УПРАВЛЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ГОРОДА ПЕНЗЫ

**МУНИЦИПАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБЩЕОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ**

**«ГИМНАЗИЯ № 53» г. ПЕНЗЫ**

**(МБОУ «Гимназия № 53» г. Пензы)**

**\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_**

ул. Попова, 14, г. Пенза, 440046

телефон (8-412) 54-32-03, 54-30-32 E-mail: school53@guoedu.ru

ОКПО 24020409, ОГРН 1025801443568

ИНН/КПП 5837009907/583701001

Исследовательская работа на тему:

**«Особенности культивирования огурцов и шпината в условиях *in vitro*»**

**Автор**: Кириллов Дмитрий,

учащийся 10 класса МБОУ «Гимназия №53»

**Научные руководители**: к.б.н., доцент **Солдатов С.А.**

Федеральное государственное бюджетное

образовательное учреждение

высшего образования

«ПЕНЗЕНСКИЙ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**Колесникова Т.Л.,**

учитель химии и биологии МБОУ «Гимназия №53» г. Пензы

2019 г

СОДЕРЖАНИЕ

[ВВЕДЕНИЕ 3](#_Toc26038582)

[ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 5](#_Toc26038583)

[1.1 Биотехнология производства культуры клеток, тканей и органов растений 5](#_Toc26038584)

[1.2 Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений 6](#_Toc26038585)

[ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 9](#_Toc26038586)

[ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 11](#_Toc26038587)

[ЗАКЛЮЧЕНИЕ 20](#_Toc26038588)

[СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 21](#_Toc26038589)

# **ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность темы.** Одной из важных отраслей сельского хозяйства является овощеводство. В настоящее время в нашей стране возделывается более 170 видов овощных культур.

Огурцы и шпинат в настоящее время одни из популярных источников питания для человека и кормления животных.

Правильный выбор сортов для данных почвенно-климатических условий – главная предпосылка получения высоких устойчивых урожаев, хорошего качества.

Прогресс в области современной биотехнологии растений непосредственно связан с разработкой методических приемов культивирования клеток *in vitro*. Этим методом получен ряд форм и сортов растений с ценными признаками, которые используются во многих странах мира.

Растения, выращенные в *in vitro* – это посадочный материал нового поколения, обладающий рядом неоспоримых преимуществ по сравнению с растениями, полученными традиционными методами размножения (отводки, черенкование, прививка), а именно:

* растения свободны от фитопатогенов;
* они обладают повышенными темпами роста и развития;
* высокая выравненность посадочного материала вследствие его генетической однородности;
* возможность размножения в неограниченных количествах гибридных форм растений, с сохранением всех ценных признаков;
* отсутствие сезонности при посадке материла;
* возможность производства больших объемов посадочного материала в сжатые сроки.

**Цель исследовательской работы:** изучение особенностей культивирования огурцов и шпината в условиях *in vitro*.

**Для достижения цели были поставлены следующие задачи:**

1. освоить метод культивирования растений в условиях *in vitro*;
2. определить сорта огурцов и шпината, которые наиболее подходят для выращивания и проведения опытов по культуре клеток и тканей;
3. подобрать оптимальные условия стерилизации семян;
4. подобрать оптимальные условия для введения в культуру *in vitro*;
5. получить молодые растения шпината и огурцов, оценить их прорастание в условиях *in vitro*. ­

# **ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

## **Биотехнология производства культуры клеток, тканей и органов растений**

В настоящее время биотехнология является одним из важных направлений научно-технического прогресса. На основе современных достижений в области биологических и технических наук, генетической и клеточной инженерии можно использовать потенциальные возможности целенаправленно созданных живых систем, в частности растений, для повышения жизненного уровня людей [1].

Биотехнология – это использование живых систем, клеток, организмов для практических нужд человека.

Современная биотехнология – это наука и отрасль производства, развивающаяся в трех основных направлениях:

1. молекулярная биология и генетическая инженерия;
2. микробиология и микробиологическая промышленность;
3. культура клеток и тканей *in vitro*.

Современная биотехнология охватывает широкий круг методов, отраслей и задач, объединенных в несколько крупнейших блоков. В частности, в растениеводстве можно выделить следующие направления:

1. размножение и освобождение от вирусов;
2. создание новых форм растений с помощью методов генной инженерии;
3. клеточная селекция в культуре *in vitro*;
4. сохранение генетических ресурсов культурных и дикорастущих видов растений.

Выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах (*in vitro*) в стерильных условиях получило название метода культуры изолированных тканей [4].

Термин «культура клеток, тканей и органов растений» применяется к следующим частям растения: изолированным зародышам, изолированным органам, суспензионной культуре, культуре протопластов. Набор объектов растительного происхождения, которые можно перевести в культуру *in vitro*, достаточно широк. Как правило, большинство исследований проводится с изолированными фрагментами разных органов, тканей и клеток семенных растений.

Метод культуры клеток и тканей растений в настоящее время широко используется для решения ряда теоретических и практических задач биологии.

Клетки растений *in vitro* являются удобной моделью для изучения многих физиолого-биохимических процессов и генетики растительного организма. В настоящее время биотехнология – важнейший инструмент внедрения научных достижений в производство. Исследование процессов жизнедеятельности на клеточном и молекулярном уровнях позволили создать необходимые предпосылки возникновения и быстрого развития современной биотехнологии. [2]

## **Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений**

Изолированные ткани и клетки растений могут успешно расти только при отсутствии конкуренции с микроорганизмами. Все работы по культивированию растительных объектов необходимо производить в асептических условиях.

Изолированные фрагменты растения (экспланты), помещаемые на питательную среду, легко поражаются микроорганизмами, поэтому их также необходимо стерилизовать.

В настоящее время изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах, которые отличаются по своему составу в зависимости от вида культуры. В состав всех питательных сред обязательно входят необходимые растению макроэлементы. Лучшей формой азотного питания являются нитраты (калия или аммония), в некоторых случаях дополнительно используются аминокислоты. Кроме азотистых соединений необходимы фосфор, сера, кальций, сульфаты. Отсутствие в питательной среде микроэлементов уже в первом пассаже (пересадке) может уменьшить интенсивность роста тканей на 30-40 %, а при последующих – гибель тканей. В зависимости от вида изолированной культуры могут в небольших количествах использоваться: железо, бор, цинк, марганец, медь, алюминий, никель, йод и др.. [6]

Для успешного роста культур необходимы также источники углерода, поскольку даже зеленеющие, выращиваемые на свету ткани неаутоттрофны. Лучшим источником углеводного питания, является сахароза, используемая обычно в концентрации 2-5 %. Реже используется глюкоза или другие сахара.

Большинство тканей, культивируемых *in vitro*, способны к синтезу всех нужных для их жизнедеятельности витаминов, если все питательные элементы присутствуют в средах. Однако большинство культур синтезируют витамины в субминимальных количествах, поэтому дополнительное внесение витаминов в среду также способствует росту клеток, особенно это относится к витаминам группы В. Чаще используют витамины В1, В2, B3, а также кальция пантотенат, биотин, кислоты: аскорбиновую, никотиновую, фолиевую.

Обязательными компонентами питательных сред должны быть фитогормоны. К ним относятся ауксины, регулирующие рост и дифференцировку клеток и цитокинины, индуцирующие клеточное деление и др..

На рост и развитие растительных тканей и клеток *in vitro* большое влияние оказывают физические факторы: свет, температура, аэрация, влажность воздуха.

В некоторых случаях свет может использоваться как фактор, обеспечивающий морфогенез или активизирующий процесс синтеза биологически активных веществ. Для освещения чаще используют люминесцентные лампы с интенсивностью светового потока 1000-1500 люкс. Оптимальная температура для успешного роста большинства культур составляет 25-27 °С, для индукции их морфогенеза требуются более низкие температуры (18-25 °С). Влажность в помещении, где растут культуры, должна составлять 60-70 %.

Таким образом, чтобы вырастить растение в культуре *in vitro* необходимо:

* знать методы стерилизации семян и эксплантов;
* правильно приготовить питательную среду *in vitro*;
* подобрать условия для выращивания растений (свет, температуру).

# **ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

В качестве объекта исследования мы взяли огурец сорта «Кустовой» и шпинат сорта «Виктория». Выбор объектов исследования был обусловлен биологическими и сортовыми особенностями культуры.

Огурец сорта «Кустовой» относится к группе раннеспелых сортов. Период его вегетации составляет 45-50 суток, урожай формируется через 50-51 день после посадки [8]. Основным преимуществом сорта считают компактные размеры растений, которые не разрастаются в заросли, а больше напоминают миниатюрные кусты кабачков. Благодаря этому они не занимают много места и подходят для небольших земельных участков. Рост центрального стебля растения прекращается после заложения цветочной кисти на уровне 60-70 см, наблюдается умеренная ветвистость и короткие плети (35-60 см), пазухи листьев и междоузлия укороченные, за счет чего листовая масса выглядит обильной. Эти параметры (скороспелость и небольшая длина побега) идеально подходят для культивирования растений в условиях *in vitro*.

Шпинат сорта «Виктория». Один из лучших скороспелых сортов: от всходов до начала сбора в среднем 21 день. Характеризуется высоким содержанием минеральных веществ, белка, витаминов. Розетка листьев компактная, прижатая, 14-19 см в диаметре. Листья темно-зеленые, округлые, плотные, с пузырчатой и гофрированной поверхностью. Сорт устойчив к стеблеванию, относительно устойчив к болезням и вредителям. [9].

Посадочный материал был получен из обычных растений, выращиваемых в лабораторных условиях из семян.

Все манипуляции с семенами и эксплантами (введение в культуру, пересадка на свежую питательную среду) проводились в асептическом помещении (ламинар-боксе) стерильными инструментами.

Экспланты культивировали в асептических условиях на питательной среде Мурасиге и Скуга с добавлением ауксина (0,5-2 мг/л) и гиббереллина ГА3 (2 мг/л), содержание сахарозы – 20 г/л, глюкозы – 20 г/л.

Растения выращивали в тепличных условиях при разном спектральном освещении.



*Рисунок 1. Теплица.*

Опыты проводили в 2-3 кратной повторности. Анализировали по 10-15 растений.

# **ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Изучив литературу по разным сортам огурцов и шпината, мы пришли к выводу, что огурцы сорта Кустовой и шпинат сорта Виктория подходят нам больше всего.

Основными стерилизующими агентами в наших опытах служили растворы перманганата калия 1 %, перекиси водорода 3 % и этилового спирта 70 %.

Для снижения повреждающего эффекта этилового спирта на семена и растительные экспланты мы уменьшили его концентрацию до 70 %.

Если использовать для стерилизации только 70 % раствор этилового спирта или только 3 % раствор пероксида водорода, то зараженность растительных объектов могла достигать 75 %. Заражение происходило от растительного материала. Заражающим объектом была грибная микрофлора.

Поэтому мы стали использовать последовательную стерилизацию тремя препаратами. 

*Рисунок 2. Стерилизация семян.*

От применения препаратов, содержащих хлор (хлорамином, гипохлорит натрия, гипохлорит кальция) и токсичных препаратов (сулема, диацид) мы отказались, так как хотели подобрать менее опасные и вредные стерилизующие агенты.

Изначально нами была выбрана следующая схема стерилизации семян шпината и огурцов: 1 % раствор KMnO4 (2 минуты) 🡪 3 % раствор H2O2 (2 минуты) 🡪 70 % раствор этилового спирта (3 минуты).

Данный метод стерилизации нам не подошёл, так как после нескольких дней проращивания в чашках Петри в 70 % случаев обнаружились следы грибной микрофлоры.

В связи с этим мы изменили способ стерилизации семян: 1 % раствор KMnO4 (5 минут) 🡪 3 % раствор H2O2 (5 минут) 🡪 70 % раствор этилового спирта (5 минут). Это снизило зараженность до 0-10 %.

После выдерживания в дезинфицирующих растворах семена промывали дистиллированной водой и помещали на чашки Петри.

Спустя двое суток семена огурцов сорта Кустовой проросли, через четверо суток проросли семена шпината сорта Виктория.

После прорастания семян мы их пересадили в питательную среду. Но перед этим очистили зародыши от семенной кожуры.

Все работы с культурой клеток и тканей *in vitro* проводили в стерильных условиях в ламинар-боксе, стерильными инструментами, в стерильной посуде, на стерильных питательных средах.

В случае нарушения стерильности на средах развивались микроорганизмы (грибы, бактерии), нарушающие состав среды и подавляющие рост растительных эксплантов.

Все поверхности ламинара обрабатывали 96 % спиртом, простерилизованные инструменты, материалы, растительный материал помещали на стол бокса и включали перед работой ультрафиолетовое излучение и биофильтры на 1 час 45 минут. Для работы в ламинар-боксе надевали стерильный халат, руки обрабатывали 96 % спиртом или 0,05 % раствором хлоргексидина биглюконата. Пинцеты, скальпели и препарировальные иглы, микробиологические петли и лезвия помещали в стакан с 96 % спиртом. Перед каждой манипуляцией инструменты обжигали на пламени спиртовки и остужали.

Стерилизация питательной среды осуществлялась в автоклаве при температуре 123 °С и давлении 1 атм. в течение 40 мин. Выше температуру использовать нельзя, т. к. при этом разрушаются фитогормоны. Уменьшение времени стерилизации до 30 минут приводило к тому, что часть пробирок с питательной средой оказывалась зараженной еще до посадки объекта.

Стерилизацию эксплантов (зародышей растений) проводили в асептических условиях. Изначально была проведена поверхностная стерилизация. Семена, из которых был извлечен зародыш, обрабатывали раствором пероксида водорода (3 %) и снимали семенную кожуру.

*Рисунок 3. Очистка семян от кожуры.*

Затем зародыши в стерильных условиях последовательно обрабатывали следующими дезинфицирующими растворами: 1 % раствором перманганата калия и перекисью водорода по 1 мин. Далее пересаживали экспланты на питательную среду.

Для обработки рук перед работой мы использовали готовый препарат 0,05 % раствора хлоргексидина биглюконата. Препарат покупался в аптеке. Он проявляет бактерицидное действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и фунгицидное действие. Хлоргексидин биглюконат приходит на смену хлорамину и начинает широко применяться в медицинских учреждениях для дезинфекции рук.

Мы установили, что для огурцов и шпината удобнее использовать твердые (агаризированные) питательные среды. Приживаемость зародышей приближалась к 100 %. На таких средах удобно производить различные манипуляции с объектами, например, частую пересадку растений. Для длительного культивирования растений питательная среда разливалась в пробирки большого объема (47 мл). Пробирки заполнялись питательной средой на ¼ от общего объёма.

Состав питательной среды необходимо подбирать для каждого вида растений. Для культивирования растений огурцов и шпината мы использовали среду Мурасиге-Скуга. [5]



*Рисунок 4. Приготовленная питательная среда Мурасиге-Скуга.*

Для стимуляции биохимических реакций в клетке используют биологические катализаторы – витамины группы В (В1, В6, В12), РР (никотиновую кислоту), фолиевую кислоту, мезоинозит.

Для управления процессами формообразования в культуре тканей необходимы биологические регуляторы роста и развития – фитогормоны.

При культивировании растений мы использовали следующие фитогормоны: гиббереллин ГА3 (2 мг/л) и ауксин (2 мг/л). Растворы фитогормонов желательно готовить непосредственно перед работой со средами.

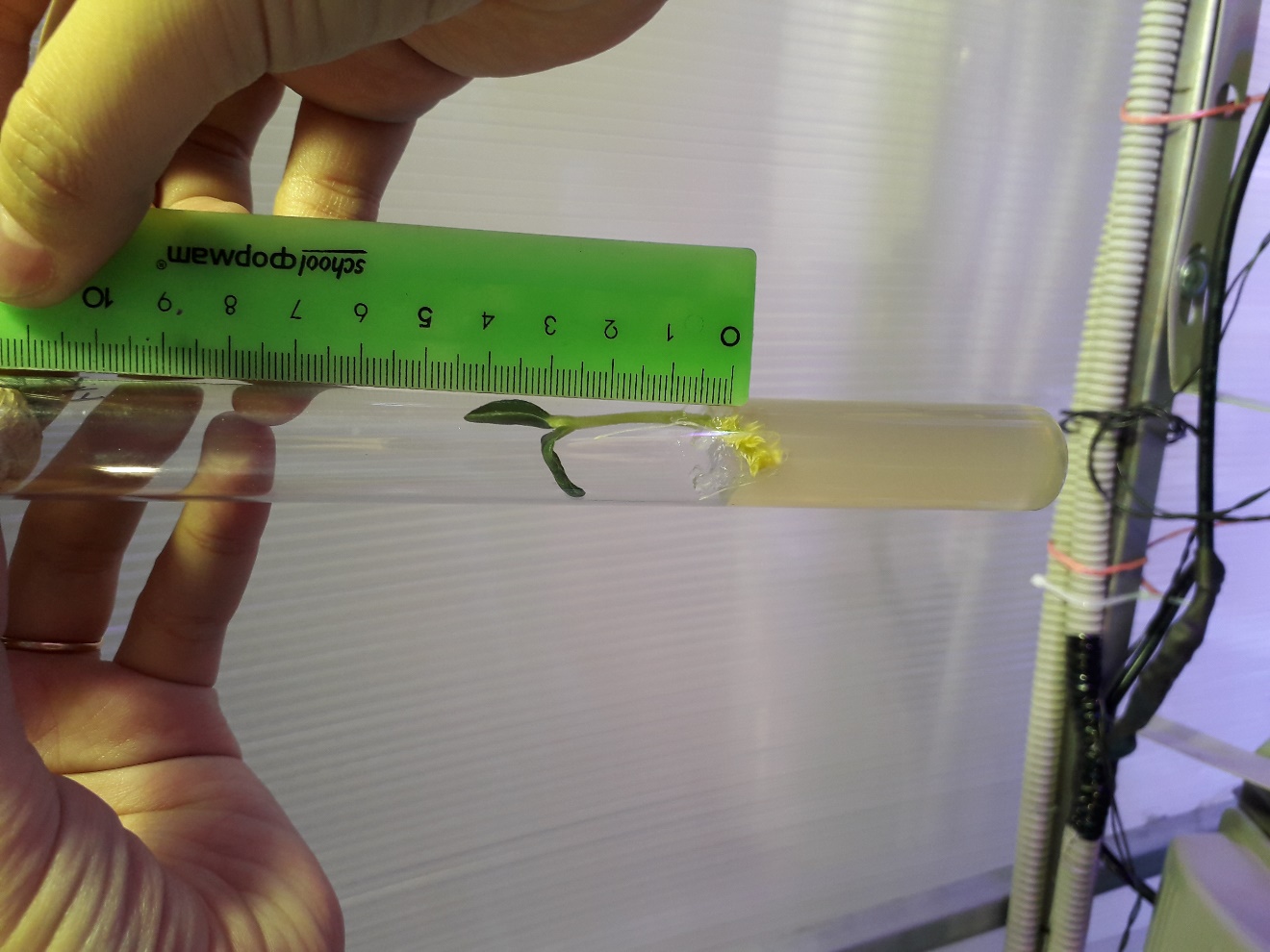
*Таблица 1. Модифицированная питательная среда Мурасиге-Скуга для культивирования огурцов и шпината.*

|  |  |
| --- | --- |
| Компоненты питательной среды | |
| Маточный раствор макросолей  Маточный раствор микросолей  Fe-хеллат  CaCl2  Тиамин-HCl  Пиридоксин-HCl  Витамин В12  Никотиновая кислота  Фолиевая кислота  Мезоинозит  Гидролизат казеина  Аденин  Пантотенат Са  Рибофлавин  Биотин  Активированный уголь  ГК  Кинетин  Сахароза  Глюкоза  Агар-агар | 50 мл/л  1 мл/л  5 мл/л  50 мл/л  1 мг/л  1 мг/л  0,015 мг/л  2 мг/л  0,5 мг/л  100 мг/л  1 г/л  40 мг/л  10 мг/л  0,5 мг/л  1 мг/л  10 г/л  2 мг/л  0,5 мг/л  20 г/л  20 г/л  7 г/л |
| рН 5,7-5,8 | |

Таким образом, подбор оптимальных условий культивирования (состава питательной среды, концентрации витаминов и фитогормонов) влияет на рост и развитие растений. Соблюдение стерильности – одно из основных условий работы с растениями в условиях *in vitro*.

Проросшие семена в ламинар-боксе мы очистили от кожуры и 25 ноября 2019 года посадили зародыши в большие пробирки с питательной средой.

Растения росли довольно быстро. Спустя 8 дней после посадки эксплантов средняя высота побега огурца сорта Кустовой составила 44,5 мм. Средняя высота побега шпината сорта Виктория составила 51 мм.



*Рисунок 5. Огурец сорт «Кустовой» спустя 8 дней после посадки.*

**

*Рисунок 6. Шпинат сорта «Виктория» спустя 8 дней после посадки.*

В 85 % случаев пробирки со средой не были заражены бактериями или грибной микрофлорой. Но в некоторых пробирках (15 % от общего числа) мы наблюдали розовые и белые пятна, что свидетельствовало о наличии в пробирках бактериальных культур. Заражение питательной среды могло произойти при посадке зародышей в пробирки.

На интенсивный рост растений влияли многие факторы:

* в состав питательной среды входят различные соли, витамины, кислоты, которые создают растениям комфортные условия для питания и развития;
* в состав питательной среды входят фитогормоны, такие как ауксин (0,5-2 мг/л) и гиббереллин ГА3 (2 мг/л), которые вызывают резкое ускорение роста зелёной массы растений;
* растения выращивались в тепличных условиях под действием разного спектрального освещения, что благоприятно сказывается на росте и развитии растений.

# **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

По итогам исследовательской работы можно сделать вывод, что цель и задачи, поставленные на 1 этапе работы, достигнуты.

Результатом проведенных исследований стало освоение метода культивирования растений в условиях *in vitro*. Мы подобрали оптимальные условия для введения в культуру эксплантов растений огурцов сорта «Кустовой» и шпината сорта «Виктория».

Также смогли подобрать оптимальные условия для стерилизации семян огурцов и шпината, предотвратили размножение грибковой микрофлоры.

Для проведения физиологических экспериментов приготовили твердую (агаризированную) питательную среду Мурасиге-Скуга. Выращивали растения в тепличных условиях при разном спектральном освещении.

Спустя 8 дней после посадки, средняя высота побега огурца сорта «Кустовой» составила 44,5 мм. Средняя высота побега шпината сорта «Виктория» составила 51 мм.

В 85% случаев пробирки со средой не были заражены бактериями или грибной микрофлорой.

Таким образом можно сделать вывод, что на рост и развитие растений в условиях *in vitro* влияют многие факторы:

1. Правильная стерилизация семян растений;
2. Правильно приготовленная питательная среда, где подобраны компоненты в определенном количественном соотношении, в соответствии с видом растения;
3. Обработка растений фитогормонами;
4. Внешние условия, в которых прорастают растения (свет, температура и тд.).

# **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Бабикова, А. В. Растение как объект биотехнологии / А. В. Бабикова, Т. Ю. Горпенченко, Ю. Н. Журавлев // Комаровские чтения. – 2007. – Вып. LV. – С. 184-211.
2. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе / Р. Г. Бутенко. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Викторов, Д. П. Практикум по физиологии растений / Д. П. Викторов. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 1991. – 160 с.
4. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учеб. пособие / Составители: И. К. Сорокина, Н. И. Старичкова, Т. Б. Решетникова, Н. А. Гринь. – Саратов: Изд-во СГУ им.Н. Г. Чернышевского, 2002. – 45 с.
5. Шевелуха, В. С. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. / В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, С. В. Дегтярев и др.: Под ред. В. С. Шевелухи. – М.: Высш. шк., 1998. – 416 с.
6. Широков, А. И. Основы биотехнологии растений: Электронное учебно-методическое пособие / А. И. Широков, Л. А. Крюков. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 49 с.
7. Кустовые огурцы. Правила посадки и ухода [Офиц. сайт]. URL: <https://fermer.blog/tag/sorta-kustovyh-ogurcov> (Дата обращения: 25.11.2019)
8. Огурец Кустовой. Описание сорта [Офиц. сайт]. URL: <https://ogorodum.ru/ogurec-kustovoj-opisanie-sorta-foto-i-otzyvy.html> (Дата обращения: 25.11.2019)
9. Шпинат огородный Виктория. Описание [Офиц. сайт]. URL: <https://leplants.ru/spinacia-oleracea-viktoriya/> (Дата обращения: 27.11.2019)
10. Шпинат. Уход за шпинатом [Офиц. сайт]. URL: <https://cadiogorod.ru/shpinat-rastenie-vyrashhivanie-shpinata-uxod-za-shpinatom/> (Дата обращения: 24.11.2019)