Государственное бюджетное учреждение дополнительного образования Воронежской области «Воронежская областная станция юных натуралистов»

Учебно-исследовательская работа
по теме

«Применение технологии микроклонирования петунии гибридной и колеуса гибридного – как способа оздоровления посадочного материала для озеленения»

Выполнила:
Попова Юлия,
учащаяся ГБУДО ВО «ВОСЮН»

Руководитель:
Величкина
Галина Викторовна,
п.д.о. ГБУДО ВО «ВОСЮН»

Воронеж – 2018

Оглавление:

1. Введение _____ 1-11 ст.
2. Методики_____ 11 ст.
3. Выполнение исследования_____ 11-12 ст.
4. Результаты _____ 13-16 ст.
5. Выводы _____ 16 ст.
6. Практическая значимость _____ 16-17 ст.
7. Перспективы _____ 17 ст.
8. Литература _____18 ст.
9. Приложение _____19-23 ст.

1. Введение.

Тема моей работы возникла не случайно. Для моего проекта по ландшафтному дизайну необходимо было достаточно большое количество определенных цветочно-декоративных растений при этом хорошего качества.

Так как, я основную часть растений я стараюсь вырастить самостоятельно, мне пришлось задуматься как в короткие сроки, при минимальной экономической составляющей получить здоровый посадочный материал.

Так как на занятиях Воронежской областной станции юных натуралистов я была знакома с технологией микроклонирования, пришлось более подробно изучить данную возможность.

Чтобы освоить технологию микроклонирования, мне пришлось изучить соответствующую литературу, и освоить краткосрочный курс.

Возникла **проблема**. Как благодаря микроклонированию петунии гибридной и колеуса гибридного, вырастить жизнеспособные, здоровые растения к конкретному сроку, пополнив нужный ассортимент?

Микроклональное размножение растений - это реальная альтернатива среди традиционных методов размножения растений, один из способов вегетативного размножения. Оно позволяет получать взрослые растения из малых частей, т.к. часть стебля, сегмент листа или корня, выращенные в асептическом контейнере с возможностью полного контроля среды [6].

Размножение растений в культурах **«in vitro»** означает способ размножения в искусственных, асептических условиях [1].

Почему микроклонирование? Наверное, понятно, в наш век бурного развития, необходимо использование более прогрессивных методов выращивания растений.

Получаемые растения полностью идентичны растениям - родителям. Выращивание **«in vitro»** производится в лабораторных условиях, но при соблюдении некоторых требований данные эксперименты могут быть успешно осуществлены в домашних условиях.

Материалом для размножения, используются растения свободные от болезней, с которых берут верхушечный побег (меристему).

Меристе́мы (с др.-греч. - «μεριστός» - делимый), или **образовательные ткани**, или **меристематические ткани**, - обобщающее название для **тканей растений,** состоящих из интенсивно делящихся и сохраняющих физиологическую активность на протяжении всей жизни **клеток,** обеспечивающих непрерывное нарастание массы растения и предоставляющих материал для образования различных специализированных тканей (проводящих, механических и т. п.) [3].

Целью работы является изучение особенностей применения технологии микроклонирования петунии гибридной и колеуса гибридного, как современного способа оздоровления посадочного материала для озеленения территории.

Задачи:

1. Изучить методику технологии клонального размножения растений.
2. Провести исследование и выявить наиболее интенсивный состав среды, влияющий на приобретение более выраженных жизнестойких характеристик.
3. Сравнить результаты микроклонирования с натуральным бесполым вегетативным размножением.

Актуальность моей работы состоит в освоении технологии микроклонирования петунии гибридной и колеуса гибридного.

В первые, попытку культивирования растений предприняли немецкие ученые **Хаберлант и Финтер** в 1920 годы [2].

Более успешные результаты по микроклонированию растений получил французский ученый Датье в 1940 годы.

В 1965 году российская ученая Бутенко Раиса Георгеевна микроклонировала гвоздику, картофель и сахарную свеклу [4].

В разных странах сегодня разработаны многочисленные составы питательных сред, изучено значение микро - и макроэлементов для

поддержания нормальной ростовой активности тканей, определено влияние витаминов и стимуляторов роста.

При микроклонировании важную роль играет подбор питательной среды для укоренения определенного вида растений.

Одним из самых известных составов среды является **Среда Мурасиге-Скуга** (***MCO*** или ***MS0*** *(МС-ноль)*) – это питательная среда, используемая в лабораториях для выращивания растительной культуры клеток или цельных растений. Эта среда была придумана физиологами растений **Тошио Мурасиге и Фольке К. Скугом** в 1962 году [7]**.**

В результате многолетних исследований было доказано, что самое сильное влияние на скорость роста культуры оказывал **азот**, поэтому во всех разновидностях сред, азот в процентном соотношении всегда значительно выше от других макро элементов[5].

Пету́ния, или **Петунья** (лат. *Petunia* от фр. *Petun* - табак)

-**род Пету́ния** (лат. *Petunia*) **травянистых** или **полукустарниковых многолетних растений**.

- **семейство Паслёновые** (*Solanaceae*), высотой от 15 см до 2 метров.

Происхождение тропические регионы Южной Америки, главным образом Бразилии, в естественных условиях растёт в Парагвае, Боливии, Аргентине и Уругвае.

Петуния в культуре с XVIII века. Гибриды, появившиеся более ста лет назад, разводятся как однолетние садовые или балконные декоративные растения, применяются обычно для горшечной культуры.

Петуния имеет множество форм – кустовая, ампельная, каскадная. Окраска цветков самая разнообразная – разнообразные оттенки красного, фиолетовая, синяя, голубая, кремовая, желтая и белая. Петунии бывают двухцветные - с яркими полосками, каймой, цветными прожилками.

По форме цветки петунии – воронкообразные, махровые или с бахромой, крупные и мелкие.

По разным данным насчитывается до 70 видов [12]**.**

Стебли прямостоячие или стелющиеся густоветвистые, образующие побеги второго и третьего порядков. Встречаются как низкие (15—30 см), так и высокие (от 60 см до 2 метров) виды. Побеги округлые, зелёные, опушённые простыми и железистыми волосками. **Листья** сидячие, очередные, разной величины, разнохарактерные по форме, опушённые. **Цветки** обычно крупные, часто одиночные, простые или махровые, на коротких цветоножках, отходящих от пазух листьев. Цветок актиноморфный, с двойным **околоцветником,** состоящим из **чашечки** и **венчика.** Чашечка из пяти чашелистиков. Венчик спайнолепестный, воронкообразный, из пяти лепестков, звездчатой или правильной формы. Трубка длинная или короткая, узкая или широкая, сидит свободно на чашечке. **Тычинок** четыре - пять, которые до половины срослись с трубкой. Пыльники парные, удлинённые, тычиночные нити длинные. Завязь верхняя, одногнёздная, семяпочек много. Столбик длинный, тонкий, прямой. Рыльце воронкообразное, бугристое, края ровные. Семена петунии очень мелкие.

Петуния широко используется при озеленении в открытом грунте как однолетнее растение на рабатках, клумбах, в вертикальном озеленении.

Колеус (лат. *Coleus*)

- **род Колеус** (лат. *Coleus*), **травянистых** или **полукустарниковых многолетних растений**.
- **семейство Яснотковые** (*Lamiaceae*), высотой 35-40 см.

Происхождение тропическая Африка, Азия.

Колеус – семейство объединяло ранее около 150 видов полукустарников и трав.

Колеус - это кустистое растение с четырехугольными сочными, почти прозрачными **стеблями** и бархатистыми листьями с окраской, богатой оттенками, и пильчатыми краями. У большинства форм **листья** похожи на крапивные. Главную привлекательность растения составляют листья, пестрые, с разнообразным сочетанием красного, желтого, зеленого,

коричневого цветов, пятен и полос. Цветет колеус, вскидывая **метелку** с мелкими невзрачными цветками.

На солнечном свету окраска колеуса делается еще ярче, но от попадания прямых солнечных лучей его надо оберегать.

Сорта колеусов с яркими (например, красными, белыми и почти белыми) листьями способны переносить прямые солнечные лучи лучше сортов с зеленой окраской листа.

Колеусы очень резко реагируют на отсутствие влаги в почве - листья становятся дряблыми. В случае прохладного содержания (14-16°С или ниже) растения поливают лишь изредка.

Для нормального существования растений в комнатных условиях должна быть высокой, листья колеуса рекомендуется регулярно опрыскивать водой комнатной температуры.

Колеус прекрасно используется для озеленения. Растёт в цветниках открытого грунта, культивируемое как однолетнее. Обычно в регулярных цветниках: клумбах, рабатках, партерных композициях с замысловатым рисунком, составленной из растений с различной окраской листвы. Чёткость рисунка и ровная фактура таких цветников поддерживается при помощи стрижки [11]**.**

Новизна моей работы заключается в исследовании эффективности активных веществ в питательной среде при микроклонировании петунии гибридной и колеуса гибридного.

Научность работы заключается в определенном подборе состава питательной среды, влияющем на получение качественного оздоровленного посадочного материала для озеленения территории, при условии полной стерильности на начальных стадиях развития.

На ряду, с макро - и микро элементами, витаминами, в состав питательной среды вводят регуляторы роста, которые ускоряют и усиливают рост черенков, увеличивают корневую систему и период цветения, при этом

растения получают максимум полезных веществ, а также повышают сопротивляемость к широкому спектру заболеваний и к вредителям.

Химические стимуляторы - химические вещества, которые используют для повышения вероятности укоренения черенков, для ускорения роста корней, что особенно важно при размножении растений.

Самые распространенные стимуляторы роста и применяемые в работе это:

- **Гетероауксин** (индолил-3-уксусная кислота) – вещество класса ауксинов, которое образуется в тканях растения и способствует его ростовым процессам, увеличивая физиологическую активность. Это вещество является органическим стимулятором роста растений, а также процесса корнеобразования для различных растений Гетероауксин применяется в качестве укоренителя. Даже небольшое количество препарата улучшит развитие здоровой корневой системы и ускорит рост наземных частей растения. Благодаря применению гетероауксина цветочные культуры будут пышно цвести, а плодово-ягодные и овощи дадут хороший урожай.
- **Циркон** - гидроксикоричные кислоты, кроме стимулирования роста корней, повышают устойчивость к грибковым заболеваниям, используют для защиты растений и в качестве регулятора процесса образования корней, роста, цветения и плодоношения, а также для повышения устойчивости к болезнетворным бактериям и вирусам. Его ценность в модулировании защитных свойств культур и усилении действия попавших в корневую систему полезных веществ. Рекомендовано его использование при первых признаках патогенной флоры, целью противостояния мучнистой росе, фитофторозу, бактериозу, гнили, фузариозу, парше, монилиозу, переноспорозу и другим болезнетворным микробам. В качестве удобрения «Циркон» эффективен перед посадкой семян в грунт, поскольку стимулирует развитие и проклевывание ростка на неделю раньше обычного срока и улучшает дружность всходов. Более того, препарат помогает растениям без потерь приспособиться к резким перепадам температурного режима, смене

химического состава почвы при пересадке, укоренению черенков. В результате все компоненты препарата в комплексе на клеточном уровне оказывают антивирусное, противомикробное, антиоксидантное и антитоксическое воздействие на культуры [10].

Большую роль в оздоровлении растений играют другие активные вещества:

1. **Биостим Универсал** – биостимулятор - антистрессант, для активации жизненной энергии в экстремальных климатических условиях (органо-минеральные удобрения на основе аминокислот растительного происхождения, ускоряют выход растений из стрессовых ситуациях, увеличивают устойчивость к неблагоприятных условиях, повышают устойчивость к болезням).

Особое применение: для регенерации листового аппарата растений и активации ростовых процессов.

Обеспечивает быстрое и сбалансированное питание растений. Повышенное содержание свободных аминокислот, которые являются исходным материалом для биосинтеза белков и ферментных систем растений, способствует улучшению процессов роста побегов, цветения.

2. **Стимпо –** биостимулятор, созданий путем биотехнологического выращивания на корневой системе женьшеня гриба-эпифита. Биостимулятор состоит из композиции свободных жирных кислот, фитогормонов, витаминов, аминокислот, хитозана, олигосахаридов, биогенных микроэлеиентов (K2O, Na, Fe, Zn, Mn, Cu, Mg, Ca, Co, K) и биозащитного комплекса.

2. АБИГА-ПИК – универсальное средство от грибковых и бактериальных болезней (фунгицид – хлорокись меди, эффективен при широком спектре заболеваний, не фитотоксичен). Это способствует подавлению роста белков спор патогенов, атакующих растение. Препарат предназначен для устранения целого комплекса болезней: фитофтороз;

цитоспороз; мучнистая роса; бурая, черная и белая пятнистость; бактериоз; парша; монилиоз; фузариоз; садовая ржавчина.

Немаловажный интерес вызывает применение **натуральных народных стимуляторов образования корней.** Самым доступным средством является **дрожжевой раствор** богат витамином В и фитонутриентами, необходимыми для роста корней [9].

Технология микроклонирования интересна в плане научных подходов и имеет ряд преимуществ:

- возможность получить точную копию, идентичную исходному материалу в генетическом коде;
- высокие коэффициенты размножения;
- экономия на семенах и рассаде;
- небольшое количество исходного растительного материала;
-ускорение процесса выращивания, чем при выращивании из семян, рассады или традиционного вегетативного размножения;
- получение более здорового и устойчивого к болезням и неблагоприятным условиям растений, то есть принцип оздоровления растений;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами [4].

Оборудование и вещества необходимое для выращивания культуры «in vitro»:

1. Стерильное помещение (лаборатория).
2. Ламинар - бокс. (На станции юннатов использовала аквариум 80/60/40 см.).
2.Сухожарочный шкаф для стерилизации посуды, инструмента.
3. Шейкер.
4. Автоклав.
5.Стеклянные контейнеры (банки).
6.Скальпели, пинцеты.
7. Офисная бумага формата А 4.
8. Спиртовка.

9. Аэрозоль, содержащий 95.6 % спирта для обработки поверхностей и рук.
10. Хлоросодержащее дезинфицирующее средство для обработки растений (гипохлорид кальция 5%).
11. Жидкое мыло (с нейтральной средой).
12. Дистиллированная вода.
13.Питательная среда для растений [8].

Мною исследования проводились в лабораторных условиях ОАО Питомнический комплекс Воронежской области и ГБУДО ВО «Воронежская областная станция юных натуралистов», где условия более, приближенные к домашним.

2. Методики.

Принцип технологии - создание ткани не дифференцированных клеток из взрослого растения, то есть клеток в состоянии схожем с тем, в котором клетки находятся в зародыше растения. Далее, в стерильных условиях стимуляция полученной ткани на рост позволяет получить микроростки, которые в дальнейшем могут быть разделены на микрочеренки и высажены для дальнейшего роста и укоренения [8].

При микроклонировании я выбрала петунию гибридную или петунию садовую:

Петуния махровая Водопад F1– фиолетовый цветок, высота растения 20-25 см., диаметр цветка – 7 - 9 см.,

и **Колеус гибридный Блюне Нефрит F1 – светло-зеленного цвета с беловато-желтыми прожилками.**

Методику по микроклонированию я использовала **Катаевой Н. В., Бутенко Р. Г.**

Методику по приготовлению питательной среды я подбирала на основе Методики физиологов растений **Тошио Мурасиге и Фольке К. Скугом** [7]**.**

Методику по вегетативному размножению я использовала, **Поповой Л.Я.**, кандидата биологических наук.

3.Выполнение исследования.

1) Изучение литературы по проблеме микроклонального размножения растений.

2) Исследование по размножению цветочно-декоративных растений проводилось с **4 мая 2018 года** по **5 июля 2018 года** по следующей схеме:

1. **Отбор маточного растения** (петуния гибридная, колеус гибридный), не имеющего признаков заражения.

2. **Стерилизация инструментов и оборудования**.

Инструменты стерилизуются в фольге в сухожарочном шкафу в течение 1.5 часа. Остужать можно в этиловом спирте. Оборудование путем обработки 96.5 % этиловым спиртом. Стеклянные контейнеры (банки) заполненные питательной смесью и закрытые фольгой стерилизуются 1.5 часа. в автоклаве.

3.**Ведение растений в культуру эксплант**.

3.1. Освобождение от инфекций (бактерии, грибы) путем стерилизации в мыльном растворе (моющее средство с нейтральной средой) - 1 час, путем взбалтывания на шейкере.

3.2. Промывание стерильной дистиллированной водой 3 раза.

3.3. Промывание с хлорсодержащим веществом (гипохлорид кальция 5%).) путем взбалтывания на шейкере в течение 20 минут.

3.4. Погружение эксплантa в питательную среду.

4. Культивирование при незначительном освещении (500 люмий на м2, и повышенной влажности до 96%, температуре +25-28 С)

5. Получение растений - **регенеранты**.

6. **Разбивка регенерантов на микрочеренки** (клоны), с возможным максимальным коэффициентом размножения.

7. **Пассаж микрочеренков** (клонов на питательную среду) с последующим культивированием растений и разбивкой на клоны.

8. **Перенос растений в почву.** Повышение освещенности (до 1000 люмий на м2) и понижение влажности до 70%, температура не ниже + 21 С.

4. Результаты.

Дата исследования с 4 мая по 5 июля 2018 года.

1 кратность.

Выход петунии гибридной махровая Водопад F1

Черенки	**Петуния махровая Водопад F1** эксплант **(4.05.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***регенерант*** **(26.05.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***перенос в почву*** **(26.05.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***выход (цветение)*** **(05.07.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***вегетативное черенкование***	
					расчеренковано **(26.05.18 г.)**	***выход*** **(05.07.18 г.)**
Биостим Универсал	**5**	**22**	**21**	**20**	**5**	**2**
Циркон	**5**	**20**	**20**	**19**	**5**	**2**
АБИГА-ПИК	**5**	**25**	**25**	**24**	**5**	**4**
Стимпо	**5**	**27**	**27**	**27**	**5**	**3**
Дрожжи	**5**	**16**	**16**	**11**	**5**	**2**
Контроль (без дополнительных веществ)	**5**	**14**	**13**	**10**	**5**	**1**

2 кратность.

Выход петунии гибридной махровая Водопад F1

Черенки	**Петуния махровая Водопад F1** эксплант **(4.05.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***регенерант*** **(26.05.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***перенос в почву*** **(26.05.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***выход*** **(*цветение*) (05.07.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***вегетативное черенкование***	
					расчеренковано **(26.05.18 г.)**	***выход*** **(05.07.18 г.)**
Биостим Универсал	**5**	**23**	**23**	**22**	**5**	**1**

Циркон	**5**	**22**	**22**	**20**	**5**	**2**
АБИГА-ПИК	**5**	**27**	**27**	**25**	**5**	**3**
Стимпо	**5**	**28**	**28**	**27**	**5**	**2**
Дрожжи	**5**	**18**	**18**	**16**	**5**	**2**
Контроль (без дополнительных веществв)	**5**	**12**	**10**	**10**	**5**	**1**

3 кратность.

Выход петунии гибридной махровая Водопад F1

Черенки	**Петуния махровая Водопад F1** эксплант **(4.05.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***регенерант*** **(26.05.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***перенос в почву*** **(26.05.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***выход (цветение)*** **(05.07.18 г.)**	**Петуния махровая Водопад F1** ***вегетативное черенкование***	
					расчеренковано **(26.05.18 г.)**	***выход*** **(05.07.18 г.)**
Биостим Универсал	**5**	**22**	**22**	**22**	**5**	**1**
Циркон	**5**	**18**	**18**	**18**	**5**	**1**
АБИГА-ПИК		**27**	**26**	**26**	**5**	**2**
Стимпо	**5**	**27**	**27**	**26**	**5**	**3**
Дрожжи	**5**	**17**	**17**	**17**	**5**	**0**
Контроль (без дополнительных веществв)	**5**	**14**	**13**	**13**	**5**	**0**

Дата исследования с 7 мая по 25 июня 2018 года.

1 кратность.

Выход качественного посадочного материала колеуса гибридного Блюне Нефрит F1

Черенки	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1** эксплант	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1** ***регенерант***	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1** ***перенос в***	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1** ***выход***	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1** ***вегетативное черенкование***

	(7.05.18 г.)	(28.05.18 г.)	*почву* (28.05.18 г.)	*(высокая декоративность)* (25.06.18 г.)	*расчеренковано* (28.05.18 г.)	*выход* (25.06.18 г.)
Биостим Универсал	**5**	**19**	**19**	**19**	**5**	**5**
Циркон	**5**	**16**	**16**	**16**	**5**	**5**
АБИГА-ПИК	**5**	**27**	**26**	**26**	**5**	**5**
Стимпо	**5**	**27**	**26**	**26**	**5**	**4**
Дрожжи	**5**	**17**	**17**	**17**	**5**	**4**
Контроль (без дополнительных веществв)	**5**	**14**	**13**	**13**	**5**	**4**

2 кратность.

Выход качественного посадочного материала колеуса гибридного Блюне Нефрит F1

Черенки	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1 эксплант** (4.05.18 г.)	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1** *регенерант* (26.05.18 г.)	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1** *перенос в почву* (26.05.18 г.)	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1** *выход (цветение)* (05.07.18 г.)	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1** *вегетативное черенкование*	
					расчеренковано (26.05.18 г.)	*выход* (05.07.18 г.)
Биостим Универсал	**5**	**22**	**22**	**22**	**5**	**4**
Циркон	**5**	**18**	**18**	**18**	**5**	**5**
АБИГА-ПИК		**27**	**26**	**26**	**5**	**5**
Стимпо	**5**	**28**	**28**	**28**	**5**	**4**
Дрожжи	**5**	**17**	**17**	**17**	**5**	**4**
Контроль (без дополнительных веществв)	**5**	**14**	**13**	**13**	**5**	**4**

3 кратность.

Выход качественного посадочного материала

колеуса гибридного Блюне Нефрит F1

черенки	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1 эксплант (4.05.18 г.)**	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1 *регенерант* (26.05.18 г.)**	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1 *перенос в почву* (26.05.18 г.)**	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1 *выход (цветение)* (05.07.18 г.)**	**Колеус Гибридный Бдюне Нефрит F1 *вегетативное черенкование***	
					***расчеренковано* (26.05.18 г.)**	***выход* (05.07.18 г.)**
Биостим Универсал	**5**	**22**	**22**	**22**	**5**	**4**
Циркон	**5**	**18**	**18**	**18**	**5**	**4**
АБИГА-ПИК		**27**	**26**	**26**	**5**	**5**
Стимпо	**5**	**29**	**29**	**28**	**5**	**4**
Дрожжи	**5**	**17**	**17**	**17**	**5**	**4**
Контроль (без дополнительных веществв)	**5**	**14**	**13**	**13**	**5**	**4**

5. Выводы.

Мною была изучена методика Катаевой Н. В., Бутенко Р. Г. технологии клонального размножения растений.

При проведении исследования я выявила наиболее интенсивный состав среды, влияющий на приобретение более выраженных жизнестойких характеристик исследуемых растений. Наиболее интенсивной средой оказалась среда с дополнительным введением в ее состав Стимпо и АБИГА-ПИК, с преобладанием биостимулятора Стимпо.

При этом фунгицид АБИГА-ПИК способствовал более длительному периоду нахождения растений без признаков болезненного поражения, что способствовало хорошему корнеобразованию, нарастанию зеленной массы и дальнейшему множественному образованию отростков колеуса гибридного и петунии гибридной, а так же ее цветению.

В сравнении с результатами микроклонирования петунии гибридной и колеуса гибридного с натуральным бесполым вегетативным размножением этих растений, первый способ имеет ряд преимуществ, во первых количество растений от одного растения значительно большой имеет выход (с первым и вторым видом растений), во вторых визуально хорошо развиты, в третьих устойчивы к болезням во всех трех первых применяемых питательных средах, имеющих дополнительное введение веществ.

6. Практическая значимость исследования - использование микроклонирования, как прогрессивного вегетативного размножения петунии гибридной и колеуса гибридного дающего возможность в короткий срок получить большое количество оздоровленного растения, в том числе и в домашних условиях, что доступно широким слоям населения, родственникам, одноклассникам. Для распространения данной технологии мною были составлении Методические рекомендации от Юлии Поповой.

Данные методические рекомендации могут быть полезны садоводам любителям и школьникам, имеющим трудовые объединения, которые занимаются озеленением пришкольных территорий.

7. Перспективы. В ноябре этого года я планирую провести клонирование сортовых роз и их доращивание в условиях отапливаемой теплицы ГБУДОВО «Воронежская областная станция юных натуралистов».

Литература.

1. Дименко В. И., Шестибратов К. А., Лебедев В. Г. Укоренение – ключевой этап размножения растений IN VITRO (Кафедра плодоводства) журнал Известия ТСХА, выпуск 1, 2010 год.

2. Алабина О.Н. Обоснование способов подготовки маточных растений ягодных кустарников к вегетативному размножению: /О.Н. Аладина/ Дис. докт. с.-х. наук: 00.01.07. М., 2004.

3. Катаева Н.В. Особенности микроразмножения трудноукореняемых сортов яблони /Н.В.Катаева // Сельскохозяйственная биология. М., 1986. Вып. С. 18-22.

4. Орлов П.Н. Роль перивискулярных волокон в образовании придаточных корней у зеленых черенков садовых растений // Плодоводство ТСХА, 1985. Вып. 6. С. 102-108.

5. Бутенко Р.Г. Биология культивируемых клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе, Монография. - Москва, ФБК - Пресс, 1999. - 159 с.

6. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. - М., 1983.

7. Бутенко Р. Г Культура клеток растений. / - М., 1986.

8. Жужжалова Т.П., Знаменская В.В., Ошевнев В.П., Грибанова Н.П., Колесникова Е.О., Васильченко Е.Н., Черкасова Н.Н. Инновационный приём микроклонирования in vitro сахарной свёклы в селекционном процессе // Сахарная свёкла. No4. 2017. С.12- 18.

9. Н.Н. Замятина «Методы применения биологических стимуляторов», Москва, 2009 г.

10. К. Грайнер, А. Вебер «Цветы, декоративные кустарники и деревья в нашем саду» Москва 1998 г.

11. Л.К.Мешалкина «Мой сад», Красноярск 1984 г.

12.Попова Л.Я. Петуния гибридная и её культура // Интродукция и приёмы культуры цветочно-декоративных растений. - М.: Наука, 1997. -168 с.

Приложение 1

Среда Мурасиге-Скуга (*MCO* или *MS0 (MC-ноль)*)

Среда Мурасиге-Скуга (***MCO*** или ***MS0*** *(MC-ноль)*) — это питательная среда, используемая в лабораториях для выращивания растительной культуры клеток или цельных растений. Эта среда была придумана физиологами растений Тошио Мурасиге и Фольке К. Скугом[en] в 1962 году, во время поисков Мурасиге нового фитогормона. Число после букв MC обозначает концентрацию сахарозы в среде. Например, MS0 не содержит сахарозы, а MS20 содержит сахарозу в концентрации 20 г/л . Вместе с её модификациями — это наиболее часто используемая в лабораторной практике среда для экспериментов на культуре растительных клеток[1].

В свою бытность докторантом Скуга, Мурасиге изначально пытался найти ещё не открытый гормон роста, присутствующий в соке растений табака. Такое вещество так и не было обнаружено; вместо этого, анализ табачной выжимки и пепла сожжённого табака выявил повышенные концентрации определенных минеральных веществ в растительных тканях. Серия экспериментов показала, что варьируя уровни этих питательных веществ можно добиться существенно ускорения роста по сравнению с существовавшими составами. Было установлено, что самое сильное влияние на скорость роста культуры тканей табака оказывал азот.

Материалом для размножения, используются растения свободные от болезней, зачастую с помощью термотерапии В первом этапе растения содержаться 3-4 недели, создаются несколько дополнительных побегов.
Состав Мурашига и Кога таков: (в мг/л)

Основные соли (макроэлементы)

- Нитрат аммония (NH_4NO_3) **1650 мг/л**
- Хлорид кальция ($CaCl_2 \cdot 2H2O$) **440 мг/л**
- Сульфат магния ($MgSO_4 \cdot 7H2O$) **370 мг/л**
- Гидрофосфат калия (KH_2PO_4) **170 мг/л**
- Нитрат калия (KNO_3) **1900 мг/л**

Минорные соли (микроэлементы)

- Борная кислота (H_3BO_3) **6,2 мг/л**
- Хлорид кобальта ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) **0,025 мг/л**
- Сульфат меди(II) ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) **0,025 мг/л**
- Сульфат железа(II) ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) **27,8 мг/л**
- Сульфат марганца(II) ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$) **22,3 мг/л**
- Йодид калия (KI) **0.83 мг/л**
- Молибдат натрия ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) **0,25 мг/л**
- Сульфат цинка ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) **8,6 мг/л**
- Натрий железная соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (NaFe-ЭДТА) в концентрации **5 мл/л** для стокового раствора, содержащего **5,57 г** $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ и **7,45 г** Na_2-ЭДТА на литр воды.

Витамины и органические вещества

- Мио-Инозитол **100 мг/л**
- Никотиновая кислота **0,5 мг/л**
- Пиридоксин · HCL **0,5 мг/л**
- Тиамин · HCL **0,1 мг/л**
- Глицин **2 мг/л**

Гидролизат лактальбумина (опционально) **1 г/л ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ:** гидролизат лактальбумина для приготовления микробиологических питательных среды

- Гетероауксин **1-30 мг/л** Гетероауксин, в малых концентрациях стимулирующий рост растений, в больших оказывается его ингибитором
- Кинетин (цитокин) **0,04-10 мг/л**

Приложение 2

Методические рекомендации по микроклональному размножению цветочно-декоративных растений от Юлии Поповой

- **Микроклональное размножение растений** - это реальная альтернатива среди традиционных методов размножения растений, один из способов вегетативного размножения. Оно позволяет получать взрослые растения из малых частей, т.к. часть стебля, сегмент листа или корня, выращенные в асептическом контейнере с возможностью полного контроля среды.
- Размножение растений в культурах **«in vitro»** означает способ размножения в искусственных, асептических условиях.
- Получаемые растения полностью идентичны растениям - родителям. Выращивание **«in vitro»** производится в лабораторных условиях, но при соблюдении некоторых требований данные эксперименты могут быть успешно осуществлены в домашних условиях.
- Материалом для размножения, используются растения свободные от болезней, с которых берут верхушечный побег (меристему).
- **Меристе́мы** (с др.-греч. - «μεριστός» - делимый), или **образовательные ткани**, или **меристематические ткани**, - обобщающее название для **тканей растений,** состоящих из интенсивно делящихся и сохраняющих физиологическую активность на протяжении всей жизни **клеток,** обеспечивающих непрерывное нарастание массы растения и предоставляющих материал для образования различных специализированных тканей (проводящих, механических и т. п.).

Химические стимуляторы - химические вещества, которые используют для повышения вероятности укоренения черенков, для ускорения роста корней, что особенно важно при размножении растений.

Самые распространенные стимуляторы роста и применяемые в работе это:

- **Гетероауксин** (индолил-3-уксусная кислота) – вещество класса ауксинов, которое образуется в тканях растения и способствует его ростовым процессам, увеличивая физиологическую активность. Это вещество является органическим стимулятором роста растений, а также процесса корнеобразования для различных растений Гетероауксин применяется в качестве укоренителя. Даже небольшое количество препарата улучшит развитие здоровой корневой системы и ускорит рост наземных частей растения. Благодаря применению гетероауксина цветочные культуры будут пышно цвести, а плодово-ягодные и овощи дадут хороший урожай.
- **Циркон** - гидроксикоричные кислоты, кроме стимулирования роста корней, повышают устойчивость к грибковым заболеваниям, используют для защиты растений и в качестве регулятора процесса образования корней, роста, цветения и плодоношения, а также для повышения устойчивости к болезнетворным бактериям и вирусам. Его ценность в модулировании защитных свойств культур и усилении действия попавших в корневую систему полезных веществ. Рекомендовано его использование при первых признаках патогенной флоры, целью противостояния мучнистой росе, фитофторозу, бактериозу, гнили, фузариозу, парше, монилиозу, переноспорозу и другим болезнетворным микробам. В качестве удобрения «Циркон» эффективен перед посадкой семян в грунт, поскольку стимулирует развитие и проклевывание ростка на неделю раньше обычного срока и улучшает дружность всходов. Более того, препарат помогает растениям без потерь приспособиться к резким перепадам температурного режима, смене химического состава почвы при пересадке, укоренению черенков. В результате все компоненты препарата в

комплексе на клеточном уровне оказывают антивирусное, противомикробное, антиоксидантное и антитоксическое воздействие на культуры.

Большую роль в оздоровлении растений играют другие активные вещества:

3. **Биостим Универсал** – биостимулятор - антистрессант, для активации жизненной энергии в экстремальных климатических условиях (органо-минеральные удобрения на основе аминокислот растительного происхождения, ускоряют выход растений из стрессовых ситуациях, увеличивают устойчивость к неблагоприятных условиях, повышают устойчивость к болезням).

Особое применение: для регенерации листового аппарата растений и активации ростовых процессов.

Обеспечивает быстрое и сбалансированное питание растений. Повышенное содержание свободных аминокислот, которые являются исходным материалом для биосинтеза белков и ферментных систем растений, способствует улучшению процессов роста побегов, цветения.

2. АБИГА-ПИК – универсальное средство от грибковых и бактериальных болезней (фунгицид – хлорокись меди, эффективен при широком спектре заболеваний, не фитотоксичен). Это способствует подавлению роста белков спор патогенов, атакующих растение. Препарат предназначен для устранения целого комплекса болезней: фитофтороз; цитоспороз; мучнистая роса; бурая, черная и белая пятнистость; бактериоз; парша; монилиоз; фузариоз; садовая ржавчина.

Немаловажный интерес вызывает применение **натуральных народных стимуляторов образования корней.** Самым доступным средством является **дрожжевой раствор** богат витамином В и фитонутриентами, необходимыми для роста корней.

Технология микроклонирования интересна в плане научных подходов и имеет ряд преимуществ:

- возможность получить точную копию, идентичную исходному материалу в генетическом коде;
- высокие коэффициенты размножения;
- экономия на семенах и рассаде;
- небольшое количество исходного растительного материала;
-ускорение процесса выращивания, чем при выращивании из семян, рассады или традиционного вегетативного размножения;
- получение более здорового и устойчивого к болезням и неблагоприятным условиям растений, то есть принцип оздоровления растений;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами.

Оборудование и вещества необходимое для выращивания культуры «in vitro»:

1. Стерильное помещение (лаборатория).
2. Ламинар - бокс. (На станции юннатов использовала аквариум 80/60/40 см.).
2.Сухожарочный шкаф для стерилизации посуды, инструмента.
3. Шейкер.
4. Автоклав.
5.Стеклянные контейнеры (банки).
6.Скальпели, пинцеты.
7. Офисная бумага формата А 4.
8. Спиртовка.
9. Аэрозоль, содержащий 95.6 % спирта для обработки поверхностей и рук.
10. Хлоросодержащее дезинфицирующее средство для обработки растений (гипохлорид кальция 5%).
11. Жидкое мыло (с нейтральной средой).
12. Дистиллированная вода.
13.Питательная среда для растений.

Методику по микроклонированию можно использовать **Катаевой Н. В., Бутенко Р. Г.**

Выполнение исследования.

1) Изучение литературы по проблеме микроклонального размножения растений.

2) Исследование по размножению цветочно-декоративных растений проводилось с **4 мая 2018 года** по **5 июля 2018 года** по следующей схеме:

1. **Отбор маточного растения** (петуния гибридная, колеус гибридный), не имеющего признаков заражения.

2. **Стерилизация инструментов и оборудования**.

Инструменты стерилизуются в фольге в сухожарочном шкафу в течение 1.5 часа. Остужать можно в этиловом спирте. Оборудование путем обработки 96.5 % этиловым спиртом. Стеклянные контейнеры (банки) заполненные питательной смесью и закрытые фольгой стерилизуются 1.5 часа. в автоклаве.

3.**Ведение растений в культуру эксплант**.

3.1. Освобождение от инфекций (бактерии, грибы) путем стерилизации в мыльном растворе (моющее средство с нейтральной средой) - 1 час, путем взбалтывания на шейкере.

3.2. Промывание стерильной дистиллированной водой 3 раза.

3.3. Промывание с хлорсодержащим веществом (гипохлорид кальция 5%).) путем взбалтывания на шейкере в течение 20 минут.

3.4. Погружение эксплантa в питательную среду.

4. Культивирование при незначительном освещении (500 люмий на м2, и повышенной влажности до 96%, температуре +25-28 С)

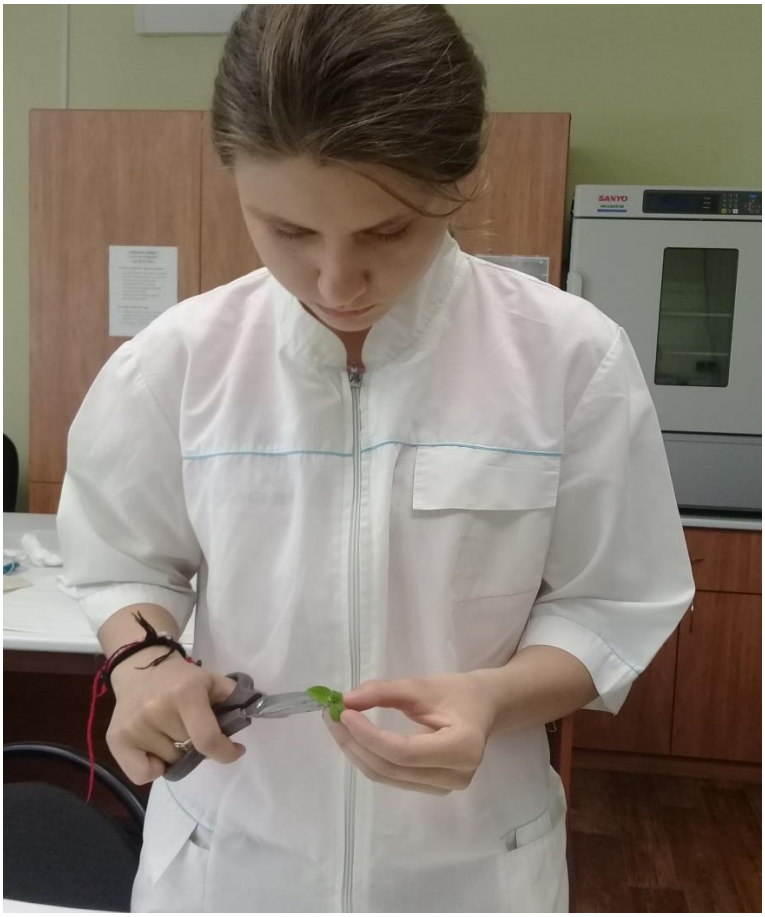
5. Получение растений - **регенеранты**.

6. Разбивка регенерантов на микрочеренки (клоны), с возможным максимальным коэффициентом размножения.

7. Пассаж микрочеренков (клонов на питательную среду) с последующим культивированием растений и разбивкой на клоны.

8. Перенос растений в почву. Повышение освещенности (до 1000 люмий на м2) и понижение влажности до 70%, температура не ниже + 21 С.

Приложение 3

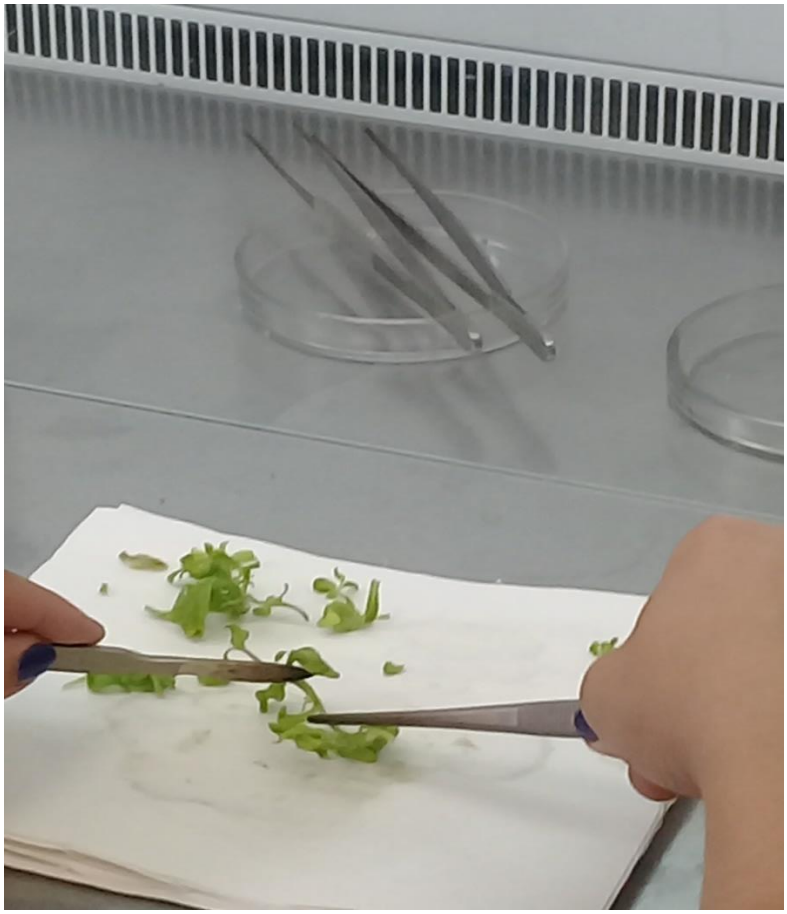


Подготовка эксплантов

Питательная среда готова к стерилизации

Установка емкостей на шейкер

Промывка эксплантa дистилированной водой



Работа в ламинар-боксе