Исследовательская работа

**СОХРАНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ БИОТЕХНОЛОГИИ НА ПРИМЕРЕ КАРТОФЕЛЯ**

Филистова Полина, 10 класс

Направляющая организация:

## ГБОУ «Елабужская школа-интернат для детей с ограниченными возможностями здоровья» Елабужского муниципального района Республики Татарстан

Научный руководитель:

учитель биологии и химии ГБОУ «Еллабужская

школа-интернат для детей с овз» Долгих Е.А.,

2020

**Содержание**

Введение…………………………………………………………..………………3

1. Принципы культивирования тканей и органов высших растений…………4

1.1. Создание условий асептики……………………………………………4

1.2. Питательные среды……………………………………………………..4

1.3. Физические факторы культивирования……………………………….5

2. Объекты и методы исследования………………….…………………………6

3.Результаты исследования……….......................................................................7

Заключение……………………………………………………………..…………9

Литература……………………………………………………………………….10

Приложение……………………………………………………………..……….11

**Введение**

**Актуальность.** Биотехнология растений основана на методах культуры клеток и тканей. Культурой клеток, тканей и органов растений называется выращивание отдельных клеток, а также тканей и органов на искусственной питательной среде в асептических условиях. Этот метод лежит в основе изучения биологии клетки, существующей вне организма. Технология предусматривает получение в пробирках - ценного безвирусного семенного материала, поэтому эта тема актуальна на сегодняшний день.

**Цель:** Изучить особенности метода биотехнологии как способа сохранения биологического биоразнообразия растений.

**Задачи:**

1. Изучить историю развития метода культивирования клеток, тканей и органов растений;
2. Проанализировать принципы культивирования тканей и органов высших растений;
3. Выделить апикальную меристему картофеля и культивировать на питательную среду.

**Объект:** меристема картофеля.

**Предмет:** метод культуры тканей.

**Методы исследования:**

1. Изучение и анализ научной литературы.

2. Эксперимент (опыт).

3. Наблюдения объектов.

4.Обобщение материала.

**Новизна исследования:** обоснование возможности размножения растений культурой ткани ранее не размножаемых этим способом в Татарстане.

1. **Принципы культивирования тканей и органов высших растений**
   1. **Создание условий асептики**

Необходимым условием работы с культурой изолированных тканейявляется соблюдение строгой стерильности. Для соблюдения условийасептики при выполнении работ по культивированию растений *in vitroм*стерилизации должны подвергаться операционная комната, в которойпроизводят изоляцию и посадку культур, одежда и руки работающегоперсонала, посуда, используемая для культивирования объектов, всенеобходимые инструменты и материалы, питательные среды, объектыкультивирования.

Таким образом, как показывает практика, небрежность, допущеннаяпри проведении эксперимента, даже при хорошей оснащенностирабочего места, сводит к нулю все затраченные усилия. Поэтому чистотагораздо важнее изысканного специального оборудования.

* 1. **Питательные среды**

Общие навыки работы в стерильных условиях, основныепрактические аспекты получения культуры растительных клеток итканей и ее поддержания группируются вокруг проблемы подбораподходящей среды для культивирования. Компоненты среды длявыращивания растительных объектов *in vitro* условно можно разделитьна 5 групп:макроэлементы;микроэлементы;источники углерода;витамины;регуляторы роста.

Минеральная основа питательных сред для культивированияизолированных клеток и тканей должна включать все необходимыерастениям макроэлементы (азот, фосфор, серу, калий, кальций, магний,железо) и микроэлементы (бор, марганец, цинк, медь, молибден и др.).

Таким образом, от состава питательной среды в значительной мере зависит успехвыращивания клеток, тканей, органов растений. Поэтому разработке исовершенствованию состава сред уделялось и уделяется много внимания.

* 1. **Физические факторы культивирования**

Для успешного культивирования изолированных клеток и тканейрастений необходимо соблюдать определенные физические условиявыращивания.

Температурный фактор оказывает значительное влияние на рост вусловиях *in vitro*, активность ферментов, часть из которых являетсянеобходимой для метаболизма источников питания и др.

Условия освещения также оказывают влияние на рост изолированныхклеток, тканей и органов растений.

Детерминированные к морфогенезу ткани переносят на свет и далеекультивируют их при освещенности 1000–4000 лк. Культивированиеизолированных меристем и их микроразмножение также происходит насвету.

Влажность в культуральной комнате должна составлять 60–70 %.Более сухой воздух способствует усыханию питательной среды впробирках и колбах, если они закрыты ватными пробками, изменению ееконцентрации и нарушению условий культивирования.

При поверхностном и суспензионном выращивании клеточныхпопуляций важное значение имеют условия аэрации и состав газов.

Таким образом, культивирование клеток и тканей зависит от многихусловий внешней среды, и действие их не всегда хорошо известно.Поэтому при введении в культуру нового вида растений необходимотщательно изучить влияние физических факторов на рост ифизиологические характеристики этой культуры.

1. **Объекты и методы исследования**

**Эксперимент (опыт):**Выделение апикальных меристем картофеля, их культивирование с целью получения безвирусных растений картофеля.

**Оборудование и реактивы:** Чашка, агар, микроволновка, вода, колба Эрленмейра, фломастер, пробирки, клубни картофеля, Бинокулярная лупа, скальпели, препаровальные иглы, лезвия, зажатые в держателе.

1. Приготовили питательный агар

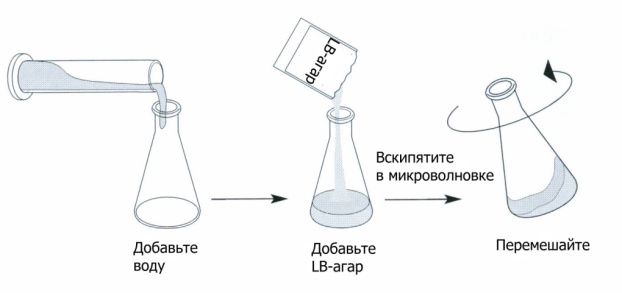
Пробирки с агаризованной средой залили как минимум за три дня до предполагаемого времени использования. Им дали постоять два дня на столе при комнатной температуре, а потом убрали в холодильник. За два дня агар подсыхает и лучше впитывает трансформационный буфер.

Рисунок 1 – Схема приготовления агара

Чтобы приготовить 500 мл LB-агара, добавили 500 мл воды к содержимому пакета с сухим LB-агаром в литровой или двухлитровой колбе Эрленмейера. Перемешали вручную как показано на рисунке 1.. Довели агар до кипения в микроволновке. Вынули и аккуратно перемешали. Повторили процедуру как минимум 3 раза, уменьшив мощность печи до минимума, пока агар полностью не растворится.

1. Подписали пробирки.

Подписалипробирки нестираемым фломастером, с обратной стороны вдоль края пробирки.

1. Залили пробирки.

Залили из колбы агар. Наливали примерно на треть-половину пробирки, ~12 мл. Закрылипробирку, и перешли к следующей. Когда закончили, оставили их остывать в том же положении.

1. Прорастили картофель.

Клубни картофеля хранили в течение недели при температуре 4-8оС, затем прорастили в темноте при температуре 20-22оС.

1. Вычленили меристему.

Инструменты, используемые для вычленения (пинцеты, скальпели, иглы), стерилизовали перед каждым вычленением, погружая в спирт с последующим обжиганием. От тщательно вымытых клубней отделяли отростки и стерилизовали в 0,1%-ном растворе диацида в течение 3-5 минут, с последующей трехкратной промывкой стерильной Н2О. Простерилизованные ростки поместили в стерильную чашку Петри и добавили несколько капель автоклавированной воды для предупреждения их подсыхания. Перед вычленением с верхушки ростка удалили покровные листочки, последовательно обнажили боковые и верхушечные меристемы с примордиальными листочками. Эту операцию проводили с помощью препаровальной иглы под бинокулярной лупой. Меристему размерами 100-250 мкм без листовых зачатков вычленили обычной тонкой иглой, зажатой в держатель. Вычленять можно как верхушечную, так и боковые меристемы.

1. Поместили эксплант на питательную среду.

Меристему на острие иглы перенесли на поверхность питательной среды в пробирку, закрыли ее пробкой над пламенем горелки и вставили в штатив. После заполнения штатив с пробирками закрыли целлофановым колпаком для предупреждения подсыхания сред.

**3. Результаты исследования**

В ходе работы изучили факторы культивирования тканей растений на примере культивирования меристемы картофеля.

Определяющую роль на начальном этапе размножения культурой ткани играет схема стерилизации культуры, а так же условия содержания (Приложение 1).

В результате исследований получили следующие результаты:

1. Получилибезвирусный посадочный материал картофеля. Это позволяет увеличить урожайность картофеля на 30% и более.

2**. Высокий коэффициент размножения.**

2. Возможность долго хранить укорененный в пробирках посадочный материал. Даже в обычных бытовых холодильниках удается сохранять пробирочные растения более двух лет. В этом случае нужно частично обновлять питательную среду.

3. **Проведение работ по размножению посадочного материала независимо от климатических и погодных условий в течение года и некоторые другие.**

**Недостатки метода культуры тканей:**

- Необходимость соблюдения строгих условий асептики;

- Нестабильность свойств клеток и возможность их нежелательного смешения;

- Дороговизна химических реагентов;

**Заключение**

Метод биотехнологии имеет немаловажное значение для процессов эмбриоидогенеза и органогенеза. Этот прием имеет, несомненно, большое будущее. Используя его, можно создать своеобразный банк культурных и дикорастущих видов растений, которые могут в нем сохраняться неопределенно долгое время. Так же можно хранить и коллекции растений, например, коллекции сортов или видов растений, которыми в любое время может воспользоваться селекционер, выбирая нужные ему родительские пары для скрещивания и к нужному сроку, доводя их до стадии цветения. Наконец, таким способом можно хранить набор здоровых безвирусных сортов различных растений и при необходимости использовать их в качестве исходного материала для размножения в необходимом количестве.

В результате исследований получили следующие результаты:

1. Получили безвирусный посадочный материал картофеля. Это позволяет увеличить урожайность картофеля на 30% и более.

2**. Высокий коэффициент размножения.**

3. Возможность долго хранить укорененный в пробирках посадочный материал. Даже в обычных бытовых холодильниках удается сохранять пробирочные растения более двух лет. В этом случае нужно частично обновлять питательную среду.

4. **Проведение работ по размножению посадочного материала независимо от климатических и погодных условий в течение года и некоторые другие.**

**Недостатки метода биотехнологии:**

- Необходимость соблюдения строгих условий асептики;

- Нестабильность свойств клеток и возможность их нежелательного смешения;

- Дороговизна химических реагентов.

**Список использованной литературы**

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей растений и физиология морфогенеза. - М.: Наука, 1964.
2. Бутенко Р. Перспективы, открываемые клеткой // Наука и жизнь. 1986. - № 3.
3. Бутенко,Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе: учеб. пособие. М.: ФБК–ПРЕСС, 1999. - 160 с.
4. Высоцкий В. Питомник в пробирке // Наука и жизнь. 1980. - № 4.
5. Дитченко Т.И. Культура клеток, тканей и органов растений. Минск, 2007. – 102 с.
6. Биотехнология растений: культура клеток. М.: Агропромиздат, 1989. 280 с.
7. Биотехнология сельскохозяйственных растений. М.: Агропромиздат, 1987. - 302 с.
8. Валиханова, Г.Ж. Биотехнология растений / Г.Ж. Валиханова. Алматы: «Конжык», 1996. - 272 с.
9. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. - 589 с.
10. Егорова, Т.А. Основы биотехнологии: учеб. пособие / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. М.: Изд. Центр «Академия», 2003. -208 с.
11. Калинин, Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев: Наукова думка, 1980. - 356 с.
12. Першина Л.А. Культивирование изолированных клеток и тканей высших растений: учеб. пособие. Ч. 1. Новосибирск: НГУ, 2000. - 46 с.
13. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.С. Воронин [и др.]. М.: Высш. шк., 2003. - 469 с.

**Приложение 1**

**Стерилизация исходного растительного материала**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Объект** | **Время стерилизации, мин** | | | |
| **диацид**  **0,1 %** | **сулема**  **0,1 %** | **гипохлориты**  **Na, Са**  **5–9 %** | **перекись**  **водорода**  **10–12 %** |
| Семена сухие | 15–20 | 10–15 | 15–20 | 12–15 |
| Семена набухшие | 6–16 | 6–8 | 10–15 | 6–8 |
| Ткани стебля | 20–40 | 20–25 | 20–25 | – |
| Листья | 1–3 | 0,5–3 | 3–6 | 3–5 |
| Апексы | 1–10 | 0,5–7 | 3–15 | 2–7 |