картофеля, которые подойдут для проведения исследований;
- 3) определить оптимальные условия стерилизации эксплантов;
- 4) изучить результаты по клубнеобразованию у растений картофеля в условиях *in vitro*;
- 5) выяснить возможность использования полученного материала в изучении школьного курса биологии.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Сорта картофеля, районированных в Пензенской области

Появление в России картофеля связано с именем Петра I, но началом применения и завоза из-за границы партии семенного картофеля является период Екатерины II.

Картофель культивировался в умеренной климатической зоне по всей стране. Пензенская область располагается на стыке трех зон: лесной, лесостепной и степной. Климат умеренно-континентальный. Характеризуется относительно теплым летом и умеренно-холодной зимой. Данные условия и высокий аграрный потенциал области позволяет получать высокое количество урожая картофеля.

На 2021 год количество урожая картофеля, по данным регионального Министерства сельского хозяйства, в среднем составляет 159 ц/га. Это на 27 ц/га больше, чем средний сбор в 2014 году (средняя урожайность на тот момент составляла 132 ц/га) [14, 16].

Рост урожайности картофеля по Пензенской области связан с расширением площадей под посевы и завозом новых сортов, более выгодных для потребителя.

В настоящее время в Пензенской области большая часть полей засеивается различными сортами картофеля для дальнейшего продовольствия. Рассмотрим самые распространенные.

Сорт «Аврора». Год допущения к использованию – 2006 [1]. Был занесен в Государственный реестр. Является неприхотливым в процессе выращивания, поэтому его предпочитают многие хозяйства. В своем составе имеет аскорбиновую кислоту, а крахмалистость составляет 13-18%. Урожайность в среднем составляет 214-396 ц/га. Имеет свойство долгое время сохранять товарный вид после выкапывания, степень сохранности

приблизительно 90%. Выкапывать можно спустя 100-110 дней с момента посадки [1, 17].

Сорт «Гала». Год допущения к использованию – 2008. Сорт способен прорасти даже на сильно обедненной почве в открытом грунте. Развитие клубней слабое, по сравнению с сортами «Аврора». Крахмалистость составляет всего 10,1-13,3%, что позволяет отнести этот сорт к диетическим. В среднем дает 216-263 ц/га урожая. Выкапывать можно на 100 день. Если провести мониторинг получения урожая данного сорта в период 2008-2021 гг., то можно сделать вывод, что урожайность выросла до 411 ц/га [14].

Сорт «Жуковский ранний». Самый распространенный сорт. Год допущения к использованию – 1993. Имеет ранние сроки созревания, что дает быстро получить урожай свежих корнеплодов. Высокая товарность (90-92%). Имеет хорошую устойчивость к различным болезням. В состав входят различные вещества: аминокислоты, крахмал, большое количество витаминов (В, С, Н, РР). Характеризуется скороспелостью (60-80 дней). Является высокоурожайным сортом, так как его показатели составляют 400-450 ц/га.

Сорт «Рябинушка». Выведен отечественными селекционерами в 2007 году. В этот же год был допущен к использованию. Содержание крахмала составляет 11,8-15,1%. Красный цвет кожуры клубней говорит о высоком содержании антоциана. Время созревания составляет 80-90 дней. Корнеплоды крупные, урожайность – 400 ц/га.

Сорт «Батя». Год допущения к использованию – 2009. Характеризуется высокой устойчивостью к возбудителю рака картофеля и к другим часто встречающимся болезням (возбудитель фитофтороза и морщинистой мозаики). Урожайность составляет 458 ц/га. Крахмалистость – 15,6-18,2%. Товарность продукта после выкапывания сохраняется на 83-88%. Срок созревания около 80 дней [14, 17].

Сорт «Бабушка». Самый молодой сорт, год допущения к использованию представляет 2018 г.. максимальная урожайность составляет 273 ц/га, в среднем товарная урожайность – 175-270 ц/га. Содержание крахмала – 15,5-

18,5%, товарность – 93%. Имеет восприимчивость к золотистой картофельной цистообразующей нематоде, к возбудителю фитофтороза. Устойчивость к засухе и к морщинистой полосчатой мозаике высокая. Сорт среднеранний (70-90 дней) [16].

Сорт «Матушка». Год допуска к использованию – 2013. Является среднеспелым сортом (90-93 дня). Максимальная урожайность 322 ц/га, а товарная урожайность составляет 171-301 ц/га. Крахмалистость – 16,3-18,9%. Данный показатель выше, чем у других сортов. Товарность урожая составляет 85-95%. Наиболее устойчив к засухе и хорошо адаптирован к колебаниям погодных условий. Крепок к фитофторозу, полосчатой и морщинистой мозаике, скручиванию листьев. Сорт восприимчив к золотистой картофельной цистообразующей нематоде [16].

1.2. Метод культуры изолированных тканей

В настоящее время человечество является свидетелем огромного биотехнологического взрыва, который связан с рождением и развитием мобильной, компактной, высокоэффективной отрасли производства. Она базируется на методах генетической, а также клеточной инженерии.

Биотехнология – ключ к прогрессу, который включает в себя использование биологических процессов и агентов для получения полезных для человека продуктов, в том числе лекарственных препаратов. Это наука, которая формируется на стыке знаний молекулярной биологии, химической технологии, генетической и клеточной инженерии, микробиологии и множества других [37]. Биологическими объектами для изучения могут использоваться культуры тканей (при изготовлении медицинских препаратов, возделывании в сельском хозяйстве), отдельные органы животных (из поджелудочной железы свиней возможно получение такого гормона, как инсулина). Чаще используют животные и растительные клетки, а также одноклеточные микроорганизмы [36].

Работа с культурой клеток и тканей в условиях *in vitro* сыграли огромную роль в развитии биотехнологии.

Метод культуры изолированных тканей представляет собой выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах (*in vitro*), которое происходит в стерильных условиях.

Понятие «культура клеток, тканей и органов растений» характерно для следующих асептически выращенных частей растения: изолированных органах (части молодых цветков, плодов, меристемы побегов, кончики корней), изолированных зародышей, каллусной ткани, культур протопластов.

Набор растительных объектов, которые можно использовать для проращивания в условиях *in vitro*, достаточно велик. Используются, чаще всего, экспланты разных органов, тканей и клеток семенных растений. Объясняется это тем, что в жизни человека покрытосеменные и голосеменные играют огромную роль. Наиболее удачными объектами для исследования являются двудольные и однодольные травянистые растения, а также различные зерновые культуры. Реже используются культуры древесных растений (особенно голосеменных) [33, 36].

Мхи, лишайники и папоротники также могут выступать в роле объектов для культивирования *in vitro*. Многоклеточные водоросли плохо поддерживаются в культуре, хотя они являются перспективными источниками фитопродуктов в медицине и пищевой промышленности.

В настоящее время исследуются все высшие растения. Однако многие культуры требуют создания различных условий для роста в случае разных таксонов.

Существует два основных типа клонального микроразмножения:

- 1) Приведение в действие уже существующих меристем (спящие и пазушные почки в стебле, апекс стебля);
- 2) Индукция возникновения почек или эмбриоидов *de novo*.

Тотипотентность имеет такое понятие, как «способность клетки реализовывать генетическую информацию, обеспечивающую ее

дифференцировку и развитие до целого организма». Это уникальное свойство, которое лежит в основе метода культуры изолированных клеток и тканей. Например, у растений данная характеристика реализуется при заживлении ран. В результате на раневой поверхности происходит развитие каллуса («Мозоль»). Это недифференцированные клетки, которые также могут образовываться при прививках в местах срастания подвоя и привоя [19, 27].

Добытый в результате морфогенеза *in vitro* растение приобретает название растения-регенеранта.

Многие растения могут не проявлять свою тотипотентность в природных условиях. Из-за высокой специализации клеток некоторые однодольные растения утрачивают умение к раневой реакции и вегетативному размножению. Благодаря экспериментам в условиях *in vitro* возможна реализация супрессированной *in vivo* тотипотентности.

Для решения сложных теоретических и практических задач биологии также используют метод культуры изолированных клеток и тканей. Он имеет такие положительные моменты как:

- 1) Преимущество в быстром получении достаточной массы в асептических условиях;
- 2) Контроль над важными параметрами условий выращивания;
- 3) Простота клеточных и тканевых моделей;
- 4) Возможность проследить состояние клеток на уровне первичных элементарных процессов в ответ на любые воздействия.

Благодаря клеткам растений *in vitro* возможно изучение многих физиологических, биохимических процессов и генетики растительных организмов. Основной проблемой физиологии растений является изучение этапов роста, морфогенеза и клеточной дифференциации. Решение возможно за счет моделирования этих процессов в культивировании клеток и тканей с внедрением методов генетики, а также молекулярной биологии [15]. Это способствует изучению таких процессов, как растяжение и деление клеток,

каллусообразование, дифференцировка клеток и тканей и морфогенез под влиянием фитогормонов, внутренних и внешних факторов.

Метод культуры изолированных тканей разрешает создать модель для изучения опухолевого роста и выявить структурные и метаболические особенности опухолевой ткани. Позволяет сравнить полученную ткань с нормальной растительной. Также культура клеток и тканей может служить моделью для исследования устойчивости растений к различным неблагоприятным факторам окружающей среды:

- 1) Абиотические факторы – факторы неживой природы: низкая или высокая температура, засоление почв, кислая или щелочная среда и т.д.);
- 2) Биотические факторы – формы воздействия живых существ друг на друга: патогены разного происхождения, вызывающие болезни растений и т.д.

На культурах клеток изучаются различные аспекты физиологии, фитопатологии, а также биохимический состав больного растения.

Данный подход дает возможность рассмотреть прямую реакцию растительной клетки на воздействие какого-либо патогена. Однако, стоит помнить, что клетки в системе *in vitro* и в живом организме не всегда равноценны при использовании культуры клеток и тканей для моделирования физиологических процессов [8, 2].

Культуры изолированных клеток и тканей играют огромную роль в развитии биотехнологии. Во-первых, это связано с тем, что изолированные растительные клетки способны продуцировать алкалоиды, стероиды, эфирные масла, гормоны и т.д. Эти вещества вторичного синтеза применяются в медицине, косметики, парфюмерии и других отраслей промышленности. Помимо биосинтеза различных соединений, культивируемые клетки способны к биотрансформации – дешевые предшественники превращаются в ценный конечный продукт.

Во-вторых, культуры изолированных тканей используются для размножения посадочного материала, а также его оздоровления. Для

получения одной сотни тысяч растений достаточно одной меристемы. Создается система безвирусного материала растениеводства путем получения хозяйственно ценных оздоровительных сортов картофеля, овощных, плодовых, декоративных растений и других культур.

В-третьих, культуры изолированных клеток и тканей используются в селекции растений для расширения генетического материала, ускорения и облегчения селекционного процесса, а также для создания новых форм растений [6,3].

1.3. Методика культивирования растительных клеток на искусственных питательных средах в условиях *in vitro*

При культивировании растительных эксплантов выделяют 2 типа культур: непроточные культуры и проточные культуры.

Проточные культуры сохраняют настоящие гомеостатические условия с сохранением концентраций питательных веществ и числа клеток. Происходит постоянное внесение среды в культуру клеток. Одновременно идет процесс удаления равного объема питательной среды с клетками.

Культура, при которой клетки вводят в определенный объем питательной среды называется непроточной культурой. В процессе роста клеток идет всасывание питательных веществ и накопление метаболитов. Следовательно, питательная среда должна меняться. Это приведет к изменению клеточного метаболизма, который также принято называть физиологической дифференцировкой. В течении некоторого времени, в результате обеднённой питательной среды идет прекращение такого процесса, как пролиферация клеток.

Для увеличения продолжительности жизнеспособности таких культур применяют следующие способы:

1) постоянный, так как объем культуры способен увеличиваться с постоянной низкой скоростью, при этом небольшие порции растительных клеток периодически удаляются;

2) прерывистый. Данный способ характеризуется тем, что часть растительной культуры заменяется равным объемом свежей стерильной питательной средой;

3) перфузионный. При использовании этого способа осуществляется постоянное внесение свежей стерильной питательной среды в культуры изолированных клеток и тканей и одновременно происходит удаление равного объема уже использованной среды. Перфузию делят на открытую, когда происходит полное удаление среды, и закрытую, когда питательная среда прогоняется по дополнительному сосуду, где насыщается кислородом и азотом и восстанавливается рН, после насыщенную среду возвращают обратно [29, 20].

1.4. Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений

Процесс культивирования одиночных изолированных клеток способствует получению клона и изучению генетической изменчивости клонового материала. Источниками одиночного экспланата могут быть:

- 1) клеточные суспензии, которые производятся на жидкой питательной среде;
- 2) изолированные протопласты после регенерации клеточной стенки;
- 3) мацерированные ткани растительных организмов.

С культурами изолированных клеток и тканей работают по разным направлениям во многих странах: России, Азии, Японии, Китае, Северной и Южной Америке, Индии. Тем самым развивая и совершенствуя такую науку, как биотехнология, дополняя ее новыми открытиями. Благодаря многочисленным опытам было определено, что изолированные клетки и

ткани могут успешно расти и развиваться при наличии благоприятных условиях и отсутствии конкуренции с микроорганизмами.

Стерильные экспланты, которые размещают на питательную среду, необходимо отгородить от пагубного влияния микроорганизмов. Для этого следует соблюдать асептические условия.

При работе с эксплантами в условиях *in vitro* стерилизации подвергаются следующие объекты:

- 1) рабочая комната (лаборатория), в которой производится посадка культур, наблюдения и последующая фиксация результатов;
- 2) одежда;
- 3) руки перед работой обрабатываются антисептиком;
- 4) посуда;
- 5) необходимые инструменты и материалы;
- 6) питательная среда;
- 7) объекты культивирования.

При несоблюдении стерильных условий, независимо от оснащенности рабочего места и наличии большого количества эксплантов, получение положительных результатов при проведении эксперимента сводится к нулю.

Для поддержания стерильных условий, работу с изолированными клетками проводят в специальном оборудовании – ламинар-боксе. Он представляет собой шкаф с прозрачным ограждением рабочей зоны из закаленного стекла. Для удобства работы встроена подсветка. Рабочая поверхность изготовлена из нержавеющей стали. Внутри бокса создаются стерильные условия за счет наличия фильтрационной воздушной системы и УФ лампы. Для создания полных асептических условий желательно протереть рабочую зону 20%-ным водным раствором фенола или 70%-ным этанолом. На внешней стороне расположена система электроуправления [32, 40, 29].

Сушильный шкаф играет огромную роль в стерилизации посуды. Предварительно ее промывают и заворачивают в бумагу или фольгу.

Помещают в сушильный шкаф и обрабатывают чистую посуду сухим жаром при температуре 160 °С.

Рабочие инструменты обрабатывают 96%-ным спиртом. Перед каждым использованием инструмента, его прокалывают над пламенем спиртовки.

В зависимости от вида культуры подбирают оптимальный состав многокомпонентной питательной среды. Для лучшего роста и развития эксплантов в ее состав должны входить минеральные соли, фитогармоны, витамины и углеводы. При недостатке микроэлементов в питательной среде понижается интенсивность роста тканей на 35 %. При последующей пересадке высока вероятность гибели культуры. Часто используемые питательные среды для микроклонального размножения: среды Гамборга, Хеллера, Мурасиге и Скуга и другие [11].

Питательную среду стерилизуют в автоклаве. Это герметичное устройство, электрический паровой стерилизатор, в котором происходит обезвреживание за счет пара высокого давления. Продолжительность стерилизации зависит от объема работы (количества инструментов, объема среды в сосуде). Автоклавирование является высокоэффективным методом стерилизации, предотвращает распространение чужеродных микроорганизмов.

Способ стерилизации питательной среды в автоклаве не всегда эффективен. Растворы с термолабильными соединениями (белки, аминокислоты, антибиотики, растительные экстракты) способны разрушаться при высокой температуре или при наличии высокого давления. В таком случае используют метод холодной стерилизации. Он характеризуется внесением в используемое соединение (например, аминокислоты) этилового эфира, который удаляют при понижении температуры. Образовавшийся остаток растворяют в дистиллированной воде и в асептических условиях дополняют к остальной простерилизованной среде.

Помимо стерилизации посуды, инструментов, питательной среды и помещения необходимо выбрать метод стерилизации и для самой культуры.

Растительный эксплант также несет на себе эпифитную микрофлору (многочисленные стрептококки, картофельная и сенная бациллы, актиномицеты и т.д.), которая может является источником заражения [18].

Стерилизацию эксплантов проводят при применении таких растворов, как спирт, перекись водорода, антибиотики, диацид, а также растворами активного хлора (хлораминов, сулемой, гипохлоритом натрия и кальция) и брома (бромная вода).

Имеются рекомендации, которые необходимо учитывать при выборе стерилизующего средства:

- 1) обезвреживающий агент должен быть эффективен по отношению ко всем губительным микроорганизмам, при этом не вредить растительному экспланту;

- 2) обезвреживающее вещество должно легко промываться стерильной дистиллированной водой;

- 3) необходимо точно подобрать вид обезвреживающего агента по отношению к растительному экспланту. Нужно учитывать концентрацию стерилизующего вещества и его длительность применения на инфицированную ткань [7, 18].

Если все пункты соблюдаются, то эффективность стерилизующего агента не превышает 1-4%. Это говорит о том, что данный способ обезвреживания растительного экспланта защищает его только от поверхностной инфекции.

При наличии внутренней инфекции необходимо использовать антибиотики. Чаще всего их используют для стерилизации субтропических и тропических растениях, которые отличаются от других наличием крупной сосудистой системы.

Антибиотики – термолабильное вещество, которое необходимо стерилизовать только при помощи фильтрования и добавления в охлажденную среду. Данный способ заключается в фильтровании самого термолабильного раствора через специальные антисептические микроскопические фильтры. Их

диаметр не превышает 0,45 мкм. Данные фильтры задерживают вирусы и бактерии. После стерилизации, компоненты вносят в проавтоклавированную, главное охлажденную до 40 °С, основную среду.

Чаще используют антибиотик широкого спектра антимикробного действия, который может реагировать на несколько микроорганизмов одновременно. К примеру, цефалоспарины обладают бактерицидными свойствами по отношению к энтеробактериям, пенициллин образующим стафилококкам. Бывают случаи, когда действие такого антибиотика не несёт положительного результата. Тогда применяют несколько видов антибиотиков, каждый из которых воздействует на определенный микроорганизм [7].

Перед тем как начать стерилизацию растительного экспланта необходимо провести следующие манипуляции:

- 1) инфекционную ткань необходимо промыть в проточной воде с применением мыльного раствора;
- 2) остатки мыльного раствора вымывают стерильной дистиллированной водой;
- 3) растительный эксплант помещают в 70 %-ный раствор этилового спирта. Время погружения зависит от типа экспланта и его размера. Это повысит уровень стерильности ткани.
- 4) повторно промывают эксплант стерильной дистиллированной водой;
- 5) помещают растительный эксплант в стерилизующий раствор и отмечают время начала стерилизации. Промежутки времени, необходимые для стерилизации определенного объекта, представлены в табл. 1.
- 6) после истечения времени стерилизации растительный эксплант промывают несколько раз в дистиллированной воде (по 15 минут в каждой порции);
- 7) проводим посадку культуры в стерилизованную питательную среду.

Таблица 1 – Стерилизующие вещества растительного материала

Объект	Время стерилизации, мин			
	Диацид 0,1%	Сулема 0,1%	Гипохлориды Na, Ca 5-9%	Перекись водорода 10-12%
Семена сухие	15-20	1-15	15-20	12-15
Семена набухшие	6-16	6-8	10-15	6-8
Ткани стебля	20-40	20-25	20-25	0,1
Листья	1-3	0,5-3	3-6	3-5
Апексы	1-10	0,5-7	3-15	2-7

Если на 2-3 сутки после посадки растительного экспланта мы наблюдаем наличие быстроразмножающихся микроорганизмов, значит была нарушена или неправильно подобрана методика стерилизации данного объекта. Наличие в питательной среде колоний микроорганизмов (или грибок), которые распределены в толще агара, а также помутнение самой среды (цвет разбавленного молока) говорит об инфицировании питательной среды. При неправильной стерилизации самой культуры на поверхности агарового слоя вокруг экспланта появляется ореол чужеродных микроорганизмов. Чаще всего сама ткань инфицирована спорами или микроорганизмами, которые медленно растут и размножаются. Тогда мы не сможем увидеть заражение в первые дни после посадки. Обнаружим отрицательный результат только при дальнейшем размножении ткани или переносе ее на свежую питательную среду [20].

Таким образом необходимо сочетать методику стерилизации и объект стерилизации, чтобы не допустить загрязнения.

1.5. Роль гормональной регуляции при культивировании растений в условиях *in vitro*

Гормональная регуляция при культивировании растений в условиях *in vitro* происходит за счет применения фитогормонов, которые действуют на

процессы деления клеток и их роста путем растяжения, на строение и созревание плодов, формирования пола, транспирацию, устойчивость к стрессовым условиям, состояние покоя. Следовательно, они контролируют протекающие процессы внутри растительного организма и индивидуальное развитие в целом.

Фитогормоны – это регуляторы роста и развития биологического происхождения, которые обеспечивают взаимодействие органов, тканей и клеток; это низкомолекулярные органические соединения, которые вырабатываются растительными организмами для поддержания жизнедеятельности. Они способны стимулировать морфогенетические и физиологические процессы в растениях.

Применение регуляторов роста обеспечивает успешный рост и развитие культур клеток растений. Их эффект зависит от действий как внутренних, так и внешних факторов. Фитогормоны различных растений отличаются по своей химической структуре, следовательно, их можно разделить на основе их действия на физиологические процессы растений и по общему химическому строению.

Фитогормоны по своей химической природе делятся на 2 группы:

- производные мевалоновой кислоты: цитокинины, гиббереллины, брассины, абсцизины, фузикокцин;
- производные аминокислот: этилен – из аланина и метионина, ауксины – из триптофана.

Известно, что растения вырабатывают фитогормоны для сохранения работы своих физиологических процессов и влияния на свою микробную среду. Микроорганизмы также способны вырабатывать своих гормоны в ответ на действие растений-хозяев.

Биологический синтез гормонов происходит в различных частях растительного организма: индолил-3-уксусная кислота образуется в апексах побегов, каурин и абсцизовая кислота реализуются в листьях, кинетин – в апексах корней, гиббереллины – в зоне растяжения корня [14, 20].

Фитогормоны способны выполнять различные функции. В зависимости от действия на растительный организм, их подразделяют на 5 групп:

- 1) ауксины;
- 2) цитокинины;
- 3) гиббереллины;
- 4) этилен;
- 5) абсцизины.

В культуре изолированных тканей ауксины способствуют росту клеток путем растяжения. При повышении концентрации данного фитогормона происходит деление клеток. Если в питательную среду будут включены ауксины и цитокинины, то произойдёт процесс формирования систем органов – органогенез. Выделяют ауксины природного происхождения, такие как β -индолилуксусная кислота (ИУК), и синтетического: индолил-3-масляная кислота (ИМК), индолил-3-пропионовая кислота (ИПК), нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4-дихлофеноксиуксусная кислота (2,4-Д).

Среди цитокининов также выделяют природные (зеатин, кинетин, NN-дифенилмочевина) и синтетические (6-бензиламинопурин – 6-БАП).

Гибберелин способен синтезировать цитокинины и ауксины, а также принимают участие в стимуляции роста клеток путем растяжения. Главный представитель данного фитогормона – гибберелловая кислота.

Этилен и абсцизовая кислота (АБК) ингибируют деление клеток и процессы роста. При сочетании с цитокининами и хлорхолинхлоридом приводят к органогенезу (образование микроклубней) [31].

Рост разных тканей и клеток в определенной степени зависит от снабжения и действия фитогормонов, так как эти структуры отличаются по способности к синтезу и метаболизму отдельных типов регуляторов роста.

В результате выделяют следующие группы тканей по отношению к потребностям внешних ауксинов и цитокининах:

- 1) ткани, для которых в питательных средах из фитогормонов необходимы только ауксины (экспланты корней цикория);

- 2) ткани, нуждающиеся только в цитокининах;
- 3) ткани, которым нужны только ауксины и цитокинины;
- 4) опухолевые ткани, которые не нуждаются в фитогормонах.

Для полноценного развития культур в условиях *in vitro* необходимы различные фитогормоны, в том числе и ауксины с цитокининами.

Чаще всего, в качестве ауксинов, в работе используют β -индолилуксусную кислоту (ИУК) концентрацией 1-30 мг/л, нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 0,1-2 мг/л, 2,4-дихлофеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в концентрации 1 мг/л. По приведенным концентрациям можно сделать вывод, что 2,4-Д в 300 раз более активна чем ИУК, но ИУК в 30 раз менее активна, чем НУК.

В роли источников цитокининов используют зеатин, кинетин и 6-бензиламинопурин (6-БАП). При этом 6-БАП и зеатин наиболее активные в процессе поддержания роста культур в условиях *in vitro*. Концентрации этих веществ у различных растений сильно варьируются. Чтобы определить нужное содержание фитогормонов, необходимо использовать метод математического планирования исследования [22, 13].

Генетический аппарат организма имеет тесную связь с фитогормонами. Гормоны способны влиять на степень передачи эпигенетической информации (метилирование ДНК) и связываться с белками-репрессорами, что ведет к активации структурных генов и образованию некоторых ферментов. Значит, при изменении соотношения фитогормонов в среде, можно изменить процессы генетического аппарата клеток и тканей: редифференциацию и дифференциацию [10, 40].

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Картофель – *Solanum tuberosum* L. – травянистое однолетнее растение, которое относится к семейству Пасленовые – *Solanaceae*.

Картофель имеет «товарную» часть – клубни, которые являются укороченными видоизмененными побегами. Они богаты витамином С, в меньшей степени имеются витамины группы В. Содержат большое количество аминокислот. Картофель характеризуется высоким уровнем калия. Данное вещество используется в приготовлении медицинских препаратов для лечения гипертонии, так как способствует расширению сосудов. В большей степени входит в состав лекарств, которые используют при ацидозе, цистите и необходим людям, страдающим подагрой. Помимо калия в клубнях картофеля большое содержание фосфора, магния, цинка, кальция и цинка. Эти вещества способствуют укреплению и росту корней.

На клубнях имеются, в среднем, примерно 12 глазков, состоящих из зачатков листьев и спящих почек, которые мы будем использовать при посеве в условиях *in vitro*.

Объектом исследования данной работы взяли картофель двух сортов: «Утенок» и «Матушка» (рис 1).

Сорт «Матушка» отличается высокой урожайностью, которая составляет 322 ц/га, из которых около 170 ц/га составляет урожай для торговли. Год допущения к использованию – 2013. Это на 15 лет позже, чем год допуска сорта «Утенок» (допущен в использование в 1998 году) [1].

Сорт картофеля «Утенок» является раннеспелым, столовым. Вегетационный период не превышает 90 дней. С собой представляет крупные клубни, овальной формы, чуть удлинённые. Характеризуется наличием мелких глазков. Кожура имеет гладкую поверхность желтоватого цвета. Мякоть желтая. Клубни формируются спустя 52-55 дней после посадки. Сохранность хорошая. Имеет высокую устойчивость к таким болезням как: рак, парше, проволочник. Средняя устойчивость при вирусных болезнях и

менее устойчив сорт к фитофторозу. Имеет высокую урожайность – 350-400 кг/сотку. При этом сорт «Утенок» является засухоустойчивым, жароустойчивым и устойчив при избытке влаги [16].

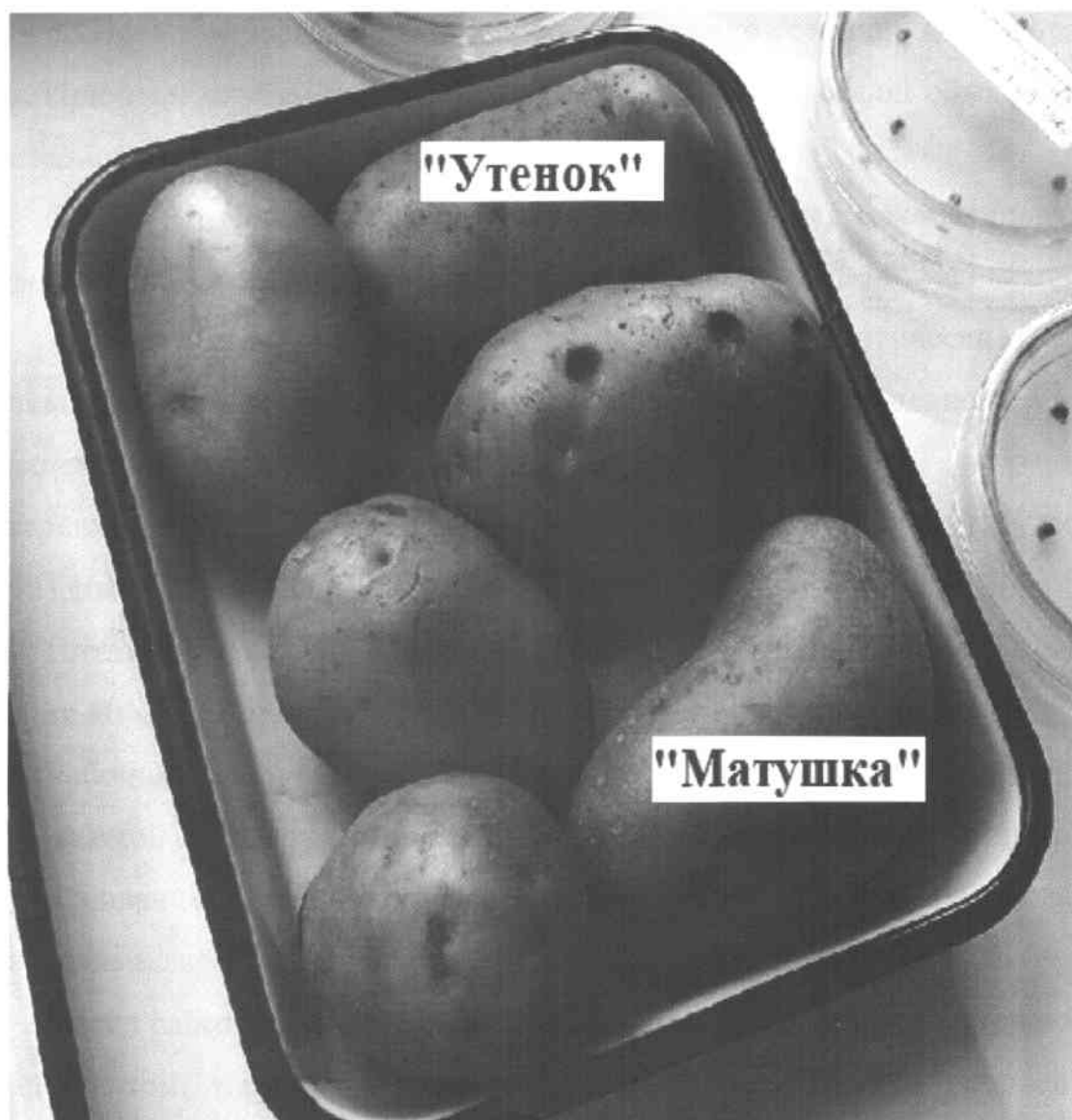


Рисунок 1. Сорта картофеля «Утенок» и «Матушка»

Содержание крахмала у сорта «Утенок» не превышает 19,5%. Это больше, чем содержание у «Матушки» (содержание крахмала 16,3-18,9%).

Сорт картофеля «Матушка» характеризуется как среднеранний. При этом клубни образуются намного раньше, чем у «Утенка», спустя 50-53 дня после посадки. Клубни имеют характерный цвет – красно-фиолетовый. По размеру – крупнее, но более округлы по сравнению с клубнями сорта

«Утенка». Поверхность кожуры шершавая. Малочисленные мелкие глазки, усаженные на средней глубине. Мякоть белее, чем у сорта картофеля «Утенок». Хорошее качество при длительном хранении. Данный сорт слабо приспособлен к вирусным заболеваниям, но хорошо устойчив к фитофторозу, раку. При этом клубни легко поражаются действием паршой обыкновенной. Вегетационный период составляет 90-93 дня [14].

Сорта «Утенок» и «Матушка» приспособлены для механизированного возделывания и дальнейшей уборки.

Для проведения работы необходимо сохранять асептические условия: работать только стерильными инструментами в стерильном светлом помещении (ламинар-боксе), при комнатной температуре, использовать обезвреженную посуду и свежую стерильную питательную среду (Мурасиге и Скуга) для посадки культуры.

Питательную среду помещаем в автоклав. Стерилизацию проводим в течении 40 минут при температуре 122 °С и при давлении 1 атм.

Рабочие инструменты и посуда стерилизуется в сухожаровом шкафу. При каждой манипуляции с исследуемыми эксплантами проводится обезвреживание металлической части инструментов (пинцет припаровальная игла, скальпель) путем прокалывания в пламени спиртовки.

Перед работой необходимо обработать руки 0,05 %-ым хлоргексидином биглюконатом. Картофель промыть мыльным раствором и сполоснуть в проточной воде.

Верхушечные почки картофеля брали как растительный эксплант. Стерилизовали их в асептических условиях (в ламинар-боксе). Обработывали 0,5 %-ым раствором KMnO_4 (марганцовокислый калий) и 1 %-ым раствором CuSO_4 (медный купорос). В каждом растворе растительный эксплант находился по 10 мин. и 15 мин. соответственно.

Следом помещали верхушечные почки в дезинфицирующие растворы. Первое вещество – 70%-ый раствор $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (этанол). В нем эксплант находится 1 мин. После, помещаем его на 3 минуты в перекись водорода (H_2O_2). Когда

прошли все этапы, то изолированную культуру следует промыть дистиллированной водой (5-6 раз).

Процесс культивирования проводим в асептических условиях и в стерилизованную питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением гибберлиновой кислоты (2 мг/л), глюкозы (20 г/л) и зеатина (0,5-1,5 мг/л).

Опыт по культивированию растительных эксплантов в условиях *in vitro* проводили 3-4 раза и анализировали по 10 растений, чтобы получить более точных и положительный результат.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Специфика приготовления питательных сред для культивирования растений картофеля

Основными компонентами любой питательной среды, которая используется для культивирования клеток и тканей в условиях *in vitro* являются микроэлементы, макроэлементы, витамины, фитогормоны и источники углерода, железа, хлорид кальция. При этом для каждого растения подбирается своя концентрация основных веществ. Для целей микроклонального размножения в условиях *in vitro* используют такие среды, как Мурасиге и Скуга, Гамборга, Хеллера и др. [22].

Для нашей работы была подобрана питательная среда Мурасиге и Скуга с высоким содержанием неорганического азота, для того, чтобы запустить процессы органогенеза. Следовательно, это даст положительный результат в получении микроклубней картофеля сортов «Матушка» и «Утенок».

Приготовление питательной среды Мурасиге и Скуга начинается со сбора маточных растворов. Концентрированные растворы готовим в специальных стеклянных колбах для реактивов на 1 л. После приготовления, их необходимо хранить в холодильнике.

Минеральный состав питательной среды представлен микроэлементами (бор, медь, цинк, молибден и др.) и макроэлементы (азот, сера, калий, кальций, магний, фосфор и т.д.). Соответственно, подготавливаем два концентрированных маточных раствора по табл. 2.

Для начала, в стеклянную колбу наливаем 0,5 л. дистиллированной воды. После, добавляем все необходимые вещества, содержащие микроэлементы. Перемешиваем до полного растворения веществ. Доводим маточный раствор до полного объема (1 л). Повторяем манипуляцию с другими маточными растворами.

Таблица 2 – Приготовление концентрированных (маточных) растворов для питательной среды Мурасиге и Скуга

№ п.п.	Компонент среды	Количество вещества
Маточный раствор макросолей (г на 1 л маточного раствора)		
1.	KNO_3	37,5
2.	NH_4NO_3	33
3.	KH_2PO_4	3,4
4.	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,4
	или MgSO_4 безводный	3,6
5.	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8,8
	или CaCl_2 безводный	6,65
Маточный раствор микросолей (мг на 100 мл маточного раствора)		
6.	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
7.	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
8.	H_3BO_3	620
9.	$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2410
	или $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230
10.	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860
11.	KJ	83,5
12.	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5
13.	FeSO_4	557
	Na_2 ЭДТА	745

Для культивируемых тканей необходимы такие ресурсы как энергия и углерод. В роли этих источников мы используем сахарозу (20 г/л) и глюкозу (20 г/л). Сахароза при стерилизации сред путем автоклавирования разлагается до моносахаридов, которые клеткам легче будет усвоить. Также можно

использовать галактозу и фруктозу. В зависимости от типа культуры, каждый ресурс имеет свои концентрации [13].

Чтобы активизировать стимуляцию биохимических процессов в клетках мы использовали аскорбиновую кислоту и витамины группы В: никотиновую кислоту (PP), фолиевую кислоту, рибофлавин, биотин, мезоинозит, пиридоксин. Вещества вносились в определенном количестве (табл. 3).

Витамин С – аскорбиновая кислота – вторичный метаболит. В совокупности с фитогормонами действует на процессы роста и развития. Участвует в образовании ответа на различные (биотические и абиотические) факторы стресса. Выступает как регулятор экспрессии генов.

Витамин В1 – тиамин – производное тиазола и пиримидина. Усиливает процесс превращения углеводов (обмен углеводов). Активная форма витамина В1 – тиаминпирофосфат.

Витамин В2 – рибофлавин. Играет роль в процессе фотосинтеза, а также активирует рост растения.

Витамин В3 (PP) – никотиновая кислота. Усиливает углеводный и липидный обмены и участвует во многих окислительно-восстановительных реакциях.

Витамин В6 – пиридоксин. Растительные организмы способны синтезировать его и сами. Они используют его как защиту от ультрафиолетового излучения при солнечном свете, а также при синтезе хлорофила.

Витамин В7 (Н) – биотин. Участвует в процессе образования активной формы CO_2 в момент фотосинтеза.

Витамин В8 – мезоинозит. Один из факторов роста растительной клетки. Является стереоизомером шестиатомного спирта (циклического) – инозита.

Витамин В9 – фолиевая кислота. Повышает рост и развитие иммунной системы.

Витамин В12 – кобаламин. Играет огромную роль в жизни растений. Участвует в накоплении в растительных клетках азотистых веществ и

углеводов. Усиливает работу таких процессов, как фотосинтез и дыхание. Уменьшает распад хлорофилла в темное время суток.

Таблица 3 – Количественная характеристика компонентов питательной среды Мурасиге и Скуга для культивирования апикальных меристем картофеля.

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хеллат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-HCl	1 мг/л
Пиридоксин-HCl	1 мг/л
Витамин B ₁₂	0,015 мг/л
Никотиновая кислота	2 мг/л
Фолиевая кислота	0,5 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
Гидролизат казеина	1 г/л
Пантотенат Са	10 мг/л
Рибофлавин	0,5 мг/л
Биотин	1 мг/л
Активированный уголь	10 г/л
Гиббереллиновая кислота	2 мг/л
Зеатин	2 мг/л
Сахароза	20 г/л
Глюкоза	20 г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5,7-5,8	

В роли биологических регуляторов роста и развития, а также для усиленного формообразования, используем фитогормоны. Они способствуют процессу дедифференциации растительных тканей. Таким образом, клетки являются менее специализированными. Происходит возобновление их меристематической активности. Следовательно, после дедифференцировки растительные клетки способны к повторной дифференцировке, т.е. увеличению количества типов клеток.

Помимо дедифференциации растительных клеток и тканей, фитогормоны инициируют гистогенез, стимулируют процесс созревания и старения, запускают устройство деления и растяжения клеток, а также играют роль на этапе формирования пола [12].

В работе с культурами клеток в условиях *in vitro* мы применяли следующие фитогормоны:

- 1) 3-индолилуксусная кислота – 2 мг/л. Относится к группе ауксинов.
- 2) зеатин – 1,5-2 мг/л. Относится к группе цитокининов.
- 3) гибберелин ГА₃ – 2 мг/л. Относится к группе гиббереллинов.

Изначально в стеклянной конической колбе на 100 мл растворили ауксины в 2 мл 96% этилового спирта, т.к. они плохо растворимы в воде. После полного их растворения добавляли дистиллированную воду до отметки, т.е. прилили 98 мл.

Цитокинины также плохо растворимы в воде. Следовательно, их растворили в 2 мл 1 Н раствора гидроксида калия (КОН). Довели до 100 мл путем приливания 98 мл дистиллированной воды.

Гиббереллины растворили в дистиллированной воде в колбе на 100 мл. Хранились растворы при 2-4 °С.

После приготовления всех необходимых компонентов мы приступили к приготовлению питательной среды Мурасиге и Скуга.

В стеклянную посуду на 1 л добавляем 500 мл дистиллированной воды. В неё добавляем все (кроме агар-агара) сухие компоненты из табл. 3. Перемешиваем до полного растворения всех веществ. После, добавляем 50 мл

маточного раствора макросолей, 50 мл хлористого кальция, 5 мл хелата железа и 1 мл раствора микросолей, 2 мл раствора ауксинов. Раствор цитокининов и гиббереллинов добавлять нельзя, т.к. дальше питательная среда пойдет в автоклав, а данные гормоны являются термолабильными. В таких случаях фитогормоны вводили в питательную среду после охлаждения до 40-50 °С, когда пройдет процесс автоклавирования.

Добавляем 7 г агар-агара. Перемешиваем и доводим до 1 л. Даем отстояться 15 минут.

После 15 минут ставим наш раствор на разогретую водяную баню. Постоянно помешиваем до полного растворения агар-агара (рис. 2).

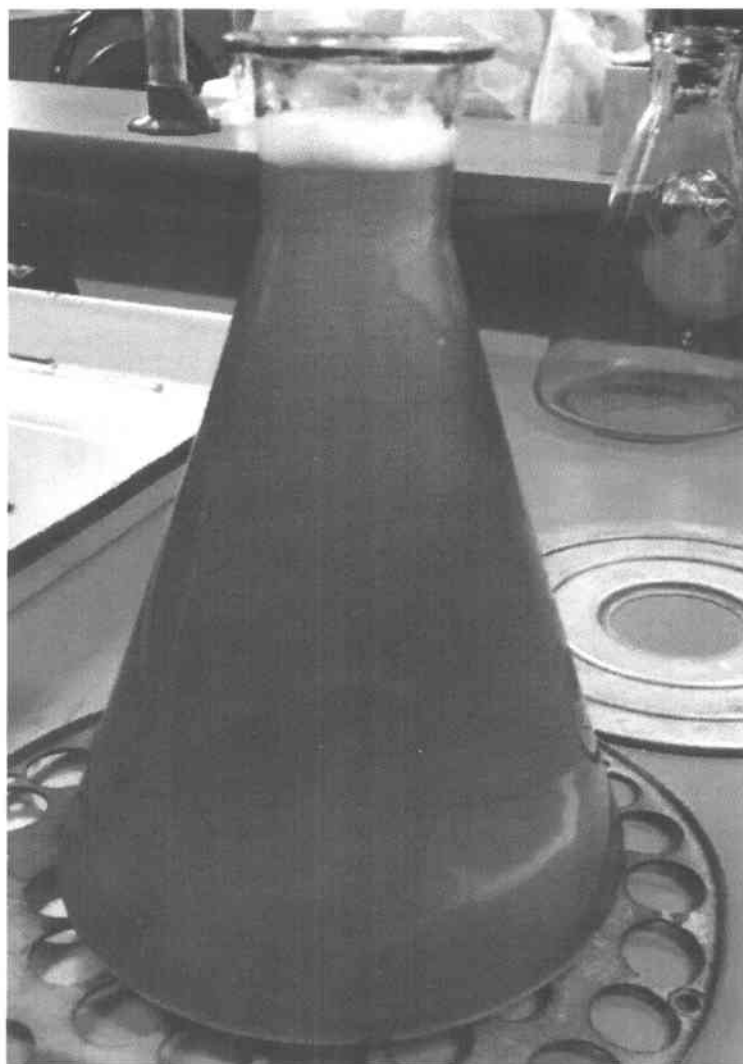


Рисунок 2. Готовая питательная среда Мурасиге и Скуга

После приготовления питательной среды необходимо измерить рН среды. Если она превышает 5,5-6, то необходимо добавить 1-2 капли 0,1 н HCl, если ниже – 0,1 н NaOH. В нашем случае рН среды нейтральная.

3.2. Особенности стерилизации и закладки растительных эксплантов

Помимо стерилизации питательной среды, данный процесс должны пройти все предметы (растительные экспланты, чашки Петри, колбы и т.д.), которые будут задействованы на протяжении всей работы.

Благодаря стерилизации мы уменьшаем шанс развития на культурах и в питательной среде различных бактерий, их спор, а также грибов и вирусов.

Перед тем, как приступить к разлиту питательной среды в пробирки, мы заранее простерилизовали их и чашки Петри в сушильном шкафу. Вымыли посуду, необходимую нам для работы. Обернули ее в бумагу и поместили в сушильный шкаф на 1 час при 160 °С (рис. 3).



Рисунок 3. Термостат суховоздушный

После окончания стерилизации посуды и ее остывания, разлили питательную среду в асептические пробирки.

Стерилизацию питательной среды Мурасиге-Скуга провели в автоклаве (AUTOCLAVE – STEAM STERILIZER, Tuttnauer 2540 ML) в течении 30 минут при поставленной температуре 122 °С и при давлении 1 атм (рис. 4).



Рисунок 4. AUTOCLAVE – STEAM STERILIZER, Tuttnauer 2540 ML, расположенный в лаборатории

Данная температура была оптимально подобрана, так как при более высоких показателях фитогормоны ауксины разрушаются. Время для стерилизации было подобрано неправильно. Спустя 1-2 дня в 25% пробирок, от общего числа заложенных с питательной средой, было выявлено заражение микроорганизмами. Поэтому мы увеличили время стерилизации питательной среды до 40 минут. Второй результат не привел к заражению питательной среды, развитие бактериальной флоры не наблюдалось (рис. 5).

Растительная культура несет на своей поверхности эпифитную микрофлору, являясь главным источником заражения. На первом этапе

подготовки эксплантов к посадке мы провели поверхностную стерилизацию. Картофель, из которого в дальнейшем будем извлекать верхушечную почку, промывали синтетическим моющим раствором (моющее средство, используемое в быту – Sorti), тем самым удалили все поверхностные загрязнения. Затем ополаскивали в проточной воде от мыльного налета.



Рисунок 5. Пробирки со стерильной питательной средой Мурасиге и Скуга после автоклавирования

После поверхностной обработки картофеля, мы поместили его в ламинар-бокс (LAMYSTEMS, класс II / тип А).

Изначально поверхности бокса протерли 96% спиртом. Туда же поместили все инструменты (пинцет, скальпель, препаровальная игла, шприц), спиртовку, вещества для глубокой стерилизации эксплантов (раствор KMnO_4 , раствор CuSO_4 , перекись водорода, дистиллированная вода, этанол) всю стерильную посуду, пробирки со стерильной питательной средой и активируем фильтрационную воздушную систему и УФ лампы для полной

стерилизации поверхностей. Процедура проводится в течении 1 часа 30 минут (рис. 6).



Рисунок 6. LAMSYSTEMS, класс II / тип А – ламинар-бокс, установленный в лаборатории

Спустя 1 час 30 минут мы выключили УФ лампы ламинар-бокса и приступили ко второму этапу стерилизации эксплантов (верхушечные почки). Работа проводилась в стерильном халате, в перчатках. Руки обрабатывались спиртовым раствором.

Аккуратно пинцетом срезались верхушечные почки картофеля сортов «Матушка» и «Утенок». При каждом маневре инструменты прокаливались в пламени спиртовки. Поочередно помещали экспланты в приготовленные стаканы с асептическими растворами. Изначально были подобраны

неправильные промежутки времени при стерилизации, в результате чего все 10 заложенных пробирок оказались заражены бактериальной флорой.

Второй раз привел к следующим результатам: из 10 заложенных пробирок 7 оказались заражены. В результате, мы изменили концентрацию асептических растворов и время нахождения в них эксплантов.

На четвертый раз работа дала положительные результаты.

3.3. Получение микроклубней картофеля *in vitro*

Спустя несколько попыток подбора условий стерилизаций для эксплантов была выявлена следующая последовательность.

Сначала помещали в 1-ый стакан с 0,5%-ым раствором KMnO_4 (марганцовокислый калий). Выжидали 10 минут. После переносили во 2-ой стакан с 1%-ым раствором CuSO_4 (медный купорос). Время ожидания составляло 15 минут.

Следом помещали верхушечные почки в дезинфицирующие растворы. Первое вещество находилось в третьем стакане – 70%-ый раствор $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (этанол). В нем эксплант находится 1 мин. При данной концентрации и данном времени эксплант не погибал (выявлено методом «проб и ошибок»). После, помещаем его на 3 минуты в перекись водорода (H_2O_2) – стакан № 4. Когда прошли все этапы, то изолированную культуру промывали дистиллированной водой (5-6 раз). Аккуратно помещали в пробирку с питательной средой и закрывали ватной пробкой.

В шприц набирали 1 мл цитокины кислоты. Прокалывали ватную пробку и вносили в 6 пробирок с питательной средой, где заложены экспланты сорта «Утенок». Такую же манипуляцию проводили с гиббереллиновой кислотой в оставшиеся 4 пробирки с культурами сорта «Матушка».

Пробирки с эксплантами подписывали, помещали в железный штатив и переносили его в специально-оборудованное помещение – теплицу (рис. 7).

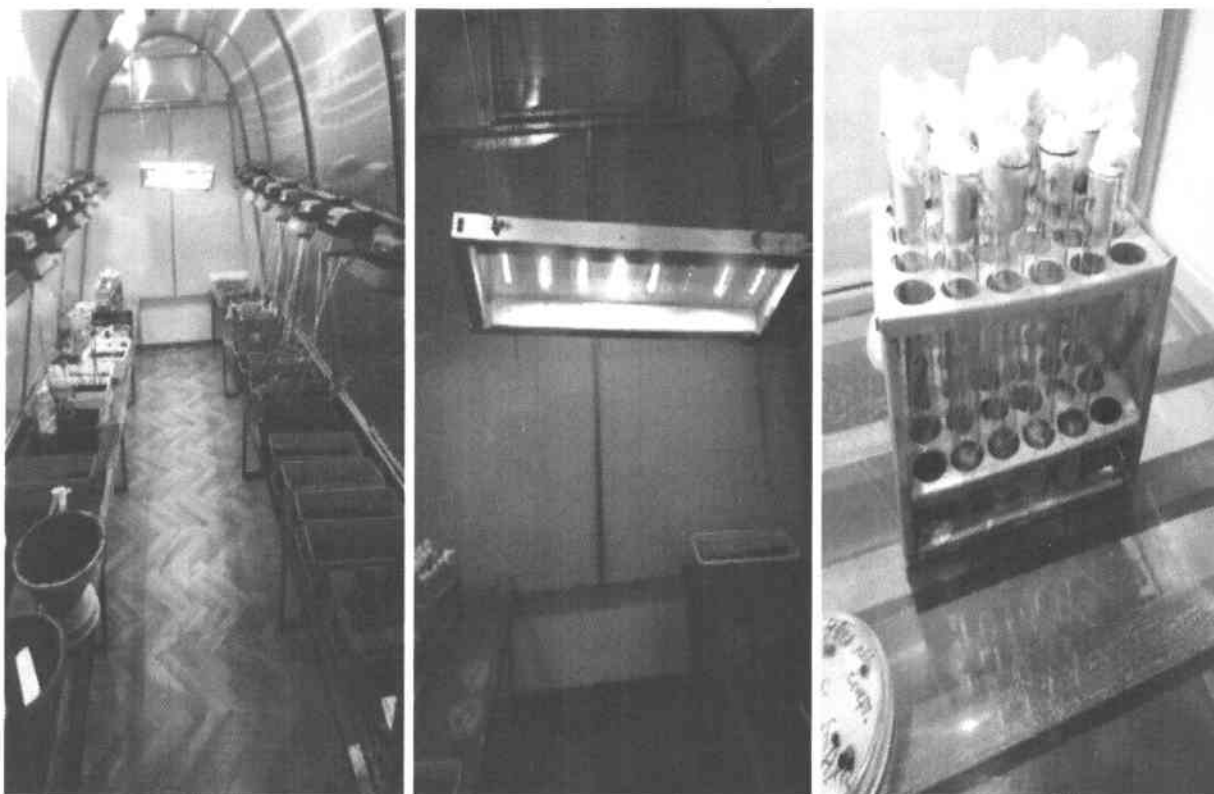


Рисунок 7. Оборудованная теплица и расположенные в ней пробирки с заложенной культурой

Спустя 4 дня было выявлено 3 зараженных культуры. Возможно бактериальная флора была занесена при опрыскивании шприцом сквозь ватную пробку.

На 8 день корни культур трогались в рост.

Через 10 дней после закладки экспланта в питательную среду максимальная длина корня наблюдалась у сорта «Матушка» в размере 24 мм. На 6 день начали распускаться почки, раскрываться листочки культуры. К 17 дню наблюдали по 4-5 придаточных корней. Наблюдаются боковые кони первого порядка. На тот момент максимальная высота растения составляла 38 мм (рис. 8). Данное растение в возрасте 17 дней можно использовать для микрочеренкования.



Рисунок 8. Растение картофеля сорта «Матушка» спустя 17 дней

Через 60 дней у 6 пробирок наблюдалось заражение грибами.

Одна пробирка (сорт «Утенок») с культурой имела наличие бактериальной флоры, но продолжала давать положительные результаты. Действие фитогормонов привело к усилению роста боковых побегов и образованию на них 6-ти микроклубней (рис. 9).

Данный эффект характерен для действия цитокининов (фитогормон зеатин) – снятие апикального доминирования и усиление роста боковых побегов, а также клубнеобразование.

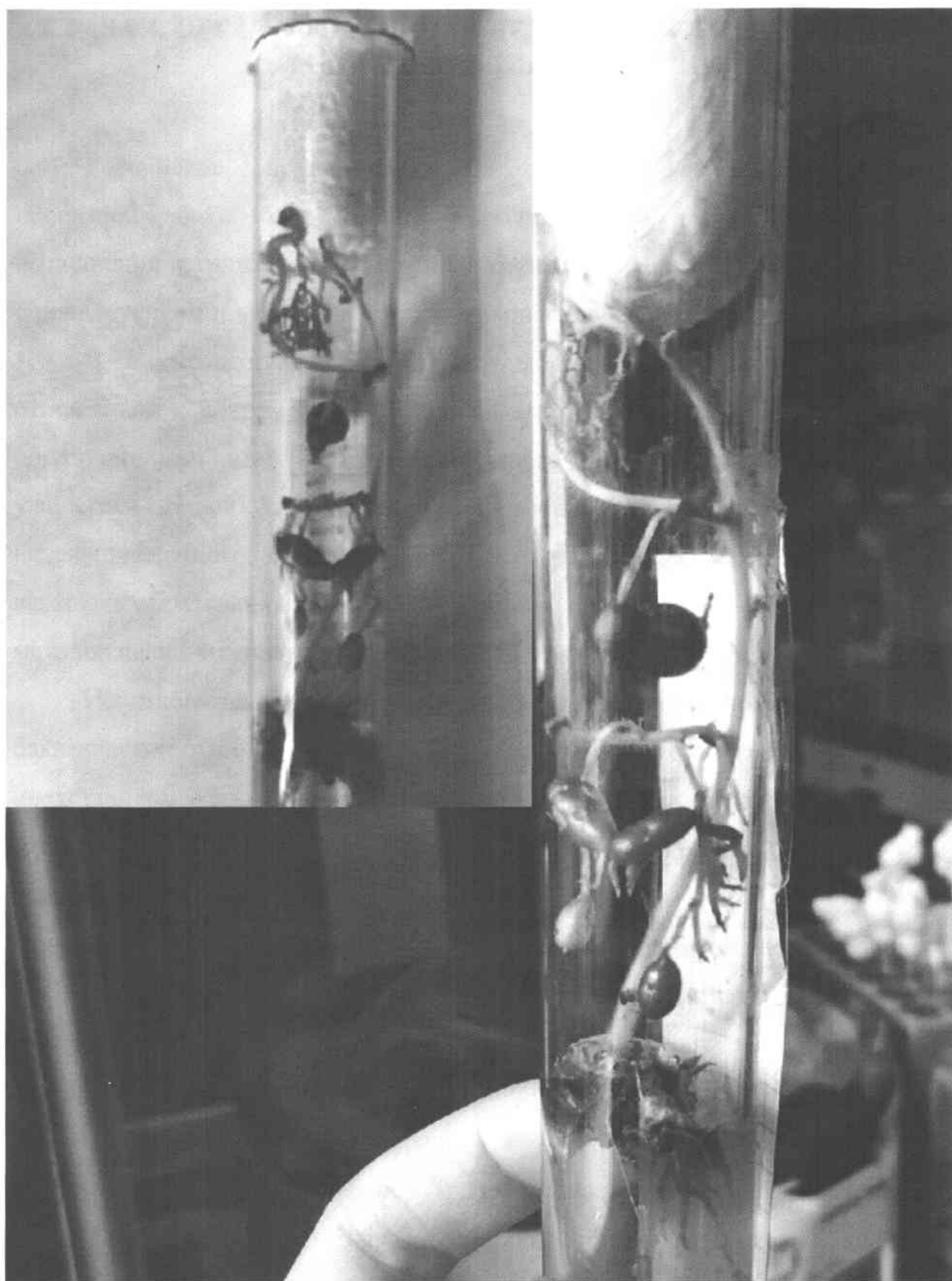


Рисунок 9. Микроклубни картофеля сорта «Утенок»

ГЛАВА 4. ОРГАНИЗАЦИОННАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ УЧАЩИХСЯ В РАМКАХ ИЗУЧЕНИЯ БИОЛОГИИ

Российские современные школы ставят перед собой главную задачу проектной работы – научить детей выполнять учебную деятельность. Для ее выполнения организуют научные кружки, деятельность которых связана с привлечением и внедрением школьников в исследовательское дело.

В настоящее время рынок труда выпускает новые правила по отношению к современным выпускникам. Федеральный государственный образовательный стандарт основного общего образования (ФГОС) описывает учащегося старших классов средней образовательной школы как активного, целенаправленного, креативно мыслящего человека, который осознает всю важность образования и творческого труда, способного овладеть навыками методов познания и изучения окружающего мира.

Исследовательскую деятельность, которая была выполнена на уровне бакалаврской работы, можно использовать в школе в рамках проекта и представить его к защите на межшкольной конференции. Также, эксперимент можно реализовать в работе научного школьного кружка по биологии в старших классах.

Детей можно заинтересовать изучаемым предметом, если правильно представить общеобразовательный процесс по биологии в школе. Для этого необходимо использовать методы и средства обучения, такие как исследовательского и проектного типов. Необходимо уточнить, что в настоящее время большое внимание уделяется расширению работ в сфере биотехнологии. Следовательно, максимальное количество выпускников подают документы в ВУЗы, которые способны подготовить настоящих специалистов для этой области [35, 26].

Проект позволит рассмотреть вопросы, которые касаются создания школьного биологического эксперимента по выращиванию культур клеток и тканей в условии *in vitro*. Это даст возможность пробудить интерес у учащихся

к работе с живыми тканями, ознакомит их с правилами действия в лаборатории и ее оборудованием. При реализации этого эксперимента они получают конкретный продукт.

Биотехнология – дисциплина, которая включает в себя все основные предметы, предусмотренные образовательной программой. При её изучении учащиеся углубляют свои знания по химии и физике и знакомятся с такими предметами как: микробиология, цитология, гистология, ботаника [4, 37].

Объектами исследований могут быть различные культуры клеток и тканей: ирис (лат. *Iris*, семейство Ирисовые – *Iridaceae*), шпинат (лат. *Spinacia oleracea*, семейство Амарантовые – *Amaranthaceae*), огурец (лат. *Cucumis sativus*, семейство Тыквенные – *Cucurbitaceae*), картофель (лат. *Solanum tuberosum*, семейство Пасленовые – *Solanaceae*) и т.д.

В 2019-2020 г. была проведена работа с Беланом Вадимом – учеником МБОУ «Гимназия №53» г. Пензы. Мы использовали методику культивирования картофеля на таких культурах, как шпинат сорта «Виктория» и огурец сорта «Кустовой».

Тема проекта: «Особенности культивирования растений в условиях *in vitro*».

Цель: разработать биологический эксперимент по выращиванию культур шпината и огурца в условиях *in vitro*.

Объектами исследования выступали шпинат сорта «Виктория» (лат. *Spinacia oleracea* L., семейство Амарантовые – *Amaranthaceae*) и огурец сорта «Кустовой» (лат. *Cucumis sativus* L., семейство Тыквенные – *Cucurbitaceae*). Для их прорастания в условиях *in vitro* требуется меньше времени, чем у картофеля, поэтому шпинат и огурцы отлично подойдут для того, чтобы повторить этот эксперимент в рамках школы.

Предмет исследования: особенность организации деятельности учащихся при работе с культурами растений предлагаемого эксперимента.

Задачи исследования были поставлены следующие:

- 1) изучить возможность внесения данного эксперимента в образовательную среду школы;
- 2) разобрать методики подбора и изготовления питательной среды Мурасиге и Скуга для посева культур;
- 3) подобрать и опробовать методы стерилизации питательной среды, и рабочей посуды (чашки Петри, пробирки для посева);
- 4) подобрать условия стерилизации семян шпината и огурца;
- 5) дать оценку полученному результату.

Итог исследования может стать полезным для учителей, которые являются руководителями научных кружков по биологии в школе [9].

Работа проводилась на базе Педагогического института им. В.Г.Белинского Пензенского государственного университета на кафедре «Общая биология и биохимия». Выращивание шпината и огурца посевного в условиях *in vitro* проводилось по методике микрклонального размножения.

Для того, чтобы понять суть метода, учащемуся МБОУ «Гимназия №53» г. Пензы необходимо было освоить основные понятия и методику работы с растительными объектами.

В процессе изучения теории, он усвоил следующие этапы.

1. Подбор питательной среды и метод ее приготовления.

Учащийся понимает, что питательная среда – это многокомпонентный или однокомпонентный состав, который необходим для создания условий прорастания культур.

Мы определили, что состав питательной среды как для картофеля, так и для шпината и огурца очень схожи.

Ученик знакомится с основными составляющими: макроэлементы, микроэлементы, источники железа, углеводы. Определяет роль фитогормонов в развитии и росте культур. Эксперимент проводился на питательной среде Мурасиге-Скуга – это наиболее распространенная и не требует много затрат в приготовлении.

2. Стерилизация посадочного материала и введение его в культуру.

Её можно проводить безопасным для здоровья дезинфицирующими агентами. На данном этапе учащийся ознакомился с принципами микробиологии, со строением растительной клетки, с химическими веществами, которые способны подавлять рост и размножение фитопатогенных микроорганизмов.

Стерилизация проводилась в следующей последовательности: служили растворы перманганата калия 1%, перекиси водорода 3% и этилового спирта 70% (рис. 10).



Рисунок 10. Основные стерилизующие агенты для семян шпината и огурцов: растворы перманганата калия 1%, перекиси водорода 3% и этилового спирта 70%

Для стерилизации шпината и огурца мы не стали брать такой агент, как 1%-ый раствор CuSO_4 . Картофель имеет большее количество различных растительных заболеваний, которые медный купорос способствует предотвратить, поэтому он был необходим для применения.

В конце семена шпината и огурца промывались дистиллированной водой 5-6 раз. Вносились на чашку Петри, которая внутри располагалась на смоченной фильтровальной бумаге. Через 2-3 дня семена начали проявлять активный рост (рис 11).

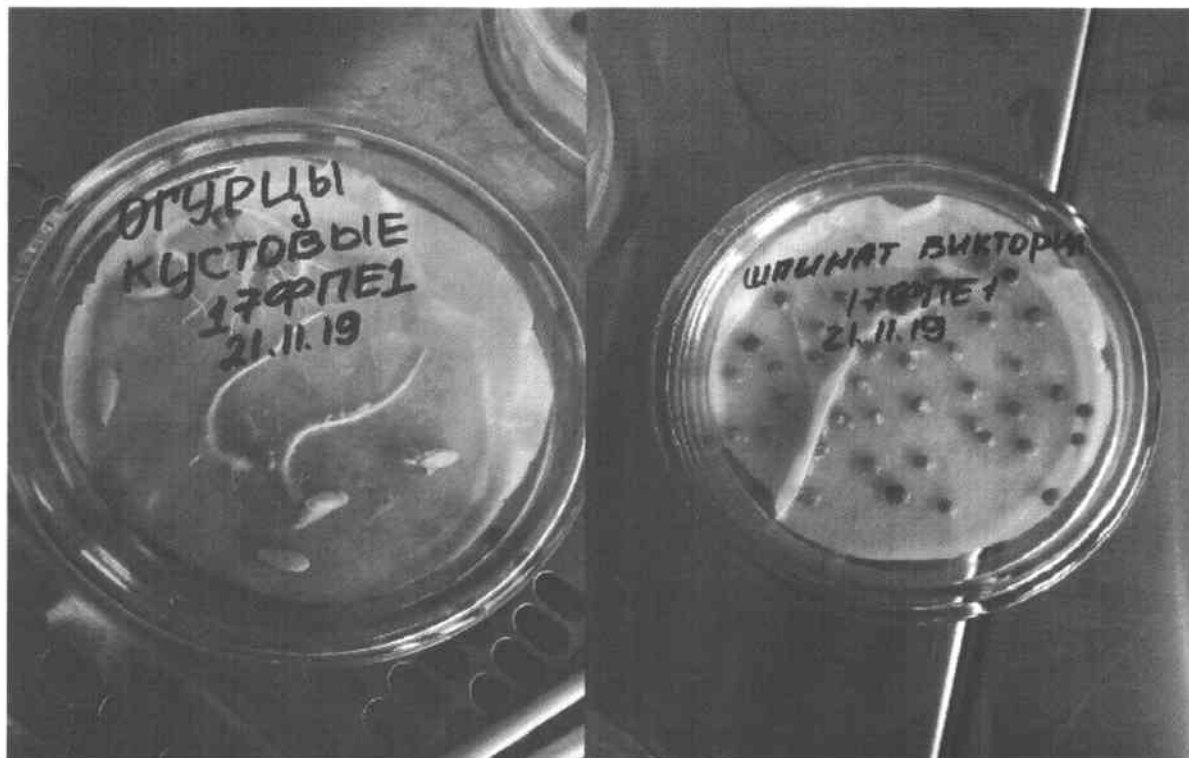


Рисунок 11. Проросшие семена шпината сорта «Виктория» и огурцов сорта «Кустовой» в чашки Петри

После прорастания семян, с них снималась семенная кожура. Зародыш помещался в пробирку с питательной средой. Железный штатив с пробирками размещали в теплице, возведенную на кафедре «Общая биология и биохимия». В данном случае, это не является большой необходимостью. Данный эксперимент можно провести в обычном классе при комнатной температуре.

Стоит заметить, что ученик проявлял бурную активность. Ему было интересно самостоятельно попробовать методику внесения культур в питательную среду Мурасиге-Скуга.

3. Методика введения фитогормонов.

Никакого труда не составило научить ученика правильно опрыскивать внесенную культуру фитогормонами. Он интересовался вопросом: «Почему

нельзя внести их все еще в момент, когда мы варили питательную среду?». В результате своего изучения материала, учащийся самостоятельно выяснил, что гиббереллины и цитокинины следует вводить после стерилизации питательной среды, так как они термолабильны.

4. Заключение по полученным результатам проведенной работы.

Опрыскивание фитогормонами происходило на 8 день, когда средняя высота побега шпината составляла 51 мм, а высота огурца – 44,5 мм.

Действие фитогормонов проявилось спустя 2 дня.

Заметно, что под действием гиббереллиновой кислоты шпинат превысил свой рост почти в 2 раза, чего нельзя сказать про огурцы. Также наблюдается апикальное доминирование, которое обычно присуще фитогормонам ауксинам (рис. 12).

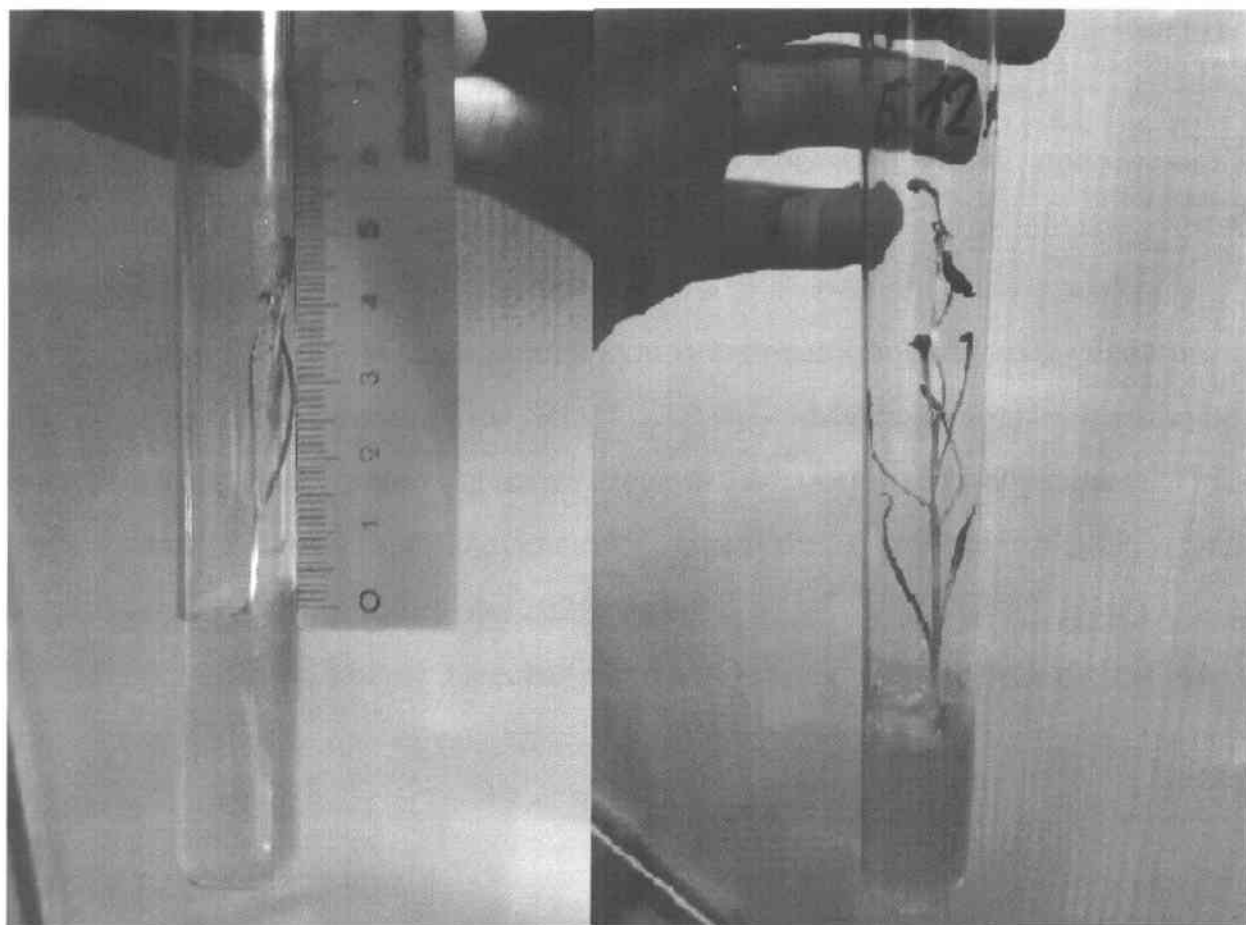


Рисунок 12. Рост шпината сорта «Виктория» до и после опрыскивания ауксинами.

В результате, данный проект позволил раскрыть творческий потенциал учащегося, углубить его знания в определенной области, а главное заинтересовать таким предметом, как биология. Одновременно осуществили раннюю профориентацию.

При выполнении работы в рамках научного кружка в школе необходимо, чтобы учитель и ученик взаимодействовали друг с другом для реализации поставленной цели. С точки зрения учащегося, учебный проект – это возможность действовать самостоятельно или в группе, выполнять что-то интересное, новое, вкладывать в работу все знания и силы.

В последующем представлении данного опыта на I региональном фестивале творческих открытий и инициатив «ЛЕОНАРДО» (2021 г.) Белан Вадим занял 3 место. Он предоставил результаты проведенной работы.

Проект помог заинтересовать учащегося в процессе исследовательской деятельности. Познавательная деятельность позволяет оценить метапредметные результаты учащихся, ведь согласно ФГОС проведение и защита индивидуально исследовательского проекта – это новый способ оценки метапредметных результатов.

Работа на тему «Особенности культивирования растений в условиях *in vitro*» была предложена на «15.11.2021 – Международном конкурсе исследовательских работ для студентов и учащихся образовательных учреждений в области биологических, химических и медицинских наук», которая проводилась 15 ноября 2021 года.

В результате, заняла 3 место (рис. 13). Это свидетельствует от том, что в настоящее время тема по микрклональному размножению в рамках биотехнологии актуальна.

ДИПЛОМ | DIPLOMA

III степени | 3rd degree | 3 место
награждается | awarded to

Чуглина Анастасия Александровна

студент 5 курса (бакалавриат), факультет физико-математических и естественных наук,
Пензенский государственный университет

победитель конкурса "15.11.2021 — Международный конкурс исследовательских работ для студентов и учащихся образовательных учреждений в области биологических, химических и медицинских наук - <http://students.interclover.ru/bio/biochem.html>", проводимого 15 ноября 2021 года по инициативе проекта Intercllover.ru, г. Нижний Новгород

Название проекта: курсовая работа/курсовой проект "Особенности культивирования растений в условиях in vitro"

Номинация: практическая работа-эксперимент

Научное направление: Биологические науки

Подкатегория научного направления: Физиология и биохимия растений

Степень достижений: студенты образовательных учреждений ВО (бакалавриат)

Форма участия: дистанционное участие

Научный руководитель: Солдатов Сергей Александрович, доцент, кандидат биологических наук, доцент кафедры "Общая биология и биохимия", Пензенский государственный университет


КРАСНОВА Н.А. | KRASNOVA N. | КАНДЭВА Ю.О. | KANAIEVA YU.
руководитель НОО зам. руководителя НОО
"Профессиональная наука", "Профессиональная наука",
председатель конкурсного жюри секретарь конкурсного жюри | Deputy
Head of the "Professional Science", Head of the "Professional Science",
Chairman of the Competition Jury Secretary of the Jury

interclover.ru | 2021 | Нижний Новгород

Рисунок 13. Диплом III степени Международного конкурса исследовательских работ для студентов и учащихся образовательных учреждений в области биологических, химических и медицинских наук

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как уже упоминалось выше: биотехнология – дисциплина, которая включает в себя все основные предметы, предусмотренные образовательной программой. Методика культивирования клеток и тканей в условиях *in vitro* позволяет столкнуться с каждой из них.

В результате работы, мы изучили особенности культивирования растений в условиях *in vitro*, используя в качестве объекта исследования картофель сорта «Утёнок» и сорта «Матушка». Их срок созревания достаточно короткий и они мало восприимчивы к различным заболеваниям.

Растительная культура несет на своей поверхности эпифитную микрофлору, являясь главным источником заражения. Поэтому было важно подобрать подходящую методику стерилизации не только для питательной среды и инструментов, но и для самих эксплантов. В результате работы, только с четвертого раза получилось подобрать приемлемые концентрации стерилизующих агентов и время нахождения эксплантов в них: 0,5%-ый раствор KMnO_4 (10 минут), 1%-ый раствор CuSO_4 (15 минут), 70%-ый раствор $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (1 минута), H_2O_2 (3 минуты).

Спустя 10 дней после закладки экспланта в питательную среду максимальная длина корня наблюдалась у сорта «Матушка» в размере 24 мм. На 6 день начали распускаться почки, раскрываться листочки культуры. К 17 дню наблюдали по 4-5 придаточных корней. Наблюдаются боковые кони первого порядка. На тот момент максимальная высота растения составляла 38 мм. Данное растение в возрасте 17 дней можно использовать для микрочеренкования.

В итоге работы, мы получили, что одна пробирка (сорт «Утенок») с культурой имела наличие бактериальной флоры, но продолжала давать положительные результаты. Действие фитогормонов (цитокининов) привело к усилению роста боковых побегов и образованию на них 6-ти микроклубней.

В 2019 году было проведено подобное исследование по определению особенностей культивирования растений в условиях *in vitro* с учащимся МБОУ «Гимназия №53» г. Пензы.

Для работы использовались культуры шпината и огурца. Под действием гиббереллиновой кислоты шпинат превысил свой рост почти в 2 раза, чего нельзя сказать про огурцы. Также наблюдалось апикальное доминирование, которое обычно присуще фитогормонам ауксинам. В результате, данный проект позволил раскрыть творческий потенциал учащегося, углубить его знания в определенной области. Он проявлял активность в работе, тем самым проявлял свою заинтересованность в данном эксперименте.

В процессе работы мы выявили, что опыт, поставленный нами можно проводить и в условиях научного кружка в школе. Для этого требуется малое количество затрат ресурсов, т.к. питательные среды можно закупить в готовом виде, фитогормоны находятся в доступном пользовании, количество инструментов для работы минимальное. Единственная проблема, с которой может столкнуться школа – нехватка аппаратуры, предназначенная для стерилизации посуды и питательной среды. Если правильно выбрать культуру для прорастания в условиях *in vitro*, то результаты можно увидеть спустя 2-3 дня, что поспособствует развитию интереса у ребенка к такому предмету, как биология.

Таким образом, в процессе всех наших работ, нам удалось определить оптимальные условия прорастания для таких культур как картофель, шпинат, огурцы. Нужно учитывать физиологические особенности исследуемого объекта – экспланта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агроэкологический атлас России и сопредельных стран [Офф. сайт]. URL: http://www.agroatlas.ru/ru/content/related/Crataegus_sanguinea/ (Дата обращения 09.01.2021).
2. Бабикова А.В. Растение как объект биотехнологии / Комаровские чтения. 2007, Вып. LV. С. 184-211.
3. Белокурова В.Б., Листван Е.В., Майстров П.Д., Сикура Й.Й., Глеба Ю.Ю., Кучук Н.В. Использование методов биотехнологии растений для сохранения и изучения биоразнообразия мировой флоры // Цитология и генетика, 2005. № 1. С. 41-51.
4. Белогородова В.П. Об исследовательской деятельности учащихся в условиях проектного метода / В. П. Белогородова // Иностранные языки в школе, 2005. № 8. С. 6-11.
5. Берсенева И.А., Дьячкова Т.В., Бекшаев И.А. Здоровьесберегающие технологии в инклюзивном образовании на примере уроков биологии // Проблемы современного педагогического образования. 2018. С. 226-229.
6. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
7. Бутенко Р.Г. От свободноживущей клетки – к растению. М.: Колос, 1971. 95с.
8. Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений. Алматы: «Конжык». 1996. 272 с.
9. Васильева Н.Н., Дмитриева Е.А. Возможности организации исследовательской деятельности в процессе обучения биологии // Ярославский педагогический вестник. 2012, №4. С. 68-72.
10. Викторов Д. П. Практикум по физиологии растений. Воронеж: ВГУ, 1991. 160 с.

11. Гавриленко В.Ф. Большой практикум по фотосинтезу: учеб. пособие для студ. вузов. М.: Изд. Центр «Академия». 2003. 256 с.
12. Генкель П.А. Физиология растений. Учебное пособие по факультативному курсу для 9-х классов. М.: Просвещение, 1985.
13. Гольд В. М., Гаевский Н. А., Голованова Т. И. Электронный учебно-методический комплекс «Физиология растений». Красноярск: ИПК СФУ, 2008. 148 с.
14. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию [Офиц. сайт]. URL: http://www.gossort.com/ree_conf.html. (Дата обращения: 16.04.2021).
15. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие. М.: Изд. Центр «Академия», 2003. 208 с.
16. Кабунин А.А. Вопросы селекционной работы с картофелем // Генетические и агротехнологические ресурсы повышения качества продовольственного и технического картофеля: сб. материалов третьей науч.-практ. конференции. М.: МГУ, 2013. С. 22-25.
17. Кабунин А.А., Догуревич О.А. К методике селекции многоуровневых и крупноклубневых сортов картофеля // Достижения науки и техники АПК. 2009, № 5. С. 9-11.
18. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка. 1980. 356 с.
19. Кильчевский А.В., Никонович В.В. Французенок В.В., Ермоленков В.В., Воробьева Е.П. Сельскохозяйственная биотехнология: Методические указания. Горки: Белорусская государственная сельскохозяйственная академия. 1999. 24 с.
20. Кириленкова В.Н., Обухов Д.К. Клетки и ткани: методическое пособие. Москва: Дрофа, 2008. 118 с.

21. Корпорация Российский учебник [Официальный сайт]. URL: https://rosuchebnik.ru/books/biology/olimp_biology.pdf (Дата обращения: 05.12.2020).
22. Кошкин Е. И. Частная физиология полевых культур. – М.: Колос, С. 2005. 344 с.
23. Лесонтович А.В. Исследовательская деятельность учащихся. Сборник статей // Библиотека журнала «Исследовательская работа школьников», серия «Сборники и монографии». М., 2006. 114 с.
24. Меняева И.Н. Организация поисковой, исследовательской, экспериментальной работы в школе / И. Н. Меняева // Педагогическая мастерская, 2005. № 3. С. 12-15.
25. Министерство сельского хозяйства Пензенской области [Официальный сайт]. URL: <https://mcx.pnzreg.ru/> (Дата обращения: 16.04.2021).
26. Мишина О.С., Иванов Р.Г. Разработка школьного проекта на тему: «Влияние природной органики на рост и развитие растений» // Проблемы современного педагогического образования, 2017. №57-8. С. 110-116.
27. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Агропромиздат, 1990. 384 с.
28. Научно-исследовательская работа по биологии, как важный способ активизации школьников [Официальный сайт] URL: <http://guoedu.ru/nauchno-prakticheskie-konferencii/> (Дата обращения: 02.06.2021).
29. Першина Л.А. Культивирование изолированных клеток и тканей высших растений: учеб. пособие. Ч. 1. Новосибирск: НГУ, 2000. 46 с.
30. Поддьяков А.Н. Методологические основы изучения и развития исследовательской деятельности / А. Н. Поддьяков // Школьные технологии, 2006. № 3. С. 85-90.
31. Полевой В.В. Физиология растений. М.: Высшая школа, 1989. 464 с.

32. Плантариум. Определитель растений on-line [Офиц. сайт]. URL: <http://www.plantarium.ru/page/view/item/6355.html> (Дата обращения 21.04.2021)
33. Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б., Гринь Н.А. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учеб. пособие. – Саратов: Изд-во СГУ им. Н. Г. Чернышевского. 2002. 45 с.
34. Третьяков Н. Н., Карнаухова Т. В., Паничкин Л. А. Практикум по физиологии растений. М.: Агропромиздат, 1990. 271 с.
35. Учебно-исследовательская деятельность по биологии в соответствии с ФГОС [Офиц. сайт]. URL: <http://panfilia.ru/text/80489/83989.php.html> (Дата обращения: 22.04.2021).
36. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. Учебник. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: высш. шк., 2008. 710 с.
37. Широков, А. И. Основы биотехнологии растений: электронное учеб.-метод. пособие / А. И. Широков, Л. А. Крюков. – Нижний Новгород: Нижегородский государственный ун-т, 2012. 49 с.
38. Энциклопедия растений [Офиц. сайт]. URL: <http://www.zadachator.com/sad/belamkanda.html> (Дата обращения: 17.09.2021).
39. Энциклопедия декоративных садовых растений [Офиц. сайт]. URL: <http://www.packagile.ru/lukov/belamcanda.html> (Дата обращения: 17.09.2021).
40. Якушкина Н.А. Физиология растений. М.: Просвещение, 1993. 335 с.