

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ IN VITRO

Объяснение:

Важным фактором, влияющим на успешность размножения того или иного вида растений, является питательная среда, которая должна содержать сбалансированный состав макро- и микроэлементов, углеводов, витаминов, регуляторов роста, аминокислот.

На сегодняшний день разработано большое количество стандартных прописей питательных сред для выращивания растений в асептической культуре. Условно их можно разделить на две большие группы: среды для культивирования травянистых и древесных растений. Наиболее известной является среда Мурасиге-Скуга (МС, MS), разработанная в 1962г. Как показывает практика, композиция компонентов этой среды оказалась наиболее универсальной для культивирования представителей многих семейств травянистых растений. Для культивирования древесных растений применяют другой тип сред. Наибольшее распространение получила среда под аббревиатурой WPM (woody plant medium), разработанная в 1990г.

Минеральные компоненты питательных сред.

Макроэлементы:

К макроэлементам относят 6 основных химических элементов, которые растения получают из субстрата: они необходимы для любого растительного организма и входят в состав всех прописей и комплексных удобрений: азот, кальций, калий, фосфор, магний, сера. Углерод, водород и кислород растения получают из водной фазы культуральной среды и из воздуха.

Азот – один из важнейших элементов, необходимых для нормального роста и развития растений. В культуральных средах основными источниками азота являются аммонийные (NH_4^+) и нитратные (NO_3^-) формы. Азот входит в состав аминокислот (белков), нуклеиновых кислот, пигментов (хлорофиллы), алкалоидов, гормонов и других органических соединений. Дефицит азота характеризуется хлоротичностью, угнетением роста и замедлением общих темпов развития растения в целом.

Фосфор поступает в корневую систему и функционирует в растении в виде окисленных соединений, главным образом остатков ортофосфорной кислоты (H_2P_04^- , HP_04^{2-} , P_04^{3-}). Содержание фосфора в растениях составляет около 0,2% на сухую массу. Физиологическое значение фосфора определяется тем, что он входит в состав ряда органических соединений, таких, как нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), нуклеотиды (АТФ, НАД, НАДФ), нуклеопротеиды, витамины и многих других, играющих центральную роль в обмене веществ. Фосфолипиды являются компонентами биологических мембран. Многие витамины и их производные, содержащие фосфор, являются коферментами и принимают непосредственное участие в каталитических реакциях, ускоряющих течение важнейших процессов обмена (фотосинтез, дыхание и др.). Ряд важнейших в биологическом отношении фосфорных соединений содержит несколько остатков фосфорной кислоты. Важным соединением, содержащим макроэргические фосфорные связи, является АТФ. Поглощению фосфора способствует выделение корнями кислот, ферментов, углеводистых веществ. Недостаток фосфора влияет практически на все процессы жизнедеятельности растений. При фосфорном голодании на листьях, незрелых плодах появляются

мертвые некротические пятна. Окраска листьев становится голубовато-зеленая или темно-зеленая, в некоторых случаях наблюдается накопление красного пигмента — антоциана.

Сера содержится в растениях в количестве 0,17%. Поступает сера в растения в виде сульфатона S^{042-} . Сера входит в состав трех аминокислот — цистина, цистеина и метионина. Почти все белки включают аминокислоты, содержащие серу. Сера входит также в состав многих витаминов и многих коферментов, таких, как биотин, тиамин, коэнзим А, глутатион, липоевая кислота и др. В связи с этим сера принимает участие в многочисленных реакциях обмена (аэробная фаза дыхания, синтез жиров и др.). Сульфгидрильные группировки (SH) и дисульфидные связи (S—S) играют большую роль, обеспечивая взаимодействие между ферментами и их простетическими группами, а также участвуя в создании определенной конфигурации белковых молекул. Соединения серы участвуют в поддержании уровня окислительно-восстановительного потенциала клетки. Показано, что в молодых органах сера находится главным образом в восстановленной форме, а старых — в окисленной. Признаки серного голодания очень близки к тем, которые наблюдаются при недостатке азота. Листья желтеют, появляется антоциановая окраска. Однако, в отличие от азота, эти признаки появляются, прежде всего, на молодых листьях.

Кальций входит в состав растений в количестве 0,2%. В старых листьях его содержание доходит до 1%. Поступает в виде иона Ca^{2+} . Роль кальция разнообразна. Кальций, соединяясь с пектиновыми веществами, дает пектаты кальция, которые являются важнейшей составной частью клеточных оболочек растений. Присутствие кальция важно для нормального функционирования мембран: дефицит кальция приводит к увеличению проницаемости мембран, нарушению их целостности, а соответственно процессов мембранного транспорта. Кальций принимает участие в поддержании структуры хромосом, являясь связующим звеном между ДНК и белком. Он необходим также для поддержания структуры митохондрий и рибосом, образования ламелл во вновь образующихся клетках. Кальций является активатором таких ферментов, как фосфорилаза, аденозинтрифосфатаза, дегидрогеназы, амилазы и др., реагирует с различными органическими кислотами, давая соли, и тем самым является в определенной мере регулятором значения pH клеточного сока. При недостатке кальция повреждаются и отмирают, в первую очередь, меристематические зоны стебля, корня и листьев. В свою очередь это тормозит процессы роста.

Калий поступает в растение в виде иона K^{+} . Содержание калия в растении в среднем составляет 0,9%. Физиологическую роль калия нельзя считать полностью выясненной. Калий не входит ни в одно органическое соединение. Большая часть его (70%) в клетке находится в свободной ионной форме и легко извлекается холодной водой, остальные 30% в адсорбированном состоянии. В противоположность кальцию калий снижает вязкость протоплазмы, повышает ее оводненность, увеличивая гидратацию белков. Соли калия растворимы и участвуют в регуляции осмотического потенциала клетки. В частности, большое значение имеет K^{+} в регуляции работы устьиц. Калий активирует работу многих ферментных систем — гексокиназы, пируваткиназы, а также ферментов, участвующих в образовании АТФ в процессе окислительного фосфорилирования. Калий активирует и ряд ферментов цикла Кребса. Под влиянием калия увеличивается накопление крахмала, сахарозы, моносахаридов. При недостатке калия на листьях проявляются хлоротические (белые) пятна. Некротические участки, края и концы листьев часто скручиваются.

Магний поступает в растение в виде иона Mg^{2+} . Содержание магния в растении составляет в среднем 0,17%. Магний входит в состав основного пигмента зеленых листьев — хлорофилла, поддерживает структуру рибосом, связывая РНК и белки. Поэтому синтез белка не идет при недостатке магния, а тем более в его отсутствие. Важной особенностью магния является то, что он связывает фермент с субстратом в виде хелатной связи (клетчатая связь между органическим веществом и катионом). Магний активирует такие ферменты, как ДНК- и РНК-полимеразы, аденозинтрифосфатазу, глутаматсинтетазу; ферменты, катализирующие перенос карбоксильной группы, реакции карбоксилирования и декарбоксилирования, ферменты гликолиза и цикла Кребса, молочнокислого и спиртового брожения. Поскольку магний входит в состав хлорофилла, то первым признаком голодания является интенсивное пожелтение паренхимы листа.

Железо входит в состав растения в количестве 0,08%. Необходимость железа была показана в тот же период, что и остальных макроэлементов. Поэтому, несмотря на ничтожное содержание, его роль рассматривается вместе с макроэлементами. Железо поступает в растение в виде Fe^{3+} , а транспортируется в листья по ксилеме в виде цитрата железа (III). Роль железа в большинстве случаев связана с его способностью переходить из окисленной формы (Fe^{3+}) в восстановленную (Fe^{2+}) и наоборот. Железо входит в состав каталитических центров многих окислительных и восстановительных ферментов. В виде геминной группировки оно входит в состав таких ферментов, как цитохромы, цитохромоксидаза, нитратредуктаза, нитритредуктаза, леггемоглобин, каталаза и пероксидаза. Цитохромная система является необходимым компонентом дыхательной и фотосинтетической электронтранспортной цепи. Кроме того, целый ряд ферментов содержит железо в негеминной форме. К таким ферментам относятся некоторые флавопротеиды, нитрогеназа, железосодержащий белок ферредоксин, фитоферритин и др. Железо необходимо для образования хлорофилла. В хлоропластах железо в негеминной форме входит в состав реакционных центров фотосистем I и II. Недостаток железа вызывает интенсивный хлороз листьев, в первую очередь молодых. Характерным является то, что хлороз проявляется в пространстве между жилками, при этом желтая поверхность листьев покрыта сеткой зеленых жилок.

Микроэлементы:

К группе микроэлементов относят незаменимые химические элементы, которые необходимы растениям в количествах 0,01% и менее (в расчете на сухую массу). Роль большинства микроэлементов определена участием в активных центрах ферментов, поэтому их дефицит может негативно сказываться уже на самых ранних этапах онтогенеза.

Марганец поступает в растение в виде ионов Mn^{2+} . Среднее содержание марганца в растениях 0,001%. Марганец характеризуется высоким показателем окислительно-восстановительного потенциала. Он необходим для нормального протекания фотосинтеза, поскольку входит в состав активного центра окислительно-восстанавливающего комплекса фотосистемы II. Кроме того, марганец участвует в восстановлении CO_2 , играет роль в поддержании структуры хлоропластов, участвует в азотном обмене в восстановлении нитратов до аммиака. Марганец активирует более 30 ферментов, участвующих в реакциях окисления-восстановления, декарбоксилирования и гидролиза. При недостатке марганца на листьях появляются желтые и некротические пятна — точечный хлороз листьев. Особенно чувствительны к недостатку марганца

пыльцевых трубок. При недостатке бора первый симптом — это отмирание точек роста, останавливается рост побегов и корней, листовые пластинки утолщаются, скручиваются, становятся ломкими, нарушается развитие сосудистой системы, клетки плохо дифференцируются.

Кобальт находится в тканях растений в ионной (Co^{2+} , Co^{3+}) и комплексной форме. Содержание кобальта в среднем составляет 0,00002%. Особенно кобальт необходим бобовым растениям, поскольку участвует в фиксации атмосферного азота. Кобальт входит в состав кобаламина (витамин В12 и его производные), который синтезируется бактериями в клубеньках бобовых растений. Показано влияние кобальта на функционирование фотосинтетического аппарата, синтез белка, его связь с ауксиновым обменом. Трудность решения вопроса о необходимости кобальта для всех растений заключается в том, что потребность в нем чрезвычайно мала.

Никель поступает в растения в виде иона Ni^{2+} , но может также находиться в виде Ni^{+} и Ni^{3+} . Роль никеля для высших растений как микроэлемента была доказана недавно. До этого считали никель необходимым микроэлементом многих бактерий. У высших растений никель входит в состав фермента уреазы, который осуществляет реакцию разложения мочевины. Никель активизирует ряд ферментов, в т. ч. нитратредуктазу и другие, оказывает стабилизирующее влияние на структуру рибосом.

Хлор поступает в растение в виде Cl^{-} . Хлор необходим для работы фотосистемы II на этапе фотосинтетического разложения воды и выделения кислорода. Показано влияние хлоридов на деление клетки. Имеются сведения о влиянии хлора на азотный обмен. Так, хлориды стимулируют активность аспарагинсинтетазы, которая участвует в переносе аминогруппы на аспарагин. Концентрируясь в растении в вакуолях, хлориды могут выполнять осморегулирующую функцию. Недостаток хлора проявляется редко и наблюдается только на очень щелочных субстратах.

Иод добавляют к средам в виде иодида калия (KI). Входит в состав некоторых аминокислот. Необходим в незначительных количествах.

Органические соединения.

Углеводы:

К группе углеводов относят наиболее часто встречающиеся в тканях растений органические соединения — моно-, дисахариды, крахмал, целлюлоза и др. Углеводы — незаменимые компоненты питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние не способны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве источника углерода используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 20-40 г на 1 л раствора. Сахароза — дисахарид, наиболее распространенный в растительных тканях, состоящий из 2 химически связанных моносахаров: β -фруктозы и α -глюкозы. Это основной энергетический материал растений, образующийся в процессе фотосинтеза. Известно, что изменяя ее концентрацию в питательной среде можно существенно влиять на характер морфогенеза, особенно при взаимодействии с регуляторами роста. Более того, наличие сахарозы (или других углеводов) в среде для укоренения необходимо, так как в случае ее отсутствия даже при наличии ауксинов процесс ризогенеза (образования корней) существенно замедляется или вообще прекращается.

Витамины:

Витамины — жизненно важные для нормального развития растений вещества. Это достаточно неоднородная группа органических соединений, наличие которых в

питательной среде необходимо в малых количествах, однако отсутствие одного или нескольких витаминов может существенно сказаться на развитии растительного организма.

Витамины группы В необходимы для обмена веществ и роста растений, большинство из них входят в состав дрожжевого экстракта, который раньше обычно использовался в культуре тканей. Теперь многие из компонентов последнего идентифицированы и для более полного контроля над процессами роста и развития их рекомендуется вносить отдельно. К этой группе относят целый ряд соединений.

Тиамин (витамин В1, $C_{12}H_{17}ClN_4OS$) рекомендован для большинства прописей сред, потому что функционирует в форме пиродифосфата как кофермент цикла Кребса. В состав сред входит в виде хлоргидрата тиамина в концентрациях 0,1-10 мг/л.

Никотиновая кислота (витамин В3, витамин РР, $C_6H_5NO_2$) – предшественник синтеза многих необходимых соединений в метаболизме растений. Одна из функций никотиновой кислоты проявляется в синтезе НАДФ и НАФ. Витамин РР добавляют к некоторым средам в концентрациях от 0,5 до 1 мг/л.

Пиридоксин (витамин В6, $C_8H_{11}NO_3$) также служит коферментом некоторых реакций обмена веществ. Пиридоксин занимает важное место в метаболизме аминокислот, позитивно влияет на процессы прорастания семян и роста проростков. В состав сред обычно добавляется в форме хлоргидрата в количествах 0,5-1 мг/л.

L-аскорбиновая кислота (витамин С, $C_6H_8O_6$) – наиболее известное соединение из группы витаминов. Принимает участие в окислительно-восстановительных процессах метаболизма. В основном витамин С используют как мощный антиоксидант, чтобы предотвратить фенольное окисление растений, содержащих фенольные смолы. Однако витамин С нельзя использовать длительно, поскольку он может стать окислителем непосредственно.

Рибофлавин (витамин В2, витамин G, $C_{17}H_{20}N_4O_6$) активен в углеводном обмене и важен для клеточного дыхания. Подобно прочим водорастворимым витаминам рибофлавин может синтезироваться в растениях, особенно на начальных этапах развития семян.

Аденин (витамин В4, 6-аминопурин, $C_5H_5N_5$) важен для клеток растений как составляющая нуклеиновых кислот (ДНК и РНК). В культуре тканей имеет слабый цитокининовый эффект.

D-пантотеновая кислота (витамин В5, $C_9H_{16}NO_5$) – водорастворимый витамин, который является частью молекулы коэнзима А. Включение D-пантотеновой кислоты в состав культуральных сред не имеет смысла на ранних стадиях развития проростков, вероятно некоторые растения могут синтезировать ее самостоятельно.

Также в отдельных случаях в состав питательных сред включают фолиевую кислоту, цианокобаламин, инозитол, биотин, холин, α -токоферол и др.

Аминокислоты – мономеры белков, некоторые из них, соединяясь с нуклеиновыми кислотами образуют нуклеопротейиды. На сегодняшний день известно 20 основных незаменимых аминокислот, многие из которых могут быть синтезированы искусственно. Все они представляют собой L-изомеры: L-аланин, L-аргинин, L-аспарагин, L-глутамин, L-лизин, L-пролин, L-серин, L-тирозин, L-цистеин, глицин и др.

Регуляторы роста (фитогормоны) — это вещества, вырабатывающиеся в процессе естественного обмена веществ и оказывающие в ничтожных количествах

регуляторное влияние, координирующее физиологические процессы. В этой связи им часто применяется термин — природные регуляторы роста. В большинстве случаев, но не всегда фитогормоны образуются в одних клетках и органах, оказывают влияние на другие. Иначе говоря, гормоны способны к передвижению в растении и их влияние носит дистанционный характер. Большинство физиологических процессов, в первую очередь рост, формообразование и развитие растений, регулируется гормонами. Известны следующие пять групп фитогормонов: ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота, этилен.

Наиболее широко в качестве регуляторов роста применяют ауксины, цитокинины (реже — гиббереллины) и их сочетания.

Таблица 1. Фитогормоны, используемые при культивировании растительных клеток.

Класс	Название	Сокращение	Физиологическое действие
Ауксины	2,4-Дихлорфеноксиуксусная кислота	2,4-Д	Ауксины оказывают влияние на деление, растяжение и дифференциацию клеток. В микроклональном размножении ауксины используют как индукторы ризогенеза на стадии укоренения микропобегов. Ауксины обуславливают явление апикального доминирования, проявляющегося в подавляющем влиянии верхушечной почки на рост пазушных.
	Индолил-3-уксусная кислота	ИУК	
	3-Индолилмасляная кислота	ИМК	
	1-Нафтилуксусная кислота	НУК	
	β -Нафтоксиуксусная кислота	НОУК	
Цитокинины	6-Бензиламинопурин	6-БАП	Самым типичным эффектом цитокининов является индукция деления клеток и участие в процессах органогенеза, наряду с ауксинами. Однако в организме растений цитокинины участвуют во многих жизненно важных процессах.
	6-Фурфуриламинопурин (Кинетин)	Кинетин	
	2-Изопентениладенин	2-ip	
	Зеатин	Z	
Гибберелины	Гибберелловая кислота	ГК	Гиббереллины заметно усиливают вытягивание стебля и в некоторых случаях его добавляют в

			питательную среду для вытягивания микропобегов перед этапом укоренения.
--	--	--	--

В прописи сред многие авторы кроме вышеперечисленных компонентов включают вещества неопределенного состава: пептон, гидролизат казеина, дрожжевой автолизат, картофельный экстракт, растительные соки, эндосперм кокосового ореха, гомогенат плодов банана.

Для успешного размножения *in vitro* в большинстве случаев прописи сред приходится подбирать индивидуально для каждого вида и даже сорта или культивара различных растений.

Среды могут быть твердыми (агаризированными) или жидкими. Ткани, выращиваемые в жидких питательных средах, обычно культивируют в роллерах с круговым перемешиванием среды или в шейкерах вибрирующего типа, иногда используют стационарную среду, помещая ткань на мостики из фильтровальной бумаги. Жидкие питательные среды иногда используют для проращивания семян или укоренения растений. Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар – полисахарид, получаемый из морских водорослей. Обычно концентрация агара в среде составляет 6,5-7 г на 1 л раствора.

Цель занятия: познакомиться с основными питательными средами и их компонентами для культивирования изолированных клеток и тканей растений.

Материалы и оборудование: весы, водяная баня, рН-метр, мерная посуда (колбы, стаканчики, цилиндры), стеклянные палочки, шпатели, дистиллированная вода, колбы для стерилизации среды с ватно-марлевыми пробками, алюминиевая фольга, маточные растворы макроэлементов, микроэлементов и витаминов.

Ход работы:

Приготовить питательную среду по прописи Мурасиге-Скуга.

В мерный цилиндр или мензурку вместимостью 1 литр поместить 30 г сахарозы, долить 100 мл дистиллированной воды и тщательно растворить. После этого внести в определенном порядке нужные количества маточных растворов макро-, микросолей и витаминов (по таблице 2), довести объем до 500 мл. Проверить рН раствора. Если рН превышает значение 5,6-5,8, в питательную среду внести по каплям 1н раствор КОН.

Агар (6,5 г) предварительно расплавить на водяной бане в 400 мл воды до однородной консистенции, внести в готовую среду, помешивая палочкой.

Довести объем раствора до 1 литра, разлить по колбам для автоклавирования. Колбы заполнить на 1/3 объема, закрыть ватно-марлевыми пробками, сверху фольгой и простерилизовать.

Таблица 2. Состав маточных растворов по МС для приготовления питательной среды.

Компоненты	Навеска	Количество мл маточного раствора на 1 л среды
Макросоли, г на 1 л маточного раствора		
KNO ₃	38	50

NH4NO3	33	5
KH2PO4	3,4	
MgSO4•7H2O	7,4	
CaCl2•2H2O	8,8	
Микросоли, мг на 100 мл маточного раствора		
H3BO3	620	1
MnSO4•2H2O	2230	
ZnSO4•7H2O	860	
KI	83	
Na2MoO4•2H2O	25	
CuSO4•2H2O	2,5	
CoCl2•2H2O	2,5	
Хелат железа, мг на 100 мл маточного раствора		
FeSO4	557	5
Na2ЭДТА	745	
Витамины, мг на 100 мл маточного раствора		
Витамин С	10	5
Витамин РР	10	5
Витамин В1	10	5
Витамин В6	10	5

Простерилизованную среду разлить в ламинар-боксе по пробиркам, банкам и чашкам Петри, закрыть колпачками из фольги, подписать и оставить в ламинарной комнате.