МБОУ Некрасовская СОШ

Региональная конференция по научно-техническому творчеству школьников «Лабиринты науки»

Секция: биотехнологии

ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ КАРТОФЕЛЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЙ

Автор: Молева Елизавета Анатольевна
Ученица 10 класса МБОУ Некрасовской СОШ

Научный руководитель:
заведующий оранжереей
ЯрГУ им. П.Г. Демидова
Сидоров Андрей Владимирович

Руководитель:
учитель МБОУ Некрасовской СОШ
Аминова Наталья Борисовна

рп. Некрасовское, 2021 г.

Оглавление

1. Введение 2

2. Обзор литературы……3

2.1. Картофель как важнейшая сельскохозяйственная культура 3

2.2. Биотехнологический подход при размножении картофеля……3

2.3. Бактерии – источник активных соединений для регуляции роста и развития растений ……..……...4

3. Объект и методы исследования 5

3.1. Микроклональное размножение картофеля с использованием метаболитов штамма *Pseudomonas* GRP225……..……..5

3.2. Оценка влияния бактериальных метаболитов на микроклональное размножение картофеля ……..……..6

4. Результаты и обсуждение 6

4.1. Влияние метаболитов исследуемого штамма на эффективность микроклонального размножения картофеля……..……..6

Заключение.……9

Список литературы 9

Приложение……..10

1. Введение

Картофель является одной из важнейших сельскохозяйственных культур в мире [1]. Богатые ценными питательными веществами клубни картофеля имеют огромное пищевое и кормовое значение, служат сырьем для производства спирта, крахмала, глюкозы, каучука, активно используемым в пищевой, фармацевтической, текстильной, бумажной промышленности [2].

Традиционно размножение картофеля осуществляется вегетативным способом путем высадки в грунт семенного материала – клубней или их частей. При этом большинство поражающих его болезней передается через семенные клубни, которые являются первичным источником инфекции для последующего заражения посадок. Кроме того, при таком подходе отмечается невысокий коэффициент размножения, большие площади под посадки, большие трудовые и временные затраты.

Наиболее перспективным при размножении и культивировании картофеля является современный биотехнологический подход. Он позволяет круглогодично за относительно короткий срок получить большой объем генетически однородного свободного от болезней посадочного материала [5]. Однако биотехнологическое культивирование картофеля представляет собой довольно сложный наукоемкий многостадийный процесс, требующий глубокого всестороннего изучения и оптимизации. Большой интерес в качестве альтернативы химическим регуляторам роста, применяемых при биотехнологическом культивировании, представляют метаболиты ассоциативных бактерий. Продуцируя и накапливая в культуральной жидкости фитогормоны, бактерии данной группы способны регулировать корнеобразование, процессы роста и развития, устойчивость растений.

Особый интерес на сегодняшний день имеет изучение возможности модификации стандартных методик микроклонального размножения картофеля с помощью использования метаболитов ростостимулирующих бактерий.

Цель работы – разработать систему микроклонального размножения картофеля с использованием метаболитов ростостимулирующих бактерий.

Задачи:

1. Провести микроклональное размножение картофеля с использованием среды, содержащей метаболиты ростостимулирующего бактериального штамма *Pseudomonas* GRP225.

2. Оценить влияние метаболитов исследуемого штамма в составе питательной среды на эффективность микроклонального размножения картофеля, ростовые параметры и развитие растений.

2. Обзор литературы

2.1. Картофель как важнейшая сельскохозяйственная культура

Картофель – одна из важнейших сельскохозяйственных культур в мире [1]. Его выращивание, переработка и потребление получили большое распространение, поскольку картофель является ценной продовольственной, кормовой и технической культурой.

Объем производства картофеля в мире на протяжении последнего десятилетия рос в среднем на 4,5 процента в год, и опережал темпы роста многих других основных продовольственных товаров. Во всех зонах картофелеводства широко распространены вирусные болезни. Ежегодно от вирусных болезней мировое картофелеводство в среднем теряет 15-20% урожая. Накопление вирусной инфекции в семенном материале является важнейшей причиной ухудшения развития растений, снижения урожайности, пищевой ценности, качества и технологических свойств клубней [3]. Решить данную проблему возможно лишь путем нового биотехнологического подхода к размножению и выращиванию картофеля.

2.2. Биотехнологический подход при размножении картофеля

Производство посадочного материала – один из важнейших этапов выращивания сельскохозяйственной продукции [6]. Одним из новых

биотехнологических способов размножения растений стало микроклональное размножение [4]. Микроклональное размножение – массовое бесполое размножение растений в культуре тканей и клеток, при котором возникающие формы растений генетически идентичны исходному экземпляру [6, 8].

Основным преимуществом микроклонального размножения является освобождение растений от вирусов, возможность клонировать трудно размножаемые растения, высокий коэффициент размножения, возможность проводить работы круглогодично и др. [4]. Однако несмотря на ряд преимуществ, биотехнологическое культивирование является сложным многоступенчатым процессом, на который влияют разнообразные факторы: свойства самого растения, состав питательной среды, освещение, температура.

2.3. Бактерии – источник активных соединений для регуляции роста и развития растений

Инокуляция сельскохозяйственных растений активными штаммами ростостимулирующих бактерий не только повышает их урожай, но и улучшает качество растительной продукции [5]. Ростостимулирующие бактерии снабжают растения дополнительно минеральными и органическими питательными веществами, фитогормонами, доступным азотом, участвуют в конкурентном биорегулировании микробных ассоциаций в почве, а также индуцируют системную устойчивость растения к абиотическим и биотическим факторам внешней среды.

Ростостимулирующие бактерии повышают темпы роста и продуктивность микрорастений картофеля [7]. Обработанные бактериями и их метаболитами растения отличаются ускоренным ростом, лучшим укоренением, хорошей адаптацией к условиям *ex vitro* и повышенной устойчивостью к бактериальным и грибным фитопатогенам.

Использование метаболитов ростостимулирующих бактерий является новым и перспективным подходом при микроклональном размножении картофеля [6].

3. Объект и методы исследования

Штамм ростостимулирующей бактерии *Pseudomonas* GRP225 был выделен на кафедре ботаники и микробиологии ЯрГУ им. П.Г. Демидова из ризосферы растений, произрастающих в почвенно-климатических условиях Ярославской области. Штамм обладает способностью к синтезу ауксинов – важнейших регуляторов роста растений, проявляет антагонистическую активность в отношении фитопатогенных микроорганизмов. Стерильная культура картофеля для проведения исследования предоставлена Сибирским институтом физиологии и биохимии растений (СИФИБР СО РАН).

3.1. Микроклональное размножение картофеля с использованием метаболитов штамма *Pseudomonas* GRP225

Приготовление питательных сред проводили согласно методическим рекомендациям (приложение 1). Для изучения влияния метаболитов исследуемого штамма на эффективность размножения, рост и развитие картофеля в культуре *in vitro* готовили стандартную среду Мурасиге-Скуга. К опытным образцам в питательную среду через мембранный фильтр Millipore с диаметром пор 22 нм вносили культуральную жидкость (КЖ) штамма бактерий в количестве 10% от общего объема среды. В качестве контроля использовали аналогичную среду с добавлением индолилуксусной кислоты (ИУК) в концентрации 10^{-6}М и питательную среду без гормонов и метаболитов бактерий.

Микроклональное размножение проводили с использованием стерильной культуры в соответствии с методическими рекомендациями (приложение 2). Посевы во всех вариантах опыта культивируют в течение 2-х

месяцев в климатической камере (интенсивность освещения – 2000 лк, фотопериод – 16 ч).

3.2. Оценка влияния бактериальных метаболитов на микроклональное размножение картофеля

С периодичностью в 2 недели отмечали и описывали особенности роста и развития растений в разных вариантах опыта. По окончании опыта отмечали количество выживших растений. Для растений всех вариантов опыта определяли линейные размеры и сырую массу.

4. Результаты и обсуждение

4.1. Влияние метаболитов исследуемого штамма на эффективность микроклонального размножения картофеля

Результаты исследований по влиянию метаболитов исследуемого штамма на эффективность микроклонального размножения картофеля представлены в табл. 1.

Таблица 1

Влияние метаболитов штамма *Pseudomonas* GRP225 на ростовые параметры и величину коэффициента размножения картофеля в культуре *in vitro*

Параметр	Вариант опыта		
	Опыт	ИУК	Среда М-С (контроль)
Высота растений, см	9,7±0,59	7,3±0,56	4,7±0,22
Количество междоузлий	7,0±0,37	6,0±0,28	5,3±0,24
Количество корней	6,7±0,33	8,0±0,37	4,3±0,19
Длина корней, см	3,7±0,22	3,1±0,16	1,8±0,09
Масса сырая, мг	60,7±4,89	46,0±0,27	32,7±0,16
Коэффициент размножения (КР)	**6,7**	**5,7**	**3,7**
Особенности развития	Растения не имеют признаков отклонений в росте и развитии	Часть растений в посевах имеют деформированные листья	Часть растений в посевах имеют пожелтевшие и деформированные листья

Установлено, что внесение метаболитов исследуемого штамма в питательную среду способствует увеличению средней высоты формирующихся растений на 52% по сравнению с контролем и на 23 % по сравнению с раствором ИУК 10^{-6}М (рис. 1). Более выраженный стимулирующий эффект КЖ по сравнению с ИУК может быть обусловлен присутствием в ней ряда других физиологически активных соединений. О стимулирующем влиянии метаболитов ассоциативных бактерий ранее сообщалось в научной литературе [9].

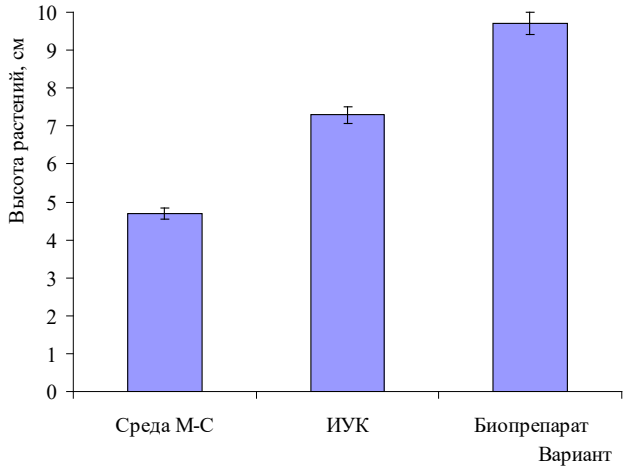


Рис. 1. Влияние культуральной жидкости штамма *Pseudomonas* GRP225 на среднюю высоту растений картофеля в культуре *in vitro*.

Одновременно с влиянием на линейные параметры надземных органов формирующихся растений, КЖ способствует увеличению у растений среднего числа корней – на 36% по сравнению с контролем. При этом длина корней у растений на среде с КЖ штамма *Pseudomonas* GRP225 на 16% и 51% превышает аналогичный показатель в вариантах опыта с ИУК и контроль (табл. 1).

Количество междоузлий – важный показатель, характеризующий темпы роста и развития растений в культуре *in vitro*. Этот показатель различается по вариантам опыта (рис. 2).

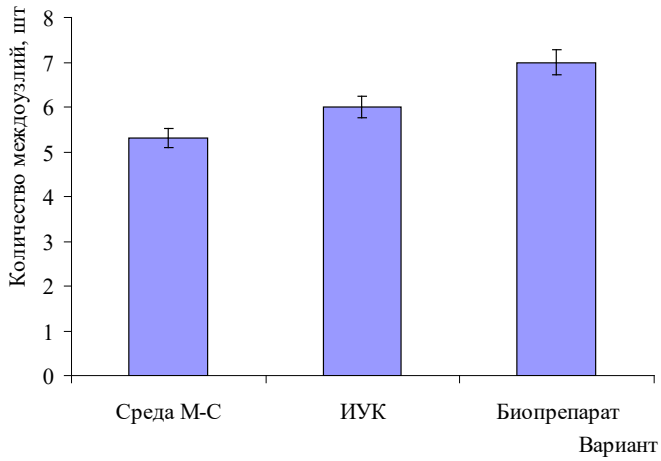


Рис. 2. Влияние культуральной жидкости штамма *Pseudomonas* GRP225 на количество междоузлий картофеля в культуре *in vitro*.

Внесение КЖ способствует появлению большего количества междоузлий по сравнению с вариантом с ИУК и контролем, что сопоставимо с действием ИУК в физиологически активной концентрации. Из литературы известно, что КЖ ассоциативных бактерий, а также экзогенная синтетическая ИУК при культивировании картофеля способствуют росту междоузлий [10]. Это согласуется с данными, полученными в данной работе.

Сырая масса является интегральным показателем, характеризующим темпы роста и развития растений. Установлено, что темпы ее накопления в разных вариантах опыта различается (рис. 3).

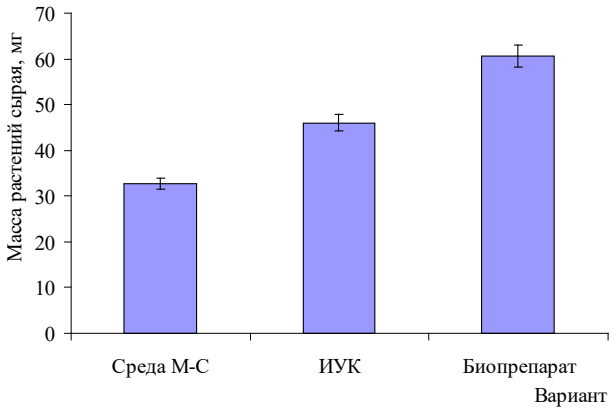


Рис. 3. Влияние культуральной жидкости штамма *Pseudomonas* GRP225 на накопление сырой массы картофеля в культуре *in vitro*.

Сырая масса растений, выращенных на питательной среде с КЖ штамма *Pseudomonas* GRP225 на 46 % выше по сравнению с контролем и на 24% по сравнению с вариантом с ИУК. Это свидетельствует о более быстрых темпах роста растений опытного варианта опыта.

При периодическом осмотре посевов было отмечено, что часть растений в контроле и варианте с ИУК имели отклонения в развитии – деформированные и пожелтевшие листья, искривленные побеги, сжатые междоузлия. Для растений на среде с КЖ при этом подобных отклонений не отмечалось.

Заключение

Таким образом, внесение метаболитов штамма *Pseudomonas* GRP225 (биопрепарат) в питательную среду для микроклонального размножения картофеля способствует увеличению коэффициента размножения, линейных размеров побегов и сырой массы растений, ускоряет сроки появления корней, увеличивают их длину и количество.

Дальнейшие исследования эффективности метаболитов ростостимулирующих бактерий в качестве компонента питательных сред для микроклонального размножения будут способствовать оптимизации современных эффективных технологий получения здорового посадочного материала важнейшей сельскохозяйственной культуры.

Список литературы

1. Удивительный мир растений. Значение растительного мира в жизни человека и животных // http://www.valleyflora.ru/67-1.html.

2. Годовой обзор FAO, продовольственная и сельскохозяйственная Организация Объединённых Наций // Рим, 2008. ISBN 978-92-5-306142-5. http://www.fao.org/potato-2008/pdf/IYPbook-ru.pdf.

3. Татьяна Корнеева, 2020. Топ вирусных и карантинных болезней картофеля // Главный сайт для агрономов России – ГлавАгроном. https://glavagronom.ru/articles/top-virusnyh-i-karantinnyh-boleznej-kartofelya.

4. Беглов С.М., Ткаченко О.В. Реферат на тему: «Микроклональное размножение растений как современный метод повышения эффективности семеноводства растений» // Реферат по истории и философии науки (биологический науки). Саратов, 2015.

5. Ступак С.И., Нурмухаметова З.А. Применение метода культуры *in vitro* для размножения овощных (*solanum lycopersicum*) и ягодных культур (*fregaria vesca*) // Башкирский государственный университет, г. Уфа.

6. Агеева С.В., Карпухин М.Ю. Совершенствование элементов технологии микроклонального размножения картофеля // УДК: 633.49:60

7. Канаева Е.Н. Перспективы развития технологии микроклонального размножения // 300-303. УДК 341.1/8.

8. Евсеева Н.В., Ткаченко О.В., Денисова А.Ю., Бурыгин Г.Л., Матора Л.Ю., Щеголев С.Ю. Влияние ростстимулирующих ризобактерий на микроклоны картофеля при осмотическом стрессе в условиях *in vitro* // Биомика, 2018, том 10, №2, 206-209.

9. Сидоров А.В., Зайцева Ю.В., Маракаев О.А. Влияние культуральной жидкости ассоциативных бактерий рода *Pseudomonas* на прорастание, морфогенез и рост *Dactylorhiza incarnata* (L.) Soó (Orchidaceae) в культуре *in vitro* // Вестн. Том. гос. ун-та. Биология. 2020. № 51. С. 6–24.

10. Ходаева В.П., Куликова В.И. Размножение сортов картофеля в культуре *in vitro* на различных питательных средах // Достижения науки и техники АПК. 2016. №10.

Приложение 1

Среда Мурасиге-Скуга (МС) для картофеля *in vitro*

Компоненты питательной среды	
Вода бидистиллят	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хеллат	5 мл/л
Пиридоксин	1 мл/л
Тиамин	1 мл/л
Феруловая к-та	1 мл/л
Сахароза	20 г/л
pH 5,8-6,0	
Агар	7-10 г/л

Приготовление маточных растворов для среды Мурасиге-Скуга.

№ п.п.	Компонент среды	Количество вещества
	Маточный раствор макросолей (г на 1 л маточного раствора)	
1.	KNO_3	38
2.	NH_4NO_3	33
3.	KH_2PO_4	3,4
4.	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7,4
	или $MgSO_4$ безводный	3,6
5.	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	8,8
	или $CaCl_2$ безводный	6,6
Маточный раствор микросолей (мг на 100 мл маточного раствора)		

1.	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	25
2.	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	2,5
3.	H_3BO_3	620
4.	$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	2410
	или $MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2230
5.	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	860
6.	KJ	83
7.	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	2,5
Fe-хелат (мг на 100 мл)		
1	$FeSO_4$	557
2..	Na_2 ЭДТА	745
растворить каждый отдельно в 40 мл бидист. воды при нагревании, затем слить остудить и довести до определенного объема		

Витамины:

Пиридоксин

10 мг пиридоксина + 100 мл воды

брать по 1 мл р-ра на 1 л среды

Тиамин

50 мг тиамина + 100 мл воды

брать по 1 мл р-ра на 1 л среды

Феруловая к-та

2 мг феруловой к-ты + 100 мл воды

брать по 1 мл р-ра на 1 л среды

Приложение 2

Алгоритм микроклонального размножения растений

Перед началом работы нужно подготовить и провести стерилизацию бокса: обработать хлорной известью (хлоркой) и ультрафиолетом. Обработать спиртом кисти рук и запястья, включая рабочее место и приборы. Перед тем как начать рассаживать микроклоны по пробиркам, нужно зажечь спиртовку и выполнять всю работу как можно ближе к пламени. Далее нужно получить посадочный материал разрезав материнское растение скальпелем на части. После этого с помощью пинцета рассадить экспланты по пробиркам со средой и герметично закрыть.