Муниципальное автономное общеобразовательное учреждение

«Татановская средняя общеобразовательная школа»

Тамбовского района Тамбовской области

«Клональное микроразмножение слаборослых клоновых подвоев яблони»

Авторы: Глазова Анастасия,
обучающаяся 10 класса

Руководитель: Попова О.Е.,
методист, учитель химии

Научный консультант:
Верзилин А.В., профессор, доктор с/х наук

село Куксово, 2018

Содержание

1. Введение ……3
2. Обзор литературы……..5
3. Практическая часть……...9
4. Экономическая эффективность выращивания отводков в маточнике……13
5. Выводы…….14
6. Список литературы…….15
7. Приложения…….16

Введение

Яблоня – самая распространённая в России плодовая культура. Она занимает около 70% всех площадей плодовых насаждений в стране. Это объясняет её производственно-биологическими особенностями: широкий сортимент позволяет выращивать эту культуру во многих регионах, а содержание в плодах сахаров, органических кислот, минеральных солей, биологически активных веществ – микроэлементов, антибиотиков, различных витаминов и антирадиантов, ферментов и других полезных составляющих позволяет рассматривать эту культуру не только как ценный продукт питания, но и как диетическое и целебное средство (Иванов, Верзилин, Скрипников, 2000; Гудковский, 2001).

Увеличение производства яблони может быть достигнуто за счёт дальнейшего развития садоводства, прогрессивных технологий возделывания и рационального использования земель.

Большой вклад в производство плодов может сделать любительское садоводство, которому отводится всё большая роль, особенно в настоящее время, когда сложное экономическое положение сельского хозяйства не имеет возможности расширения промышленных насаждений и обеспечения населения плодами и овощами в полном объёме.

Актуальность работы над данным проектом определяется возросшими в современных условиях научно-социальными потребностями.

Работа с растениями, поиск оптимальных технологий выращивания, само пребывание в цветущем саду, ощущение непосредственного участия в сотворении прекрасного учит чувствовать и понимать живой растительный организм, его нужды и будит в человеке Человеческое.

Наша школа МАОУ «Татановская СОШ» имеет пришкольный участок площадью 1 га, где проводятся опыты, выращиваются овощные культуры, саженцы плодовых деревьев и т. д.

В 2012 году наша школа стала региональным ресурсным центром агробизнес-образования. На территории учебно-опытного участка заложен плодовый сад, где применяются интенсивные методы садоводства. В лаборатории биотехнологии на базе кабинета биологии есть возможность заниматься научной деятельностью. Нас заинтересовала проблема клонального микроразмножения слаборослых клоновых подвоев яблони. Кроме того, здесь можно получить прибыль с точки зрения предпринимательства.

После выполнения проекта мы продолжим изучение и работу над темой выращивания плодовых саженцев яблони методом прививки и окулировки.

Цель: выращивание оздоровленного посадочного материала яблони в процессе микроклонального размножения и получение прибыли в результате его реализации на рынке сельскохозяйственной продукции.

Задачи:

- освоение основных приемов работы в биотехнологической лаборатории;
- введение растений в культуру in vitro;
- подбор питательных сред для культивирования яблони;
- осуществление клонирования введенных в культуру in vitro яблонь;
- адаптация полученных растений яблони в открытом грунте;
- закладка маточника яблони;
- рассчёт экономической эффективности выращивания отводков в маточнике.

Обзор литературы

В ходе работы были изучены публикации отечественных авторов по сельскохозяйственной биотехнологии, биотехнология сельскохозяйственных растений, а также методическое пособие по биотехнологии.

В природе существует два способа размножения растений: семенной и вегетативный. К особенностям семенного размножения следует отнести генетическую пестроту получаемого посадочного материала и длительность вегетационного периода. При вегетативном размножении сохраняется генотип материнского растения и сокращается продолжительность вегетационного периода.

Достижения с области культуры клеток и тканей привели к созданию нового метода вегетативного размножения – микроклонального размножения (получение в условиях in vitro (в пробирке), неполовым путём растений, генетически идентичны исходному экземпляру). В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки давать начало целому растительному организму и регенерации. Первые исследования начались в конце 50-х годов 20 века. В нашей стране работы проводились в лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева. Этот метод имеет ряд преимуществ:

1. получение генетически однородного посадочного материала;
2. освобождение растений от вирусов;
3. высокий коэффициент размножения;
4. сокращение продолжительности селекционного процесса;
5. ускорение перехода растений от ювенальной к репродуктивной фазе развития;
6. получение растений, трудноразмножаемых традиционными способами;
7. возможность проведения работ в течение круглого года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочных материалов;
8. возможность автоматизировать процесс выращивания.

Область применения микроразмножения разнообразна и имеет тенденцию к постоянному расширению:

1. размножение взрослых древесных пород (каштан, дуб, клён, осина);
2. сохранение редких и исчезающих лекарственных видов растений;
3. получение вторичных метаболитов, используемых для производства лекарств (алкалоидов, глюкозидов, стероидов), вкусовых добавок (сахаров); гормонов, витаминов, белков;

4. использование культурных клеток в качестве источника новых химических веществ;

5. размножение и промышленное производство плодоовощных и декоративных растений [3].

Пионером клонального микроразмножения считается французский ученый Жан Морель, который в 50-х годах двадцатого века получил первые растения - регенеранты орхидей. В это время техника культивирования апикальных меристем in vitro была уже хорошо разработана. Как правило, исследователи в качестве первичного эксплантa использовали верхушечные меристемы травянистых растений: гвоздики, хризантемы, подсолнечника, гороха, кукурузы и т.д. В нашей стране работы по клональному микроразмножению были начаты в 30-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза ИФРа. Под руководством Р.Г.Бутенко были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы и др. растений и предложены промышленные технологии. В дальнейшем исследования по клональному микроразмножении охватили и древесные растения.

Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 20-х годов нашего столетия и связаны с именем Готре, который показал, что камбиальные ткани некоторых растений способны к каллусогенезу in vitro. Но первые растения - регенеранты осины, доведенные до почвенной культуры, были получены лишь в середине 60-х годов Матесом.

Культивирование тканей хвойных пород in vitro долгое время редко использовалось как объект исследования. Это было связано со специфическими трудностями культивирования тканей, изолированных из растения. Известно, что древесные, и особенно хвойные растения характеризуются медленным ростом, трудно укореняются, содержат большое количество вторичных соединений (фенолы, терпены и т.д.), которые в изолированных тканях активируются. Окисленные фенолы обычно ингибируют деление и рост клеток, что ведет к гибели первичного эксплантa или уменьшению способности тканей древесных растений к регенерации адвентивных почек, которая с возрастом растения-донора исчезает практически полностью. В настоящее время, несмотря на перечисленные трудности, насчитывается более 200 видов древесных растений из 40 семейств, которые были размножены in vitro (каштан, дуб, береза, клен, сосна, ель, секвойя и др.).

Таким образом, клеточная биотехнология, основанная на способности клеток и тканей к регенерации, позволяет человеку решать многие актуальные вопросы селекции, связанные с проблемой растущего населения Земли.

Этапы и методы микроклонального размножения растений

Процесс микроклонального размножения можно разделить на 4 этапа:

1. выбор растения-донора и получение хорошо растущей стерильной культуры;
2. собственно микроразмножение, когда достигается максимальное количество микропобегов;
3. ускорение развития размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям;
4. выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации и посадке в поле [3].

Изучив предложенные в литературе методы микроразмножения растений, мы выбрали метод, используемый в лаборатории МичГАУ - индукции адвентивных почек эксплантата.

Он основан на способности изолированных частей растений при благоприятных условиях питательной среды, восстанавливать недостающие органы и регенерировать целые растения из разных частей (изолированного зародыша, листа стебля, семядолей, чешуек сегментов корней и зачатков соцветий) [3].

Мы проводили микроклональное размножение подвоя яблони 118. Выращивали их на питательной среде Мурасиге-Скуга. Через 3-4 недели культивирования меристема развивалась в проросток, в основании которого формировались адвентивные почки, которые быстро росли и давали начало новым почкам. В течение 6-8 недель образовались конгломераты почек, связанные между собой соединительной тканью и находящиеся на разной стадии развития. Появились листья на коротких черешках, в нижней части которых сформировались новые адвентивные почки. Это почки мы разделили и, затем пересадили на свежую питательную среду. Таким образом, от одного материнского растения можно получать несколько миллионов растений-регенератов в год.

Прежде всего, необходимо вспомнить, что привитые яблони состоят из двух частей: надземной, т. е. штамба и кроны, и подземной – корневой системы. В плодоводстве корневую систему яблони принято называть подвоем. Сами подвои могут быть как семенного происхождения, так и вегетативно размножаемыми (клоновыми) от одного растения, обладающего определёнными свойствами.

Клон в растениеводстве – это совокупность растений, полученных от исходного растения способом вегетативного размножения. При этом все растения сохраняют свойства исходного растения.

Рис. 1. В.И. Будаговский

Рис. 2. Н.Г. Жучков

Первые зимостойкие слаборослые клоновые подвои яблони для Тамбовской области и других регионов средней полосы России были получены в первой половине XX столетия известным селекционером В. И. Будаговским под руководством профессора Н. Г. Жучкова.

В. И. Будаговский методом гибридизации скрестил слаборослую вегетативно размножаемую форму яблони М8 (но не зимостойкую) с зимостойким сортом яблони Красный штандарт селекции В. И. Мичурина. Так был получен первый карликовый зимостойкий подвой Парадизка Будаговского.

В дальнейшем при скрещивании М8 с сортом яблони И. В. Мичурина Таёжное был получен полукарликовый подвой 13-14. В дальнейшем при использовании в качестве родительских пар этих подвоев (Парадизки Будаговского (ПБ) и 13-14) и был получен целый ряд подвоев яблони, в том числе и наиболее популярный в Тамбовской области подвой 54-118.

Полукарликовый клоновый подвой яблони 54-118 отличается высокой зимостойкостью корневой системы (корни сохраняются при – 15-16 С), хорошо укореняется в маточниках, а также зелёными, одревесневшими и корневыми черенками в защитном грунте, имеет мощную корневую систему, хорошо закрепляется в почве.

Прививка сортов на эти подвои обеспечивает повышение урожайности, компактность кроны, быстрое вступление в плодоношение, ранее окончание роста побегов, лучшее вызревание древесины.

Практическая часть

Приготовление питательной среды для культивирования изолированных органов, тканей и клеток растений

Для обеспечения роста и развития любой растительной ткани или органа растения требуется соблюдение внешних физико-химических условий (освещённости, температуры, влажности, кислорода для дыхания, углекислого газа для фотосинтеза), поступление элементов минерального и органического питания. При культивировании растительных эксплантатов в закрытых пробирках фотосинтез затруднён, поэтому требуются более сложные по составу среды, обеспечивающие все потребности тканей или органов [2].

Культурные среды для растительных эксплантатов содержат следующие группы компонентов:

1. неорганические макроэлементы в виде солей (N, P, K, S, Fe, Ca, Mg) и микроэлементы (Co, Cu, Zn, B, Mo, Mn, J, Ni);
2. углеводы – сахароза, глюкоза – основа гетеротрофного питания растений in vitro, обеспечивает рост эксплантата.
3. аминокислоты, получаемые при гидролизе молочного белка казеина. Они синтезируются in vitro из сахара и минеральных веществ, их добавка оказывает положительное влияние на эксплантаты из меристем.
4. витамины (B1, B6, C, никотиновая кислота, и др.) – являются коферментами, обеспечивающих активность, улучшают адаптацию тканей и их рост.
5. фитогормоны – стимулируют рост и деление клеток растений, направляет развитее эксплантата в нужную сторону: ауксины – получение корней, цитокинины – побеги, гиббереллин – ростстимурирующий гормон.
6. желирующее вещество (агар-агар) регулирует консистенцию среды [2].

Самой популярной и универсальной минеральной основой для питательных сред является минеральная часть среды Мурасиге-Скуга (МС).

1. Приготовим минеральную среду МС повышенной концентрации.
2. Взяли её 50 мл и развели дистиллированной водой до 500 мл.
3. Добавим 5 мл $CaCl_2$ и перемешаем с помощью магнитной мешалки.
4. Доведём pH до 5,7- 5,8 с помощью раствора HCl.
5. Добавим 25 мг инозита; 3,6 г агар-агар; 15 г сахарозы; по 5 мкл 6% раствора B1; 5% раствора B6; 25мкл никотиновой кислоты и 100 мкл аскорбиновой кислоты.
6. Полученный раствор поместим в микроволновую печь, доведём до кипения и растворения агар-агара.

7. Раствор разделим по 1,5 мл в пробирки и после остывания и отвердения автоклавируем.

Состав среды Мурасиге-Скуга.

Компоненты среды	0,5 л	1 л	2 л
МС *10	50 мл	100 мл	200 мл
$CaCL_2$	5 мл	10 мл	20 мл
pH	5,7 – 5,8		
Инозит	25 мл	50мл	100 мл
Агар-агар	3,6 г	7,2 г	14,4 г
Сахароза	15 г	30 г	60 г
В1 – 6 %	5 мкл	10 мкл	20мкл
В6 – 5 %	5мкл	10 мкл	20 мкл
Никотиновая кислота	25мкл	50 мкл	100 мкл
Аскорбиновая кислота	100мкл	200 мкл	400 мкл

На базе лаборатории биотехнологии «Татановской СОШ» были произведены следующие этапы микроклонального размножения подвоев яблони:

1. Введение в культуру *in vitro* (выбор растения донора, изолирование и стерилизация экспланта, высадка на питательную среду).
2. Микроразмножение путем:
   - стимуляции развития пазушных почек экспланта;
   - микрочеренкования побега, сохраняющего апикальное доминироваание;
   - стимуляции образования микроклубней и микролуковичек;
   - индукции образования адвентивных почек тканями листа, стебля, чешуйками и донцем луковиц и т.д.
3. Укоренение микропобегов.
4. Адаптация растений к условиям *in vivo* (перенос растений в субстрат и климокамеру или в условия теплицы в почву). Здесь растения формируют первичную корневую систему.

В октябре эти растения закладываются в маточник.

Выращивания вертикальных отводков короткого цикла в маточнике

Высаживают стандартные отводки в такой маточник весной, вертикально по схеме 150х30 см [1].

В течение следующего сезона проводят работы по поливу, прополки, рыхлению почвы, борьбе с болезнями и вредителями. Рано весной, до распускания почек, и при наступлении физической спелости почвы (когда

почва легко ссыпается с лопаты и не мажет её) отводки срезают «на пенёк», т.е. на высоту 3-5 см от поверхности почвы.

При культивировании маточника большой научный и технологический интерес представляет выбор органического субстрата для формирования холмика окучивания и оценка его влияния на качество и продуктивность отводков.

Органический субстрат служит для разрыхления почвы в холмике, т.е. для уменьшения плотности почвы, для лучей сохранности влаги, для обеспечения более постоянной температуры, что, в общем, создаёт наиболее благоприятные условия для роста и корнеобразования у отводков.

В качестве органических субстратов могут быть выбраны те отходы производства, которые имеются в данном регионе и не составляют большой ценности для других видов деятельности. Это древесные опилки, подсолнечная или рисовая шелуха, навоз и др.

Эти вещества могут использоваться в чистом виде для формирования холмика окучивания или в смеси с почвой в различном соотношении. Поиск наиболее эффективного состава субстрата при формировании холмика окучивания и может быть объектом исследований.

Сроки внесения опилок могут быть различными, однако с целью экономии средств и времени их целесообразно вносить при отрастании побегов в маточнике на 10-15 см. Это мульчирует почву, способствует сохранению влаги и препятствует прорастанию сорняков.

При составе субстрата «опилки + почва = 1 : 1» на 1 погонный метр вносят 0,06 кубометров опилок. Опилки должны быть влажными, что будет способствовать и лучшей сохранности влаги в корнеобитаемом слое почвы.

При достижении побегами высоты 20-25 см проводят подготовку к первому окучиванию. Для этого проводят перемешивание почвы с опилками. Проведение первого окучивания в этот период с предварительным перемешиванием почвы с опилками способствует сокращению ряда технологических операций, т.е. отпадает необходимость в лишних прополках и рыхлениях, что позволяет сократить затраты и сэкономить время.

Перемешивание почвы и опилок (барбатация) проводится мотокультиваторами на глубину 10 – 12 см как можно ближе к растениям.

При достижении побегами высоты 40 – 45 см проводится второе окучивание их на высоту 20 – 22 см.

К концу периода вегетации побеги заканчивают свой рост, верхушечная почка у них сформировывается, верхушка побега одревесневает и запасные вещества из листьев поступают в сердцевину побега и перетекают в его корневую систему. Всё это происходит в начале октября, и наступает период

отделения отводков. Однако к этому сроку побеги остаются облиственными и необходимо провести процесс дефолиации, т.е. удаления листьев с побегов. Эта операция проводится вручную.

После этого проводится разокучивание приростов (побегами их уже не называют, т.к. в плодоводстве побег – это прирост с листьями, а называют отводками). Эта операция проводится вручную мотыгами, при этом корневая система освобождается от субстрата очень осторожно, без поломов и задиров.

Отделение отводков проводится секаторами. Отделяют отводки от головки куста с оставлением прироста высотой 0, 3 – 0, 5 см, т.к. на этом пеньке остаются спящие почки, из которых на следующий год будут вновь отрастать побеги.

После отделения отводков сразу же приступают к их сортировке. При этом согласно действующему ОСТ 10 124-88 к 1 сорту относятся отводки с диаметром корневой шейки 7 – 12 мм, имеющие мочковатую корневую систему длинной не менее 7 см, ко 2 сорту относятся отводки, имеющие диаметр корневой шейки 5 – 7 мм, а длину корней не менее 5 см.

После сортировки растения сразу отправляются либо в хранилища, либо в прикопку. Прикопка необходима для предотвращения подсыхания корневой системы. Это особенно важно в сухие, ветреные, солнечные дни. Прикопка может быть временной либо постоянной. Для формирования постоянной прикопки выбирают ровный и сухой участок, где вода в случае выпадения осадков задерживаться не будет.

Для укладки отводков выкапываются траншеи глубиной 30 – 35 см, и в неё плотно помещаются пучки отводков с направлением верхушек приростов на юг. При наличии большого количества отводков прокапывается рядом новая траншея, а землёй из этой траншеи засыпается предыдущая траншея с отводками и т.д.

После этого прикопка уплотняется и обильно проливается водой. Вокруг прикопки выкапываются траншея глубиной 30 – 35 см для предотвращения прохода мышей.

Экономическая эффективность выращивания отводков в маточнике

Основными показателями экономической оценки проведения работ и научных исследований в сельском хозяйстве являются прирост продукции, улучшение её качества и цены, получаемый эффект в виде чистого дохода или прибыли, а также уровень рентабельности производства продукции.

При расчёте экономической эффективности необходимы следующие данные: выход продукции с единицы площади (га), затраты на 1 ед. площади (га) маточника тыс. руб., себестоимость 1 тыс. шт. отводков руб., цена реализации в руб., выручка от реализации отводков тыс. руб., прибыль с 1 га, уровень рентабельности, т.е. отношение чистой прибыли к общим затратам на производство продукции, выраженное в процентах. При этом 100% уровень рентабельности означает, что на 1 вложенный рубль затрат производитель получает 1 рубль прибыли.

При выращивании отводков клоновых подвоев учитывают выход отдельно стандартных отводков и «недогона», т.к. цена их реализации будет различна.

При учёте затрат на производство продукции учитывают стоимость всех материальных средств, электроэнергии, воды, а также заработанную плату.

При расчёте себестоимости продукции все затраты делят на количество полученных отводков в расчёте на 1 тыс. шт.

Цена реализации определяется спросом на данную продукцию в конкретном месте реализации и выражается в рублях.

Выручка от реализации рассчитывается при умножении цены реализации на количество реализуемой продукции и выражается в тыс. руб.

Прибыль рассчитывается путём вычитания из выручки от реализации общих затрат на выращивание продукции и выражается в тыс. руб.

Уровень рентабельности высчитывается делением прибыли на общение затраты при выращивании продукции и умножаем на 100%.

Выводы:

1. Мы овладели технологией приготовления питательных сред и выяснили, что полученные растения устойчивы к болезням, так же есть возможность получать генетически однородный посадочный материал с высоким коэффициентом размножения.
2. Выращивание вертикальных отводков в широкорядочных маточниках, посаженных головками кустов позволяет в первый год эксплуатации маточников получать по 5,1 – 5,3 высококачественных стандартных отводков с куста.
3. Использование в качестве субстрата для окучивания смеси «опилки+почва» способствует в первый год эксплуатации отводков, увеличивая зону их корнеобразования.
4. На второй и третий год культивирования маточника применение органических и почвенно-органических субстратов способствует увеличению выхода стандартных отводков соответственно 3 - 5 шт. с куста.
5. Сравнение новой технологии с существующей показывает, что внедрение технологии закладки маточников только головками кустов позволяет в первый год после посадки получить около 10 тыс. шт. отводков с 1 сотки, тогда как маточники заложенных отводками, только приживаются.

Список используемой литературы

1. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе: учеб. пособие / Р.Г. Бутенко. М. : ФБК–ПРЕСС, 1999. 160 с.
2. Верзилин А.В., Верзилина Н.В. Селекция зимостойких слаборослых клоновых подвоев яблони в Мичуринском государственном аграрном университете // Основные итоги и перспективы научных исследований ВНИИС им. Мичурина (1931-2001 гг.): Сб. науч. Трудов, Мичуринск, 2001 – 224-228 с.
3. Верзилин А.В., Верзилина Н.В. Повышение продуктивности маточников клоновых подвоев яблони // Садоводство и виноградство, №4, 2002 – С.
4. Иванов А.А., Верзилин А.В., Скрипников Ю.Г. Лечебно-профилактическое значение яблок (учебное пособие) – Мичуринск: Изд-во МГАУ – 2000 – 17с. Каталог. Плодовые и ягодные культуры Росси – Воронеж: Кварта, 2001, 304 с., цв. Вкл. 52 с.
5. Потапов В.А. Основные результаты селекции и оценки зимостойких слаборослых клоновых подвоев яблони Мичуринской государственной сельскохозяйственной академии // Повышение урожайности плодовых культур/ Сб. науч. Трудов – Мичуринск, 1994 – 4-7 с.
6. Размножение клоновых подвоев яблони в отводковых маточниках: монография / А. В. Верзилин, Н. В. Верзилина, Ю. В. Трунов; Федеральное агентство по образованию, Гос. образовательное учреждение высш. проф. образования "Мичуринский гос. пед. ин-т". - Мичуринск : МГПИ, 2008. - 170 с.

Приложения

Приложение 1. Приготовление питательной среды.

Приложение 2. Высадка регенератов в питательную среду

Приложение 3. Растения в световокй комнате

Приложение 4. Адаптация растений в теплице

Приложение 5. Маточник

Приложение 6. Отделение отводков

Приложение 7. Закладка питомника и работа в нем