

**Министерство образования и науки Республики Саха (Якутия)**  
**Ministry of education and science of the Republic of Sakha (Yakutia)**  
**МБОУ «Туора-Кюельская СОШ имени И.Н. Гуляева» МР Таттинский улус**  
**Municipal Budgetary Educational organization «Tuora - Kuel secondary school by the name of I.N. Gulyaev» Tattinsky district**

# **ИССЛЕДОВАНИЕ КАЛЛУСОГЕНЕЗА ЦЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ**



**Выполнила: Барашкова Алена, ученица 9 класса**

**The work of the 9th grade pupil Barashkova Alena**

**Руководитель: Элякова А. А., учитель биологии и химии**

**Tutor: Elyakova A. A., teacher of biology and chemistry**

**Научный руководитель: Ханды М.Т., к.б.н., научный сотрудник ИЕН СВФУ имени М.К. Аммосова**

**Scientific adviser: Handy M. T., Ph. D., researcher of the IEN of the NEFU named after M. K. Ammosov**

## Актуальность

Культура клеток растений уникальный экспериментально созданный объект биологии. Исследование его принципов жизни, процессов жизнедеятельности является актуальной задачей в век биотехнологии, не только для больших исследовательских центров, но и для

**Цель:** исследование каллусогенеза лекарственных растений на примере *Achillea millefolium*, *Cichorium intybus*, *Thermopsis jacutica* и двух дикоросов Якутии - *Dracosephalum ruyschiana* и *Lilium pensylvanicum*.

## Задачи работы:

- ▶ Провести литературный обзор по теме исследования;
- ▶ Изучить и адаптировать методы работы с объектами *in vitro* в условиях школьной лаборатории;
- ▶ Провести эксперименты по получению культур клеток культурных и дикорастущих растений;
- ▶ Исследовать процессы каллусогенеза.

- ▶ **Новизна.** Впервые проведен сопоставительный анализ каллусогенеза пяти видов лекарственных растений: тысячелистника обыкновенного *Achillea millefolium*, цикория обыкновенного *Cichorium intybus*, змееголовника Рюйша *Dracosephalum ruyschiana*, лилии пенсильванской *Lilium pensylvanicum* и Термопсис якутского *Thermopsis jacutica*

**Практическая значимость.** Полученные в результате данного исследования каллусные культуры клеток будут использованы для дальнейших экспериментальных работ авторов с клетками *in vitro*. Кроме того, полученные материалы могут быть использованы для культивирования клеток экономически ценных растений, для микроклонального размножения, а также для внедрения растительной биотехнологии в школьные экспериментальные лаборатории.

# ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Тысячелистник  
обыкновенный**  
(*Achillea millefolium*  
L.)



**Цикорий  
обыкновенный**  
(*Cichorium  
intybus* L.)



**Змееголовник  
Рюйша**  
(*Dracoscephalum  
ruyschiana* L.)



**Лилия пенсильванская**  
(*Lilium pensylvanicum* Ker Gawl.)



**Термопсис якутский**  
*Thermopsis jacutica* (Czeffr.)



**Для получения и исследования культур клеток использовали среду Мурасиге и Скугу с разным составом гормонов в зависимости от задачи и объекта.**

**Макросоли:**

Нитрат аммония ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) **1650**

**мг/л**

Хлорид кальция ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )

**440 мг/л**

Сульфат магния ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

**370 мг/л**

Гидрофосфат калия ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) **170**

**мг/л**

Нитрат калия ( $\text{KNO}_3$ ) **1900 мг/л**

Пиридоксин · HCL **0,5 мг/л**

Тиамин · HCL **0,1 мг/л**

**Микросоли:**

Борная кислота ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) **6,2**

**мг/л**

Хлорид кобальта ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )

**0,025 мг/л**

Сульфат меди(II) ( $\text{CuSO}_4 \cdot$

$5\text{H}_2\text{O}$ ) **0,025 мг/л**

Сульфат марганца(II) ( $\text{MnSO}_4 \cdot$

$4\text{H}_2\text{O}$ ) **22,3 мг/л**

Молибдат натрия ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot$

$2\text{H}_2\text{O}$ ) **0,25 мг/л**

Сульфат цинка ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )

**8,6 мг/л**

**Другие компоненты**

Сульфат железа(II) ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) **27,8 мг/л**

Натрий этилендиаминтетрауксусной кислоты ( $\text{Na ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) **37,3 мг/л**

Мезоинозит **100 мг/л**

Сахароза **30000 мг/л**

# Выполнение исследования

Исследование проводилось с осени 2018 года по следующей схеме:

1. Стерилизация посуды, инструментов и оборудования;
2. Отбор и стерилизация экспланта;
3. Поддержание асептических условий при работе с культурой клеток;
4. Культивирование эксплантов;
5. Получение первичных культур клеток.



# 1. Поддержание асептических условий

Работа с объектами *in vitro* требует стерильности.

- ❑ Лабораторную посуду и инструменты (кроме металлических) тщательно помыли детергентом с помощью ершика, губки;
- ❑ Промыли водопроводной водой 10 раз;
- ❑ 3 раза промыли кипяченой водой;
- ❑ Металлы помыли протиранием заспиртованной ватой;
- ❑ Мытые стеклянные посуды, инструменты, бумаги стерилизовали в духовке (как альтернатива сухожарового шкафа) завернув их в фольгу при температуре 160-170°C в течение 2-х часов. после

Данную работу в биотехнологических лабораториях выполняют в ламинарных боксах, так как у нас в школе нет ламинарного бокса мы сделали работу в вытяжном шкафу, который находится в лаборатории кабинета биологии и химии, предварительно создав стерильные

➤ **Руку протерли ватой смоченной 70% этиловым спиртом перед работой, при каждом прикосновении к не стерильным предметам и по истечению 3-4 минут от последней стерилизации рук.**

➤ **Перед работой хорошо протерли рабочую поверхность вытяжного шкафа заспиртованной ватой;**

➤ **Все (спиртовка, колбы, чашки Петри, инструменты и т.д.), что вносили в вытяжной шкаф протерли спиртом.**

➤ **Рабочую поверхность протирали спиртом, после каждой манипуляции и после окончания работы.**



**Перед работой в лаборатории и в вытяжном шкафу для стерилизации перед работой включили ультрафиолетовую лампу на 20 минут**



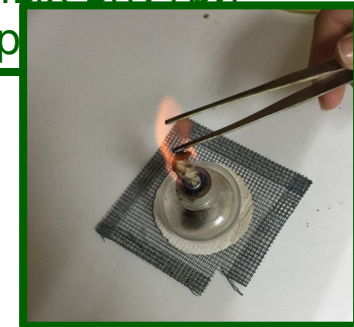
**Металлические иглы, пинцеты, скальпели стерилизовали непосредственно перед работой, для этого выполнили следующие ход действий:**

- работу выполнили в вытяжном шкафу, нам понадобилась: спиртовка, фарфоровый стакан, 70% этиловый спирт, инструменты для стерилизации.
- фарфоровый стакан промыли спиртом;
- три раза обжигали в пламени спиртовки все инструменты;
- дали инструментам остыть (10 минут), после чего начали работу.

**Стерильные посуды и инструменты открыли в асептических условиях,**

**созданных внутри**

**ор**



**Среду разлили по стерильным**



# 2. Отбор и стерилизация эксплантата

Эксплант — группа клеток, отделенная от материнского организма (семена тысячелистника обыкновенного и цикория обыкновенного) и (ткани из листьев змееголовника Рюйша и лилии пенсильванской):

1) Погрузили экспланты (семена) в раствор перекиси водорода 10% на 10 мин.;

2) Промыли экспланты три раза кипяченой водой;



Семена тысячелистника обыкновенного



Семена цикория обыкновенного



Листья змееголовника Рюйша



Листья лилии пенсильванской

Экспланты после стерилизации



### 3. Чистые семена или ткани поместили на чистель



### 4. Культивирование

Культуру хранили в стеклянной камере (в пустой аквариум) при температуре +25-28°C



# 5. Получение культур клеток



➤ Первичные каллусные культуры получили 29.10.18 г. из семян тысячелистника обыкновенного на 13 день после посева в среду. Каллусы имели светло-желтую окраску и плотную структуру, морфогенез (появление листьев, корней) не наблюдали. Количество каллусогенеза из эксплантов по датам:

31.10.18 г. - 6 шт.

02. 11.18 г. - 3 шт.

05.11.18 г. - 3 шт.



# Результаты исследования

Экперимент №1 2018 г.

Среда Мурасиге Скугу с фитогормонами: кинетин (1 мг/л) и 2,4-Д (2 мг/л).

№ п/п	Эксплант (16.10.18 г.)	Сколько шт	Каллусы
1.	Тысячелистник обыкновенный <i>Achilléa millefólium</i> (семя)	3	3 (5.11.18 г.)
2.	Тысячелистник обыкновенный <i>Achilléa millefólium</i> (семя)	3	3 (2. 11.18 г.)
3.	Тысячелистник обыкновенный <i>Achilléa millefólium</i> (семя)	4	4 (29.10.18 г.)
4.	Тысячелистник обыкновенный <i>Achilléa millefólium</i> (семя)	6	6 (31.10.18 г.)
5.	Цикорий обыкновенный <i>Cichorium intybus</i> (семя)	3	2 (10.11.18)
6.	Цикорий обыкновенный <i>Cichorium intybus</i> (семя)	3	2 (14.11.18)
7.	Цикорий обыкновенный <i>Cichorium intybus</i> (семя)	4	3(11.11.18)



# В 2019 году поставили аналогичный эксперимент с листьями редких растений

**Экперимент №2 2019 г.**

**Среда Мурасиге Скугу**

<b>БАП 0,5/НУК 1</b>			<b>БАП 0,5/2,4 1</b>		
<b>Эксплант 24.06.19</b>	<b>Количество эксплантов</b>	<b>Каллусы</b>	<b>Эксплант 24.06.19</b>	<b>Количество эксплантов</b>	<b>Каллусы</b>
<b>Змееголовник Рюйша</b>	<b>4</b>	<b>2 (5.07.19)</b>	<b>Змееголовник Рюйша</b>	<b>4</b>	
<b>Змееголовник Рюйша</b>	<b>4</b>	<b>2 (5.07.19)</b>	<b>Змееголовник Рюйша</b>	<b>4</b>	
<b>Лилия пенсильванская</b>	<b>4</b>		<b>Лилия пенсильванская</b>	<b>4</b>	
<b>Лилия пенсильванская</b>	<b>4</b>		<b>Лилия пенсильванская</b>	<b>4</b>	



# Каллусные клетки змееголовника Рюйша

---



**В этом 2020 году в октябре месяце поставили эксперимент с семенами редкого растения *Термопсиса якутского*  
*Thermopsis jacutica***

**Экперимент №3 2020 г.**

**Среда Мурасиге Скугу**

<b>БАП 0,5/НУК 1</b>			<b>БАП 0,5/2,4 1</b>		
<b>Эксплант 29.10.2020</b>	<b>Количество эксплантов</b>	<b>Каллусы</b>	<b>Эксплант 29.10.2020</b>	<b>Количество эксплантов</b>	<b>Каллусы</b>
<b>Термопсис якутский</b>	<b>2</b>		<b>Термопсис якутский</b>	<b>2</b>	
<b>Термопсис якутский</b>	<b>2</b>		<b>Термопсис якутский</b>	<b>2</b>	



# **Выводы:**

1) Изучен и апробирован метод применения технологии культур клеток *in vitro* в условиях сельской школы.

2) В результате проведенных работ получены первичные каллусные культуры тысячелистника обыкновенного светло-желтого цвета и плотной структуры на среде МС с кинетином 1 мг/л и 2,4-Д 2 мг/л. Процент каллусогенеза составила 100%.

3) По результатам работы с семенами цикория обыкновенного получены каллусные культуры светло-желтого цвета и рыхлой структуры на среде МС с кинетином 1 мг/л и 2,4-Д 2 мг/л. Процент каллусогенеза составила 70%.

4) Получены каллусные культуры клеток змееголовника Рюйше светло-серого цвета и рыхлой структуры на среде МС с БАП 0,5 мг/л, НУК 1 мг/л. Процент каллусогенеза составила 50%.

5) Культуры клеток лилии пенсильванской на испытываемых средах не получены, что возможно, связано с эпигенетикой однодольных растений.

6) В этом 2020 году поставили эксперимент с семенами редкого растения Термопсиса якутского. В данное время опыт с каллусогенезом пока находится на стадии наблюдения.