

Қазақстан Республикасы Тәуелсіздігінің 30 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары – 17: «Қазіргі аграрлық ғылым: цифрлық трансформация» атты халықаралық ғылыми – тәжірибелік конференцияға материалдар = Материалы международной научно – теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 17: «Современная аграрная наука: цифровая трансформация», посвященной 30 – летию Независимости Республики Казахстан.- 2021.- Т.1, Ч.2 - С.25-28

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАЗНЫХ ВИДОВ БОБОВЫХ КУЛЬТУР В УСЛОВИЯХ INVITRO

Дюсюкеева З.Б., ученица 11 класса

КГУ «Средняя школа № 44»

Научный руководитель: Касенова Б.Г.,

учитель исследователь,

магистр образования по специальности «Химия»

г.Нур-Султан

Методы культивирования изолированных органов, тканей и клеток растений появились более полувека назад и с тех пор постоянно совершенствуются. Работа в этом направлении привела к некоторым принципиальным достижениям в понимании процесса развития растения. Каллусные клетки - основной объект для культивирования *in vitro*. Вместе с тем каллус (название происходит от греческого «мозоль») присущ и высшим растениям как один из типов тканей, участвующих в заживлении механических повреждений, и является обычной защитной реакцией целого растения.

Для образования каллусной ткани *in vitro* клетки экспланта должны пройти процесс дедифференциации, т. е. утратить специфические характеристики исходной ткани.

Перестройка клеток эксплантов разных специализаций, предшествующая каллусогенезу, проходит сходным образом. Клетки эксплантов в первую очередь теряют вещества запаса - липиды, крахмал, белки. Фотосинтезирующие клетки теряют хлорофилл и липиды хлоропластов, но при этом возрастает количество амилопластов, разрушается аппарат Гольджи, перестраиваются эндоплазматический ретикулум и элементы цитоскелета. Клетки синтезируют РНК и ДНК, и начинается экспрессирование генов белка, присущих каллусным клеткам. Синтез белков эксплантов начинается через несколько часов после переноса экспланта в условия *in vitro*. Однако эта первая стадия связана с механическим повреждением, и синтез белка останавливается. Вероятно, в этой фазе действуют нативные гормоны растения, которые транспортируются, но возможность длительного синтеза для них исключена[1].

После извлечения клеток из ткани или организма и помещения их в культуру культуральная среда должна обеспечивать все внешние условия, которые клетки имели *in vivo*. Это обеспечивает выживание клеток.

Внеклеточная среда должна обеспечивать клетки питательными и гормональными факторами, т.е. обладать всем необходимым для роста и выживания клеток.

Эффективность каллусогенеза зависит от особенностей вида, физиологического состояния растения, типа экспланта и условий его культивирования. Явление каллусогенеза свойственно не только покрытосеменным, но и голосеменным растениям, папоротникам, мхам, печеночникам. Двудольные растения образуют каллус более интенсивно в сравнении с однодольными. Наблюдаются различия между генотипами в способности к каллусогенезу. Молодые ткани более предпочтительны в сравнении со старыми. Размер и форма экспланта не имеют определенного значения. Однако существует минимальный критический размер, уменьшив который, нельзя вызвать рост экспланта. Главным условием успешного каллусогенеза являются концентрация и баланс эндогенных и экзогенных ауксинов и цитокининов. Процесс деления дедифференцированных клеток происходит под действием цитокининов. Отношение ауксинов к цитокининам для получения каллуса до 10:1 [2].

Цель исследования – оптимизировать условия культивирования различных видов бобовых культур в условиях *invitro*.

Процедура исследования:

- Получение стерильных проростков
- Индукция первичных каллусов
- Индукция органогенеза

Новизна исследований: Применение способа *invitro* (прил.; латынь.- выращенный в пробирке; полученный в искусственных условиях) позволяет получить новый эффект - увеличить укореняемость побегов, улучшить развитие корневой системы растений, повысить их приживаемость в нестерильных условиях.

Оригинальность авторского подхода и решений: Химические препараты, необходимые для осуществления предложенного способа выращивания, характеризуются низкой стоимостью и производятся промышленностью, поэтому изобретение вполне может быть реализовано в условиях учреждений, работающих в области культуры тканей и органов растений. При этом не требуется разработки специального оборудования.

Практическая и теоретическая значимость. Выращивание в условиях *invitro* позволяют селекционерам и ученым - биотехнологам существенно сократить сроки исследований и разработок. Культивирование также позволяет глубоко проникнуть в механизмы роста и дифференцировки клеток. Способность клеток к росту в культуре привела к развитию методов клонирования, хранения и слияние клеток.

Задачи исследований:

1. Оптимизировать состав питательных сред для культивирования зернобобовых культур в условиях *invitro*.
2. Индуцировать каллусогенез бобовых культур в условиях *invitro*.

3. Отработать технологию регенерации бобовых культур в условиях *invitro*.

Одна из продовольственных проблем в настоящее время связана с недостатком белка в продуктах питания. По медицинским нормам человек должен потреблять в сутки 90 г белка. В среднем в мире этот показатель составляет 60 г, в развитых странах – 90, в развивающихся – 25 г в сутки.

Основное большинство используемых в пищу бобовых растений относится к подсемейству мотыльковых. Это в первую очередь соя, широко распространенный продукт питания во многих странах, а также горох, различные виды бобов и фасоли, чечевица, нут, арахис, маш и т.д. Их питательная ценность обусловлена составом бобов, которые богаты протеинами, содержат большое количество крахмала, многие виды накапливают в плодах растительное масло. Таким образом, бобовые, в особенности соя, являются дешевым заменителем мясных продуктов не только для бедных слоев населения планеты, но и для тех, кто придерживается определенных диет, ограничивающих употребление мяса. Ряд представителей семейства, в частности, соя и арахис, используются для промышленного получения растительного масла. По количеству производимого масла арахис находится на втором месте в мире, после хлопчатника.

К зернобобовым культурам относятся горох, фасоль, бобы, соя, нут, чечевица, чина, люпин. Они принадлежат к семейству бобовые (Fabaceae). Все эти культуры отличаются высоким содержанием белка в семенах благодаря симбиозу с клубеньковыми бактериями, которые усваивают азот из атмосферы (табл. 1). Белок содержит большое количество незаменимых аминокислот (лизин, валин, триптофан, метионин и др.). Кроме того, семена содержат жиры (особенно много – в сое), минеральные вещества, витамины группы А, В1, В2, С, Д, Е, РР, поэтому все эти растения являются ценными продовольственными и кормовыми культурами. Содержащаяся в них клетчатка помогает работе кишечника, вызывает быстрое насыщение, а присутствующие в белке аминокислоты и лизин укрепляют иммунитет. Еще одно преимущество бобовых – то, что они не накапливают нитратов и токсических веществ [3].

Для исследования были взяты 5 видов зернобобовых культур:

Основные этапы культивирования и результаты исследований разных видов бобовых культур в условиях *invitro* представлены в следующей таблице 1

Таблица 1. Особенности культивирования разных видов бобовых культур в условиях *invitro*

Этап технологии	Бобы	Горох	Нут	Соя	Чечевица
-----------------	------	-------	-----	-----	----------

Стерилизация	Стерилизация в растворе 90% этанола – 3 мин, промывка дистиллированной водой, стерилизация в растворе 10 % NaOCl – 10 мин, промывка дистиллированной водой, проращивание на среде МС (1/2 состава минеральных солей).				
Тип экспланта	Листовые экспланты 3-5 дневных стерильных проростков				
Индукция каллусогенеза	<u>Среда МС</u> 2,4-Д (0,3мг/л) НУК (0,5 мг/л)	<u>Среда Гамборга</u> БАП (0,66 мг/л) НУК (4 мг/л)	<u>Среда Гамборга</u> БАП (0,66 мг/л) НУК (4 мг/л)	<u>Среда МС</u> 2,4-Д (0,3мг/л) НУК (0,5 мг/л)	<u>Среда Гамборга</u> БАП (0,66 мг/л) НУК (4 мг/л)
Культивирование	5-6 недель, при 28°C, в темноте	3-4 недели, при 24°C, в темноте	3-4 недели, при 24°C, в темноте	5-6 недель, при 28°C, в темноте	3-4 недели, при 24°C, в темноте
Регенерация	Среда Гамборга, содержащая БАП (2 мг/л)+НУК (0,75 мг/л).				
Культивирование	5-6 недель в условиях фитотрона. Температура +20°C. После формирования корней регенеранты высаживаются в почвогрунт, температура снижается до +18°C, в период цветения повышается до +24°C. Продолжительность светового дня 16 часов.				

- ▶ Для получения стерильных проростков бобовых культур необходимо использовать стерилизацию 96% этанолом в течение 3 мин и 10% р-ром гипохлорита натрия в течение 10 мин с последующей промывкой в стерильной воде. Семена проращиваются на среде, содержащей ½ состава минеральных солей Мурасиге и Скуга в течение 3-5 дней.
- ▶ Изучаемые культуры проявляют различные требования к составу питательной среды для каллусогенеза. Для бобов и сои наиболее оптимальной является среда МС, содержащая 2,4-Д (0,3мг/л) и НУК (0,5 мг/л). Горох, нут и чечевица формировали большее количество каллусов на среде Гамборга В-5, содержащей БАП (0,66 мг/л) и НУК (4 мг/л).
- ▶ Наиболее продолжительным был период культивирования каллусов у бобов и сои (5-6 недель при температуре 28°C), в то время как для гороха, нута и чечевицы оптимальным было культивирование при 24°C в течение 3-4 недель.

- ▶ Общими для всех изучаемых культур были условия культивирования на этапе получения регенерантов . Максимальное количество стеблей (4-6 шт. на каллус) было сформировано на среде Гамборга В-5, содержащей 2 мг/л БАП и 0,7 мг/л НУК.
- ▶ Период культивирования на этапе регенерации составил около 5-6 недель в условиях фитотрона при температуре +20°C.

Иностранец, угощающийся в китайской столовой творогом и сыром, говядиной и рыбой, часто не подозревает, что все эти разнообразные блюда порой делаются из единственного продукта - семян бобового растения- сои. В них рекордно много белка - до 45%, немало и жиров - около 20%. Потребление коровьего молока в Китае не превышает 1 литра в год на душу населения, зато в большом ходу молоко из сои. Возделывать сою стали более 6 тыс. лет назад в Юго - Восточной Азии. Сейчас 60% мирового урожая сои выращивается в США. **Данную бобовую культуру в большом количестве необходимо выращивать и в Казахстане. Выращивание в условиях invitro** позволяют селекционерам, ученым - биотехнологам существенно сократить сроки исследований и разработок [4].

Зернобобовые культуры –это высокопроизводительный био завод по фиксации атмосферного азота. В среднем на 1 га посевов фиксируется более 250 кг азота, который остается в почве с корневыми остатками. Этот азот практически не вымывается, т. к. минерализуется постепенно, в течение 3—5 лет. Культуры изученные мною в лабораторных условиях являются биофабрикой по производству высококачественного белка. Валовый сбор белка при возделывании бобовых составляет 6—8 ц/га. Они важнейший источник растительного белка, содержащего в себе все жизненно необходимые аминокислоты (триптофан, лизин, метионин). Усвояемость человеческим организмом белков бобовых культур -83-87%, по калорийности превосходят все остальные овощи и картофель [5].

Возделываемые в Казахстане сорта на 85% зарубежной селекции. Основные методы создания исходного материала – гибридизация, на создание нового сорта уходит 10-15 лет. Поэтому изучение выращивания бобовых культур в лабораторных условиях решает очень важную проблему в селекции , изучение свойств культур их приживаемость , скорость их выращивания в различных условиях.

Клеточная селекция, в свою очередь, имеет ряд преимуществ:

- экономится площадь, так как в одной чашке Петри диаметром 10 см можно культивировать 107 – 108 клеток, а для такого же количества растений необходима площадь свыше тысячи гектаров;
- мутантные признаки на уровне отдельных клеток проявляются довольно быстро;
- возможно получение новых типов мутаций, в том числе и биохимического характера;
- экономится время и трудозатраты на получение нового желаемого признака [6].

В результате проведенных исследований были оптимизированы основные этапы технологии культивирования *in vitro* основных видов бобовых культур. Проведенные исследования имеют большое практическое значение – они позволяют использовать данную технологию для дальнейших манипуляций с культурами клеток в условиях *in vitro* – например, клеточной селекции или генно – инженерных мероприятий по улучшению свойств этих культур. Также данная работа способствует решению одной из важных задач для человечества – обеспечение населения продовольствием.

Список использованной литературы

1. Р.А. Диксон, «Биотехнология растений: культура клеток», 1989 -14с.
2. В.И. Артамонов, «Зеленые оракулы» ,1989 -45с.
3. В.А.Сидоров, «Биотехнология растений, клеточная селекция», 1990-77 с.
4. Витавская, А.В. «Живая» пища спасет население планеты Текст. / А.В. Витавская // Пища, вкус и аромат. 1999. - №1. - С.2-4.
- 5.http://www.diy.ru/dom_i_uchastok/plodovyyj-sad-i-ogorod/ogorod/ovoschnyie-kulturyi/osnovnyie-ovoschnyie-kulturyi/vyiraschivanie-bobovyih-kultur/
6. Ермаков, А.И. Методы биохимического исследования растений Текст. / Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярмаш Н.П. Л.: Агропромиздат, 1987. -458 с.