

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«Волгоградский государственный социально-педагогический университет»

Малаева Е.В.

**КУЛЬТУРА  
РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ**

**ПРАКТИКУМ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ**

*Учебное пособие*

**Москва  
«Планета»**

ББК 41  
М18

**Р е ц е н з е н т :**

*О.И. Молканова*, к.с.-х.н, ФГБУН Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН (ГБС РАН)

**Малаева Е.В.**

М18 **Культура растительных клеток и тканей. Практикум по биотехнологии:** учебное пособие / автор-сост.: Е.В. Малаева. – М.: Планета, 2016. – 47 с.

ISBN 978-5-91658-961-0

Практикум знакомит с методикой организации работ по культуре растительных клеток и тканей растений, с особенностями культивирования растений на всех этапах клонального микроразмножения. Издание предназначено для студентов высших и средних учебных заведений, учителей биологии и методистов.

ББК 41

ISBN 978-5-91658-961-0

© Малаева Е.В., 2016  
© Оформление, ООО «Планета», 2016

## Содержание

Введение

Техника безопасности при работе в лаборатории

Раздел Фитобиотехнология

Лабораторная работа 1. Организация биотехнологической лаборатории

Лабораторная работа 2. Приготовление питательных сред для культивирования клеток и тканей *in vitro*

Лабораторная работа 3. Способы стерилизации в биотехнологии

Лабораторная работа 4. Способы стерилизации растительных эксплантов

Лабораторная работа 5. Вычленение апикальных меристем и регенерация растений

Лабораторная работа 6. Пролиферация побегов и микрочеренкование стерильных проростков

Лабораторная работа 7. Индукция корнеобразования при микроклональном размножении растений

Лабораторная работа 8. Этапы микроклонального размножения растений

Лабораторная работа 9. Культура каллусных тканей

Лабораторная работа 10. Адаптация пробирочных растений к нестерильным условиям

Лабораторная работа 11. Индукция деления клеток и роста клеток растяжением под действием ауксина и гиббереллина

Приложение 1

Приложение 2

Терминология

Список литературы

## ВВЕДЕНИЕ

Современная биотехнология – это наука и отрасль производства, развивающаяся в трех основных направлениях:

- молекулярная биология и генетическая инженерия;
- микробиология и микробиологическая промышленность;
- культура клеток и тканей *in vitro*.

Клеточные технологии, основанные на культивировании *in vitro* органов, тканей, клеток и изолированных протопластов высших растений, могут облегчить и ускорить традиционный процесс создания новых сортов и видов. Они предлагают принципиально новые пути, такие как соматическая изменчивость, мутагенез на клеточном уровне, клеточная селекция, соматическая гибридизация для создания генетического разнообразия и отбора форм с нужными признаками. Кроме того, клеточные технологии эффективны в создании безвирусного материала вегетативно размножаемых растений.

Под клональным микроразмножением растений понимают бесполое размножение на искусственных питательных средах в условиях *in vitro*. Этот метод имеет следующие преимущества перед традиционными способами размножения растений:

- ◆ получение генетически однородного посадочного материала;
- ◆ получение безвирусных растений за счет использования меристемной культуры;
- ◆ высокий коэффициент размножения (например, из одного растения земляники можно получить в год 1 млн растений);
- ◆ сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ◆ ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- ◆ возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- ◆ возможность размножать трудноукореняемые растения (например, розы, орхидеи, орехоплодные и хвойные растения);
- ◆ пробирочные растения легко транспортировать на любые расстояния.

Процесс клонального микроразмножения включает в себя четыре этапа:

1. выбор растения-донора и получение хорошо растущей стерильной культуры;
2. собственно микроразмножение;
3. укоренение микропобегов и при необходимости их депонирование при пониженных температурах;
4. адаптацию пробирочных растений к почвенным условиям теплицы или открытого грунта.

Существует несколько методов клонального микроразмножения растений:

- ◆ активация развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки и интеркалярные зоны стебля);
- ◆ активация возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;

- ◆ индукция соматического эмбриогенеза;
- ◆ дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

В данном пособии представлены наиболее простые для освоения студентами биологических специальностей способы культивирования растений *in vitro*: метод апикальной меристемы; получение каллусов, суспензий и растений – регенерантов как на диплоидном, так и гаплоидном уровне.

По каждой теме предусмотрены: минимум теоретического материала, методика выполнения работы, перечень необходимого оборудования и реактивов.

## **ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ В ЛАБОРАТОРИИ:**

При проведении работ нужно соблюдать общие правила техники безопасности, выполнение которых обязательно для каждого работающего в лаборатории независимо от характера эксперимента:

1. Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, тишину и порядок. Посторонним лицам запрещено посещать работающих в лаборатории в стерильных условиях, во время эксперимента, отвлекать их.

2. К выполнению каждой работы могут приступать только студенты (сотрудники), прошедшие инструктаж по технике безопасности, что фиксируется в специальном журнале.

3. Студенты (сотрудники) должны работать в лаборатории в белом халате, чтобы избежать порчи одежды химическими реактивами. При выполнении работ в ламинар-боксе следует соблюдать условия стерильности (чистый халат, бахилы, маска, дезинфекция рук).

4. Рабочее место следует держать в чистоте. Нельзя загромождать его ненужными вещами.

5. Категорически запрещено пробовать какие-либо вещества на вкус.

6. При взвешивании реактивов нельзя насыпать химические вещества непосредственно на чашку весов.

7. При обращении со стеклянной химической посудой и приборами необходимо соблюдать меры предосторожности. Стеклянную посуду следует держать осторожно, не сжимая ее сильно пальцами. Мыть посуду из стекла ершиками или стеклянными палочками надо аккуратно, так как ими легко пробить дно или стенки сосудов, что может привести к травмам.

8. Всю посуду после работы с минеральными кислотами, щелочами и ядовитыми веществами следует сразу же тщательно вымыть под проточной водой.

9. Запрещено выливать в раковины остатки стерилизующих веществ и отработанные питательные среды.

10. При попадании кислоты (хромпика) или щелочи на кожу, нужно немедленно ее смыть водой и обработать пораженные участки нейтрализующим буфером.

11. Необходимо соблюдать меры предосторожности при работе со спиртовой горелкой: содержать ее в чистоте, заправлять спиртом вдали от открытых источников огня, не допускать перегрева резервуара, не оставлять зажженную спиртовку без присмотра.

12. Нагревание растворов и питательных сред необходимо проводить в стеклянной посуде на асбестовой сетке или на водяной бане.

13. При нагревании жидкостей и твердых тел в пробирках либо в колбах отверстие сосуда направлять в сторону от себя и соседей.

14. Работать с дистиллятором, стерилизатором (автоклавом) и другими электроприборами следует только по инструкции.

15. Работать в ламинар-боксе при включенной ультрафиолетовой лампе строго запрещено.

16. По окончании работы необходимо привести рабочее место в порядок, выключить газ, электроприборы, воду в лаборатории.

17. При возникновении пожара следует немедленно выключить газ, отключить электричество, очаг возгорания засыпать песком, накрыть плотной тканью или затушить с помощью огнетушителя.

18. При возникновении сильного возгорания немедленно покинуть помещение, сообщить в службу спасения (пожарную охрану), сообщить охране университета о пожаре.

## Лабораторная работа 1. ОРГАНИЗАЦИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Объяснение. Для организации биотехнологической лаборатории необходимы просторные изолированные помещения, а также современное оборудование и высококачественные реактивы.

Для удобства проведения дезинфекции полы и стены в помещениях должны иметь кафельное покрытие, а потолок должен быть побелен.

Оборудование моечной комнаты: мойки с горячей и холодной водой; дистиллированная вода; дистилляторы и бидистилляторы; сушильные шкафы с режимом работы для сушки посуды – до 100-130°C, для инструментов – до 170°C; шкафы для хранения чистой посуды и инструментов, емкости для хранения моющих средств, вытяжные шкафы с эксикаторами для хромпика ( $H_2SO_4$  98 % +  $K_2CrO_7$ ).

Оборудование комнаты для приготовления питательных сред: лабораторные столы; холодильники для хранения маточных растворов солей, гормонов и витаминов; аналитические весы; магнитные мешалки; плитки, газовые горелки; набор посуды (колбы, стаканы, мерные цилиндры, мензурки, пробирки и др.), необходимый набор химических реактивов надлежащей степени чистоты (ХЧ, Ч, ЧДА).

Оборудование помещения для стерилизации: автоклавы с режимом работы – давление 1-2 атмосферы и температура 120°C; стеллажи для штативов с питательными средами; шкафы для хранения стерильных материалов. Данное помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и иметь канализационный слив для отвода конденсата из автоклава.

Оборудование комнаты для инокуляции растительных эксплантов на питательные среды: ламинар-боксы, лабораторные столы, стеллажи, бактерицидные лампы, шкафы для материалов и оборудования.

Оборудование культуральных комнат: световое отделение – источники освещения со спектром близким к спектру дневного света (от 3 до 10 кЛк), кондиционер для регуляции температуры (25+ - 2°C) и влажности воздуха (70 %), стеллажи для штативов с культивируемым материалом; темновое отделение – с тем же оборудованием, исключая источники освещения.

Необходимый набор посуды, инструментов и материалов в биотехнологической лаборатории: мерные колбы, химические стаканы, мерные цилиндры, чашки Петри, пробирки, бутылки, пипетки, стеклянные палочки, стеклянные и мембранные фильтры, ланцеты (в том числе глазные, хирургические, анатомические), ножницы, пинцеты, ножи, бритвенные лезвия, препаровальные иглы, шпатели, бумага (оберточная, пергаментная, фильтровальная), фольга алюминиевая, вата, марля, шпагат.

Цель: изучить особенности организации биотехнологической лаборатории.

Материалы и оборудование. Химические стаканы (50, 100, 250 мл), штативы с пробирками, инструменты (пинцеты, скальпели, препарировальные иглы), моющие средства (стиральный порошок), хромпик.

Ход работы.

1. Ознакомиться с устройством биотехнологической лаборатории.

2. Под руководством преподавателя освоить принципы работы автоклава, сушильных шкафов, дистиллятора.

3. Посуду тщательно отмыть в растворах детергентов (стиральный порошок), промыть 8-10 раз проточной водой, поместить на 4-6 часов в хромпик (смесь серной кислоты с бихроматом калия), промыть теплой водой, затем дважды дистиллированной и бидистиллированной.

4. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 2 -2,5 часа при температуре 160°C.

5. Сухую посуду для хранения закрыть ватными пробками, фольгой, целлофаном.

## Лабораторная работа 2.

# 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 ( $\text{NH}_4^+$ ) и нитратные ( $\text{NO}_3^-$ ) 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 ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ). 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, углеводов и других 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  $SO_4^{2-}$ . 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 фосфоорилаза, 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 растениях составляет в среднем 0,17%. Магний входит в состав основного пигмента зеленых листьев — хлорофилла, поддерживает структуру рибосом, связывая РНК и белок. 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 по типу хелатной связи (клевшевидная 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 брожений. 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 обратно. Железо входит в состав каталитических центров многих окислительно-восстановительных ферментов. В виде геминовой 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 негемовой форме. К таким ферментам относятся некоторые флавопротеиды, нитрогеназа, железосодержащий белок ферредоксин, фитоферритин и др. Железо необходимо для образования хлорофилла. В хлоропластах железо в негемовой 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 кислородовыделяющего 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 35 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

хлоропласты. В них происходит разрушение хлорофилла и нарушение структуры крахмальных зерен.

Медь поступает в растение в виде иона  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Cu}^+$ . Среднее содержание меди в растениях 0,0002%. Медь входит непосредственно в состав ряда ферментных систем, относящихся к группе оксидаз, таких, как полифенолоксидаза, аскорбатоксидаза, цитохромоксидаза. Полифенолоксидаза и аскорбатоксидаза осуществляют окисление фенолов и аскорбиновой кислоты, а цитохромоксидаза входит в состав дыхательной цепи митохондрий. Большая часть меди (75% от всего содержания меди в листьях) концентрируется в хлоропластах. В хлоропластах сосредоточен и медьсодержащий белок синего цвета — пластоцианин. Медь, подобно железу и марганцу, обладает способностью к обратимому окислению и восстановлению:  $\text{Cu}^{2+} + e \rightarrow \text{Cu}^+$ . Именно поэтому пластоцианин участвует в переносе электронов от фотосистемы II к фотосистеме I. При дефиците меди снижается активность первой фотосистемы, белеют и отмирают кончики листьев. Затем хлорофилл разрушается по краям листовой пластинки. Листья теряют тургор.

Цинк поступает в растение в виде ионов  $\text{Zn}^{2+}$ . Среднее содержание цинка в растениях 0,002%. В растениях цинк не участвует в окислительно-восстановительных реакциях, поскольку не меняет степень окисления. Он входит в состав более 30 ферментов, в т. ч. фосфатазы, карбоангидразы, алкогольдегидрогеназа, РНК-полимераза и др. Карбоангидраза катализирует разложение гидрата окиси углерода на воду и углекислый газ. Эта реакция важна для процесса фотосинтеза. Цинк играет важную роль при образовании фитогормона ауксина. При дефиците цинка возрастает проницаемость мембран, что свидетельствует о роли этого элемента в структуре мембран, в поддержании их интеграции. Цинк влияет на белковый синтез, на активность РНКазы. Обнаружены белки, содержащие цинк и участвующие в репликации ДНК и транскрипции. Недостаток цинка приводит к уменьшению размеров листьев и к изменению их формы. Листорасположение принимает розеточную форму, междоузлия укорачиваются, на листьях проявляется хлороз.

Молибден поступает в растения в виде аниона  $\text{MoO}_4^{2-}$ . Содержание молибдена в растениях составляет 0,0005—0,002%. Молибден входит в состав более 20 ферментов, выполняя при этом не только каталитическую, но и структурную функцию. Молибден вместе с железом входит в состав активного центра ферментного комплекса нитрогеназы в виде Mo-Fe-белок и участвует в фиксации азота атмосферы различными микроорганизмами. При недостатке молибдена резко падает содержание аскорбиновой кислоты. При отсутствии молибдена наблюдаются нарушения в фосфорном обмене растений. Со способностью молибдена к комплексообразованию связано влияние этого элемента на стабилизацию структуры нуклеиновых кислот. При недостатке молибдена листья по краям приобретают серую, а затем коричневую окраску, теряют тургор, а затем ткани листа отмирают и остаются только жилки в виде хлыстиков.

Бор поступает в растение в виде аниона борной кислоты —  $\text{B}^{3-}$ . Среднее содержание бора в растениях 0,0001%. Роль бора выяснена далеко не достаточно. Это связано с тем, что бор, в отличие от большинства других микроэлементов, не входит в состав ни одного фермента и не является активатором ферментов. Тем не менее, выявлено, что он принимает участие в метаболизме фенолов, углеводов, нуклеиновых кислот, ауксиновом обмене, в формировании структуры клеточных стенок, регуляции процессов роста и развития. Бор принимает участие в делении клеток и азотном обмене, регулирует процессы транспорта воды, углеводов и гормонов, усиливает рост

пыльцевых трубок. При недостатке бора первый симптом — это отмирание точки 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 ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ) 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  $\text{Ni}^{2+}$ , но может также находиться в виде  $\text{Ni}^+$  и  $\text{Ni}^{3+}$ . 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 активирует ряд ферментов, в т. ч. нитратредуктазу и другие, оказывает стабилизирующее влияние на структуру рибосом.

Хлор поступает в растение в виде  $\text{Cl}^-$ . 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 аминокетильной группы 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 ( $\text{KI}$ ). 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:  $\beta$ -фруктозы и  $\alpha$ -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,  $C_{12}H_{17}N_4OS$ ) 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,  $\alpha$ -токоферол и др.

Аминокислоты - мономеры белков, некоторые из них, соединяясь с нуклеиновыми кислотами образуют нуклеопротеиды. 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, вырабатываемые в процессе естественного обмена веществ и оказывающие в ничтожных количествах

регуляторное влияние, координирующее физиологические процессы. В этой связи к ним часто применяется термин — природные регуляторы роста. В большинстве случаев, но не всегда фитогормоны образуются в одних клетках и органах, а оказывают влияние на другие. Иначе говоря, гормоны способны к передвижению по растению 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
<i>Ауксины</i>	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.
	Индоллил-3-уксусная кислота	ИУК	
	3-Индоллилмасляная кислота	ИМК	
	1-Нафтилуксусная кислота	НУК	
	$\beta$ -Нафтоксиуксусная кислота	НОУК	
<i>Цитокинины</i>	6-Бензиламинопури	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-Фурфуриламинопури (Кинетин)	Кинетин	
	2-Изопентениладенин	2-ip	
	Зеатин	Z	
<i>Гибберелины</i>	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 <sub>3</sub>	38	50

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	33	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,4	
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	7,4	
CaCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	8,8	5
Микросоли, мг на 100 мл маточного раствора		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	620	
MnSO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	2230	
ZnSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	860	
KI	83	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	25	
CuSO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	2,5	
CoCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	2,5	
Хелат железа, мг на 100 мл маточного раствора		
FeSO <sub>4</sub>	557	
Na <sub>2</sub> ЭДТА	745	5
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.

## Лабораторная работа 3. СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ В БИОТЕХНОЛОГИИ

### Объяснение:

Одним из основных условий успешного культивирования изолированных культур является соблюдение строгой стерильности, поскольку на искусственных питательных средах хорошо развиваются микроорганизмы, что представляет собой двойную опасность. Во-первых, в результате жизнедеятельности микроорганизмов может существенно измениться состав питательных сред. Во-вторых, изолированные от растения ткани, клетки и, в особенности, протопласты легко повреждаются микроорганизмами. Поэтому все опыты проводят в стерильных помещениях – боксах или ламинар-боксах и с использованием стерильных материалов и инструментов.

Стерилизация может быть достигнута следующими методами:

- влажным (текучим) жаром (автоклавирувание, кипячение, пастеризация, дробная стерилизация – тиндализация);
- сухим жаром (нагревание горячим воздухом в сухожаровых шкафах, обжигание);
- с помощью различных химических веществ (стерилизующих агентов);
- фильтрованием через бактериальные фильтры;
- облучением ультрафиолетовыми лучами.

### Стерилизация посуды

Вся посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и высушена. Культуральные сосуды (колбы, пробирки, банки, чашки Петри и т.п.) перед заполнением их питательными средами стерилизуют завернутыми в плотную бумагу сухим жаром в сухожаровом шкафу, размещая на металлических полках. Продолжительность стерилизации при 150°C – 2,5 ч., при 160°C – 2 часа. За это время погибают не только бактерии, но и их споры. Следует иметь в виду, что для этого минимального времени, необходимого для стерилизации, требуется вносить поправку на время, необходимое для нагрева камеры до нужной температуры. Еще более строгой стерилизации можно добиться под давлением в автоклаве, поскольку влажный жар более губителен для микроорганизмов и спор патогенов. В этом случае посуду заворачивают в фольгу или крафт-бумагу, сверху – в целлофан; верхнюю часть пипеток закрывают ватой, каждую заворачивают в бумагу. Автоклавируют под давлением 2 атм. (133°C) в течение 25-30 мин.

### Стерилизация инструментов

Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и др.) производится прокаливанием сухим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 160°C. Шприцы, ножницы, пробочные сверла удобнее кипятить. При этом режущие части инструментов заворачивают в марлю или вату, чтобы уберечь от ударов. Металлические инструменты нельзя автоклавирувать: под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в процессе работы инструменты еще раз стерилизуют в ламинар-боксе, помещая их в фарфоровый стакан с 96%-ным этиловым спиртом, затем обжигая в пламени спиртовки. После этого каждый инструмент помещают между листами предварительно простерилизованной плотной бумаги, сложенной в пачку. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным употреблением его снова следует

простерилизовать спиртом и обжечь. Очень тонкие инструменты (иглы, тонкие лезвия) могут тупиться при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт.

#### Стерилизация материалов

Вату, марлю, ватные пробки, бумажные матрасики, фильтровальную бумагу, халаты стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм. в течение 25-30 мин. Бумажные матрасики из плотной офисной бумаги можно стерилизовать в сушильном шкафу, однако со временем бумага темнеет и становится хрупкой.

#### Стерилизация ламинар-боксов и операционной комнаты.

Стерилизация операционной комнаты и ламинар-боксов является необходимой процедурой, в результате которой должны быть устранены источники возможной инфекции тканевых и клеточных культур (бактерии, споры, грибы).

Помещение, где осуществляются стерильные операции должно содержаться в абсолютном порядке, поэтому в первую очередь его очищают от грязи и пыли. Грязь удаляют тщательным отмыванием водой с мылом рабочей поверхности столов, стен, пола, углов. Затем пол протирают дезинфицирующим раствором («Доместос» или др. чистящее средство), столы протирают спиртом. Вторым этапом стерилизации является облучение ультрафиолетовым светом, который губительно действует на вегетирующие формы микроорганизмов.

Ламинар-боксы предназначены для выполнения работ, требующих стерильности, которая обеспечивается с помощью бактериальных воздушных фильтров. Внутренние поверхности ламинар-боксов перед работой протирают спиртом, за 10-20 минут до начала работы включают ультрафиолетовую бактерицидную лампу.

Перед работой в ламинар-боксе следует плотно закрыть дверь в асептическую комнату, одеть чистый халат, шапочку, маску, бахилы. Протереть руки спиртом. В процессе работы недопустимо открывать двери в операционную комнату. Нужно воздержаться от лишних разговоров и ненужных движений, периодически протирать руки спиртом, не выносить стерильные инструменты и материалы из ламинар-боксов. Использовать инструмент только для одноразовой операции и не употреблять его, если возникло подозрение, что он соприкасался с нестерильной поверхностью. Необходимо избегать движений руками над открытыми чашками Петри и сосудами со стерильной средой. Недопустимо прерывать выполнение операции, вынимая руки из ламинар-боксов.

#### Стерилизация воды и питательных сред

Существуют два основных способа стерилизации питательных сред – автоклавирование и фильтрование. В первом случае разлитые в колбы или пробирки питательные среды и дистиллированную воду закрывают ватными пробками и фольгой и автоклавировать при температуре 120°C и давлении 1 атм. в течение 20 минут. Можно сначала методом автоклавирования простерилизовать большое количество среды в одном объеме, а затем в ламинарном боксе разлить ее в стерильную посуду для культивирования.

Время термической обработки зависит от объема посуды, в которую разлита среда. Например пробирки со средой стерилизуют 15 минут при температуре 115°C, а колбы содержащие 500 мл среды дезинфицируют 30 минут при температуре 121°C и 45 минут при 115°C.

Во втором случае используют стерильные фильтры Зейтца, Беркефельда, мембранные фильтры, незаменимые для приготовления сред с термолабильными компонентами (некоторые стимуляторы роста, витамины, антибиотики,

аминокислоты, растительные экстракты), которые разрушаются при автоклавировании. Фильтрация сред (холодная стерилизация) применяется также для приготовления смесей ферментов и выделения изолированных протопластов, сред с биологически активными компонентами.

#### Стерилизация растительного материала

Для поверхностной стерилизации растительных тканей применяют большой набор химических веществ. Наиболее часто употребляют соединения, содержащие активный хлор (гипохлорит натрия, хлорную известь, гипохлорит кальция, хлорамин), двухлористую ртуть (сулему), перекись водорода, этиловый спирт, синтетические комплексные стерилизаторы (лизформин, тетрамин и др.). Реже используют бром, серную кислоту и в особых случаях пользуются антибиотиками.

Цель: познакомиться с методами стерилизации и правилами асептики, принятыми в биотехнологической лаборатории.

Материалы и оборудование: стеклянная посуда (колбы, чашки Петри, пробирки, банки), скальпели, пинцеты, крафт-бумага, дистиллированная вода, алюминиевая фольга.

#### Ход работы:

Стеклянную посуду тщательно вымыть с использованием моющего средства (детергента), загрязненную посуду предварительно замочить в растворе дихромата калия в концентрированной серной кислоте (хромпик). Вымытую посуду ополоснуть дистиллированной водой и высушить в сушильном шкафу. Высушенную посуду завернуть в плотную крафт-бумагу и стерилизовать в сухожаровом шкафу 2 часа при температуре 160°C.

Скальпели, пинцеты, бумажные матрасики завернуть в крафт-бумагу и простерилизовать в сухожаровом шкафу 2 часа при температуре 160°C.

Дистиллированную воду разлить в колбы на 1/3 объема, закрыть фольгой и простерилизовать в настольном паровом стерилизаторе.

Все стерильные материалы разместить в ламинарной комнате.

## Лабораторная работа 4. СПОСОБЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСПЛАНТОВ

### Объяснение:

Семена являются основной единицей распространения и размножения цветковых растений. В биотехнологии растений часто используют зрелые и незрелые семена растений для введения в культуру *in vitro* (получения стерильных проростков).

Поверхностные покровы всех органов растений обычно загрязнены спорами различных микроорганизмов и грибов. Однако внутренние ткани здоровых растений считаются стерильными, хотя и в них могут находиться непатогенные бактерии, которые не всегда обнаруживаются. Поэтому основным условием введения в культуру *in vitro* является стерилизация первичных эксплантов.

Растительные объекты перед стерилизацией тщательно отмывают проточной водой, иногда с моющими средствами, очищают от излишних тканей. С корнеплодов и корней снимают кожуру, с побегов – кору, с почек – кроющие чешуи.

Растительные экспланты стерилизуют растворами веществ, содержащими активный хлор (хлорамином, гипохлоритом Ca и Na), бром (бромной водой), перекисью водорода, сулемой, спиртом, нитратом серебра, диацидом, антибиотиками.

Этиловый спирт  $C_2H_5OH$  часто применяют для предварительной стерилизации, протирая им поверхность материала или погружая материал на несколько секунд в абсолютный спирт. Иногда такой стерилизации достаточно, ее используют при работе с плодами, мелкими гладкими семенами, побегами, завязями. Кроме того, обработка семян и других растительных тканей этанолом перед помещением в стерилизующий раствор повышает стерилизующий эффект последнего.

Гипохлорит кальция (хлорная известь)  $Ca(ClO)_2$  используется в виде 5-7 % раствора для обработки почек, завязей, цветков, семян, побегов в течение 5-8 минут.

Гипохлорит натрия  $NaClO$  используется в виде 0,5-5 % раствора для обработки любых эксплантов в течение 1-20 минут. Это вещество является клеточным ядом, поэтому время стерилизации и концентрацию подбирают экспериментально. Например: для изолированных зародышей используют 2-3 % раствор в течение 10-15 минут, а для сухих семян 3-5 % раствор в течение 1 часа. Остатки гипохлорита натрия сначала удаляют 0,01 н  $HCl$ , а затем 8 раз промывают автоклавированной дистиллированной водой.

Хлорамин применяют в концентрации 1-7 %. Пыльники и молодые зародыши обрабатывают в течение 1-3 минут, сухие семена – 30-60 минут, затем промывают стерильной дистиллированной водой 2-3 раза.

Сулема (хлорид ртути)  $HgCl_2$  – токсичное вещество и требует особой тщательности, как при хранении, так и при подборе концентрации для отдельных объектов. Для стерилизации зародышей используют 0,1 % раствор в течение 1-3 минут, для корне- и клубнеплодов – до 10-20 минут.

Растворы, содержащие активный хлор используются 1 раз и готовят их непосредственно перед работой.

Диацид используется в 0,2 % растворе для стерилизации корнеплодов, семян, кусочков, тканей, верхушечных меристем, изолированных зародышей, пыльников. Диацид готовят, растворяя отдельно 330 мг этанолртутихлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (330 мл), затем их смешивают и доводят

объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента твин-80; хранят в плотно закрытой колбе в темноте.

Перекись водорода H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> используют в основном для стерилизации семян (в концентрации 2-10 %), реже для стеблей и листьев. После стерилизации перекисью водорода не требуется длительного промывания тканей водой (достаточна одноразовая промывка).

Бром Br<sub>2</sub> в виде 1% водного раствора – эффективное стерилизующее средство, особенно для семян. Однако этот раствор следует применять очень осторожно, причем только на сухих семенах, так как бром токсичен и повреждает зародыши, если они ненадежно защищены. После стерилизации бромной водой требуется тщательное отмывание растительных объектов дистиллированной водой.

В последнее время в биотехнологических лабораториях стали применять синтетические комплексные стерилизаторы (лизоформин, тетрамин и др.). Их особенностью является менее высокие концентрации и меньшая токсичность для работников, осуществляющих введение в культуру.

Антибиотики применяют для стерилизации растительного материала, инфицированного бактериями (ткани корончатогалловых опухолей). Наиболее часто применяют стрептомицин и тетрацилин 10-80 мг/л, ампициллин 200-400 мг/л, левомицитин, каномидин и другие.

Вид стерилизующего вещества, его концентрация и длительность применения зависит от плотности и чувствительности растительной ткани, которая должна быть стерилизована. Следует помнить, что многие стерилизующие вещества при длительном воздействии на ткань, ингибируют рост и затрудняют прорастание семян. Важным условием является то, что стерилизующее вещество должно легко удаляться из ткани промыванием дистиллированной водой или подвергаться разложению. Оптимальным способом стерилизации для каждого вида следует считать тот вариант, при котором наблюдается наименьший процент инфицированных семян при наименьшем повреждении растительных тканей.

Следует учитывать при подборе режима стерилизации морфологические особенности семян: гладкие семена с тонкой кожурой необходимо стерилизовать в более щадящем режиме, чем семена, имеющие твердую, плотную оболочку, выросты и опушение, неровную поверхность.

Семена для проращивания после стерилизации высевают либо на воду, либо на питательную среду, не содержащую гормонов и других биологически активных веществ.

Цель занятия: познакомиться с методами введения в культуру *in vitro* семенами растений разных видов.

Материалы и оборудование: стерильная дистиллированная вода, стерильные стаканчики для промывания семян, сосуды с питательной средой, пинцеты, спиртовка, 96% спирт, песочные часы, марлевый бинт, хлорамин Б.

Ход работы:

Отобрать 10 семян выбранного вида растения. Семена завернуть в мешочки из марли по 5 штук.

В ламинар-боксе простерилизовать семена:

- Поместить мешочки с семенами в стакан с 96%-ным спиртом на 1 минуту. Промыть 3 раза в стерильной дистиллированной воде.

- После промывания поместить 1 мешочек с семенами в стакан с 10%-ным раствором хлорамина на 5 минут, 2 мешочек – на 10 минут. Промыть 3 раза в стерильной дистиллированной воде.

Пинцет опустить в стакан со спиртом и прокалить в пламени спиртовки. Стерильным пинцетом переместить семена на питательную среду (по 5 шт в каждый стаканчик). Закрывать стаканчик с семенами пленкой, подписать вид растения, дату введения, режим стерилизации (10% 10' или 10% 5').

Поставить культуральные сосуды с семенами в световую комнату или термостат.

Через 2-3 дня в течение последующих 2 недель контролировать состояние культивируемых семян: отмечать появление инфекции, проростков. Сделать выводы об эффективности режимов стерилизации. Заполнить таблицу 3.

*Таблица 3. Условия введения в культуру семян декоративных растений*

Вид растения	Режим стерилизации	Условия культивирования	% инфицированных семян	Всхожесть, %

## Лабораторная работа 5.

### ВЫЧЛЕНЕНИЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ И РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ.

Объяснение. В культуре тканей можно размножать растения и получать оздоровленный (безвирусный) посадочный материал. Для оздоровления растений используют культуру апексов или культуру апикальных меристем, так как в стеблевой апекс вирусы проникают медленнее, чем в другие части растений. При культивировании апексов размножение вирусов подавляется реакцией растительного организма на травму, вызванную отсечением верхушки. Обычно на питательные среды высаживают небольшую часть меристемы до 0,5 мм.

В целом закономерность такова: чем меньше величина меристемы, тем больше вероятность получения безвирусных растений.

Биотехнология позволяет получать безвирусный оздоровленный посадочный материал практически всех сельскохозяйственных культур. Наиболее полно разработана технология получения безвирусного картофеля. Система первичного семеноводства и оздоровления посадочного материала картофеля включает следующие этапы: подготовка клубней для вычленения апикальных меристем, вычленение апикальных меристем, регенерация растений из меристем, адаптация растений-регенерантов в защищенном грунте, получение первой продукции безвирусного материала в открытом грунте, выращивание безвирусного посадочного материала в первичных звеньях семеноводства, сохранение коллекции сортов.

В культуре тканей используются апексы верхушечных и боковых почек. Чтобы исключить влияние метаболитов клубня на проростки и повысить регенерационную способность исходного материала из средней части клубня вырезают глазки с частью паренхимы (1,5 × 1,5 см). Глазки проращивают на песке, предварительно обработанном сухим жаром. Этиолированные проростки выращивают в темноте при температуре  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , влажности воздуха 70-80 %. Песок дважды в день увлажняют, через 7-10 дней проводят подкормку раствором Кнопа.

Апикальные меристемы проростков изолируют на 12-13 пластохроне\*. Изолированные меристемы культивируют в асептических условиях на питательных средах с богатым содержанием макро- и микросолей, с повышенной концентрацией цитокининов (6-БАП 2 мг/л). В культуральной комнате с кондиционированным воздухом поддерживают температуру  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , влажность воздуха 70 %, освещенность 5 кЛх и фотопериод 16 часов.

\* Пластохрон – промежуток времени между инициациями двух листовых бугорков.

В среднем от посадки меристемы на среду до формирования проростков с 5-6 листочками проходит 30-45 дней, в некоторых случаях от 2 до 8 месяцев. Среды по мере истощения обновляют, и проростки периодически пересаживают на новые среды в стерильных условиях.

Материалы и оборудование. Ламинар-бокс, бинокулярный микроскоп МБС-9 или МБС-10, флаконы со стерилизующими растворами, (0,2 % диацид или 70 % спирт), чашки Петри, стерильная дистиллированная вода, стерильные инструменты: пинцеты, препарировальные иглы, скальпели, спиртовка, пробирки со средой.

Ход работы.

1. Поверхность ламинара, штативы, пробирки, микроскоп обработать ультрафиолетом и 96 % спиртом. Руки протереть спиртом. Препарировальные иглы, пинцеты, скальпели поместить в 96 % спирт и перед каждой манипуляцией обжигать на пламени спиртовки.

2. Проростки (2 см) отделить от клубней и поместить в чашки Петри со стерилизующими растворами: в диацид на 3-5 минут, в спирт на 1-2 минуты.

3. Проростки промыть 3 раза стерильной дистиллированной водой и перенести в стерильные чашки Петри.

4. Тонкой препарировальной иглой у проростков удалить все листья, последовательно обнажая верхушечные и боковые меристемы с примордиями.

5. Меристему с 1-2 примордиями отделить от проростков, при этом величина экспланта должна быть не более 100-250 мкм.

6. Экспланты перенести в пробирку на поверхность питательной среды.

7. Пробирки закрыть пробками, поместить в штатив и перенести в культуральную комнату.

8. Результаты зарисовать через 2-4 недели, сделать выводы.

Лабораторная работа 6.  
ПРОЛИФЕРАЦИЯ ПОБЕГОВ И МИКРОЧЕРЕНКОВАНИЕ СТЕРИЛЬНЫХ  
ПРОРОСТКОВ.

Объяснение. Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляют с помощью черенкования. Такое размножение основано на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем при удалении верхушки побега. Из пазушных почек на питательных средах образуются побеги. Растения, сформировавшие 5-6 листочков, в стерильных условиях извлекают из пробирок и разрезают на части (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Черенки высаживают на глубину междоузлия в питательные среды либо без гормонов, либо с добавлением ауксинов.

Черенки культивируют в тех же условиях, что и меристемы: при температуре 24-25°C днем и 19-20°C ночью, освещенности 5-6 кЛх и продолжительности фотопериода 16 часов.

Рост стебля и корней начинается на 3-4 день после посадки на питательную среду, а полностью растения формируются через 12-15 дней.

Каждое последующее черенкование проводят через 14-20 дней. Из одного растения можно получить 5-8 черенков, а через 2-3 месяца – 3-5 тыс. черенков.

Нижнюю часть растения используют для ИФА. Растения, зараженные вирусами, бракуют, а здоровые дают начало мериклонам (меристематическим клонам).

Если почки или черенки высадить на питательные среды с высоким содержанием цитокининов, то образуется конгломерат почек и побегов. Полученные побеги легко отделяются друг от друга, их можно либо укоренить, либо использовать для дальнейшего микрочеренкования.

Материалы и оборудование. Ламинар-бокс, пробирки с проростками, пробирки с питательной средой, скальпели, препарировальные иглы, спиртовка, флакон с 96 % спиртом.

Ход работы.

1. Подготовить ламинар-бокс и инструменты к работе.
2. В ламинаре извлечь стерильные проростки из пробирок.
3. Побеги разделить на микрочеренки (междоузлие с почкой) и посадить в питательную среду на глубину междоузлия.
4. Пробирку закрыть пробкой, поместить в штатив и перенести в культуральную комнату.
5. Результаты зарисовать через 2-4 недели. Сделать выводы о степени пролиферации почек различных сельскохозяйственных культур.

Лабораторная работа 7.  
ИНДУКЦИЯ КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ  
РАЗМНОЖЕНИИ РАСТЕНИЙ.

Объяснение. Для укоренения растений, образовавшихся при микрочеренковании, их необходимо пересадить на новую питательную среду. Черенки и побеги легко укореняются на средах с обедненным составом минеральных солей (среда Уайта, Мурасиге-Скуга, разбавленная вдвое), либо на средах с добавлением ауксинов: ИУК, НУК, ИМК.

Проростки, сформировавшиеся в пробирках со средами, можно рассматривать как небольшие укорененные растения, которые необходимо адаптировать к обычным условиям выращивания. Такие растения лучше пересаживать в грунт, когда полностью сформируются 5-6 листьев и достаточно разрастутся корни. Однако, разные виды культурных растений по-разному приспособляются к изменению условий среды. Каждое растение требует специально подобранных условий культивирования в грунте, которые устанавливают экспериментально.

Материалы и оборудование. Пробирки с проростками, пробирки с питательными средами для индукции корнеобразования: без гормонов и с добавлением ИУК, стерильные инструменты, ламинар-бокс, спиртовки, флакон с 96 % спиртом, вата, стерильные чашки Петри.

Ход работы.

1. В стерильных условиях проростки извлечь из пробирок и стерильным пинцетом перенести в пробирки с питательными средами для укоренения.
2. Пробирки с пересаженными растениями поставить в штативы и перенести в культуральную комнату с освещением 5 кЛх, температурой  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  и влажностью воздуха 70 %.
3. Результаты укоренения оценить через 1-4 недели, сделать рисунки.
4. Укоренившиеся растения перенести в ящики или вегетационные сосуды с торфом и песком (3:1).

Лабораторная работа 8.  
ЭТАПЫ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ.

Объяснение:

Клональное микроразмножение - получение *in vitro*, неполовым путем, генетически идентичных исходному экземпляру растений.

Процесс микроразмножения можно разделить на 4 этапа:

1. Выбор растения-донора, изолирование эксплантов (введение в культуру *in vitro*) и получение хорошо растущей стерильной культуры.
2. Собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов.
3. Укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2°C, +10°C).
4. Выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Для культивирования тканей на каждом из четырех этапов требуется применение определенного состава питательной среды.

*На первом этапе* необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры из первичных эксплантов (семена, апикальные меристемы и др.). Как правило, используют среду, содержащую минеральные соли по рецепту Мурасиге и Скуга, а также различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. Продолжительность первого этапа может колебаться от 1 до 2 месяцев, в результате которого наблюдается рост меристематических тканей и формирование первичных побегов.

*Второй этап* — собственно микроразмножение. На этом этапе необходимо добиться получения максимального количества мериклонов, учитывая при этом, что с увеличением числа пассажей увеличивается число растений-регенерантов с ненормальной морфологией и возможно наблюдать образование растений-мутантов.

Как и на первом этапе, используют питательную среду по рецепту Мурасига и Скуга, содержащую различные биологически активные вещества, а также регуляторы роста. Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. Из цитокининов наиболее часто используют 6-БАП в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов—ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л.

*На третьем этапе*, как правило, меняют основной состав среды: уменьшают в два, а иногда и в четыре раза концентрацию минеральных солей по рецепту Мурасига и Скуга или заменяют ее средой Уайта, уменьшают количество сахара до 0,5—1% и полностью исключают цитокинины, оставляя лишь ауксины. В качестве стимулятора корнеобразования используют β-индолил-3-масляную кислоту (ИМК), ИУК или НУК.

Укоренение микропобегов проводят двумя способами:

- 1) выдерживание микропобегов в течение нескольких часов (2—24 ч) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20—50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка);

2) непосредственное культивирование микропобегов в течение 3—4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1—5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта). В последнее время предложен метод укоренения пробирочных растений в условиях гидропоники. Этот метод позволяет значительно упростить этап укоренения и одновременно получать растения, адаптированные к естественным условиям. Для картофеля возможно использовать безсубстратную гидропонику для получения мини-клубней. Затенение нижней части культуральных сосудов плотной черной материей или добавление в питательную среду активированного угля способствует укоренению микропобегов.

После укоренения растения готовы к пересадке в почвенную смесь.

Цель занятия: познакомиться с этапами и способами клонального микроразмножения растений.

Материалы и оборудование: сосуды со стерильными растениями, пробирки (банки) со свежей питательной средой, стерильные скальпели, пинцеты, бумажные матрасики, спиртовка, спирт, спички, пищевая пленка.

Ход работы:

Один из наиболее распространенных способов размножения в условиях *in vitro* является черенкование растений, основанное на подавлении апикального доминирования. При черенковании необходимо соблюдать строгую стерильность, поэтому все операции проводятся в условиях ламинар-бокса.

Растение, сформировавшее 5-6 листочков, вынуть из пробирки (банки) стерильным пинцетом и поместить на стерильный матрасик. Разрезать побеги стерильным скальпелем на черенки (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Листовые пластинки удалить с частью черешка. Черенки перенести на свежие питательные среды в культуральные сосуды со средой для размножения или укоренения растений. Сосуды с черенками закрыть пищевой пленкой, подписать и поставить на светоэтажерку.

Рост стебля и корней начинается на 3-4 день после посадки на питательную среду, а полностью растения формируются через 12-15 дней.

Каждое последующее черенкование проводят через 14-20 дней. Из одного растения можно получить 5-8 черенков, а через 2-3 месяца – 3-5 тыс. черенков.

## Лабораторная работа 9. КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ.

### Объяснения:

Культура изолированных тканей (*in vitro*) обычно бывает представлена каллусными или реже — опухолевыми тканями. *Каллусная культура* — это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных (неспециализированных) клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т. е. становятся особым образом дифференцированными. *Каллус*, что означает «мозоль», может образовываться как на изолированных кусочках ткани (*эксплантах*) *in vitro*, так и на растении в природе. Для растения *in vivo* каллус – это группа клеток, возникающая при травмах и защищающая место поранения (раневого паренхима). В ней накапливаются питательные вещества для регенерации анатомических структур или утраченного органа.

Каллус, выращиваемый поверхностным способом, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющую строго определенную структуру. Каллусная ткань *in vitro* в основном бывает белого или желтоватого, реже светло-зеленого цвета. Очень редко она может иметь интенсивную зеленую окраску (у мандрагоры). Темно-коричневая окраска чаще всего появляется при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов. Для избавления от этих соединений в питательные среды вносят антиоксиданты.

Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции:

- рыхлой, состоящей из сильно обводненных клеток, легко распадающейся на отдельные мелкие агрегаты;
- средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами;
- плотной, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: *ауксинов* и *цитокининов*. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению, а цитокинины — пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток. Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня (без верхушки) или любой другой растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению. Каждая клетка проходит три фазы роста:

- деление;
- растяжение;
- дифференцировку.

Характерные черты заключительной фазы роста — утолщение вторичной клеточной стенки и потеря клеткой способности к делению. Для того чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т. е. клетки как бы возвратились в

меристематическое состояние. Деление дедифференцированных клеток приводит к анархическому, неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

Каллусную ткань можно получить на искусственных питательных средах, включающих фитогормоны, из различных частей растений: стеблей, корней, тканей клубня, листа, зародыша и др. (рис. 1).

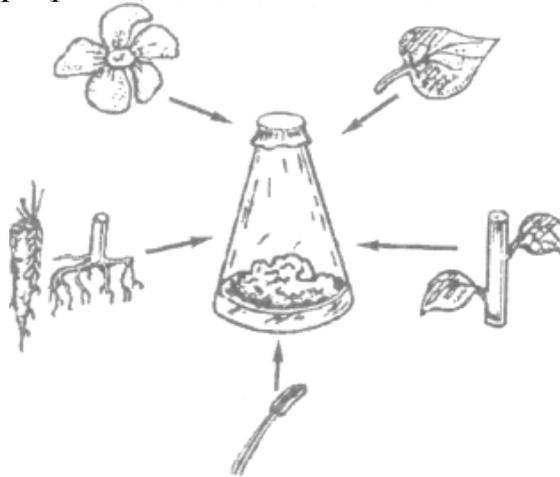


Рис. 1. Получение культуры каллусной ткани из различных эксплантов: сегментов стебля, корня, листа, лепестков, тычинок (по Р. Г. Бутенко, 1999)

Конечным результатом всех работ по культуре растительных клеток и тканей, за исключением тех случаев, когда клеточную суспензию используют для получения веществ вторичного синтеза, является регенерация растений из каллусных клеток. В ее основе лежит вторичная дифференцировка каллусной клетки.

Благодаря присущему клетке свойству *тотипотентности* из каждой каллусной клетки (независимо от того, из какого органа растения был взят эксплант) может регенерировать целое растение. Однако эта потенциальная способность реализуется далеко не всегда. До сих пор не получены растения-регенеранты из одной изолированной клетки (*протопласта*) некоторых бобовых растений и большинства хлебных злаков: пшеницы, ржи, кукурузы и др. (Исключение составляет рис.) Разные генотипы в пределах любого вида растений обладают неодинаковой регенерационной способностью. Поэтому изучение механизма регенерации растений из каллусных клеток, оптимизация состава питательных сред и условий культивирования для индукции морфогенеза являются важнейшими вопросами культивирования изолированных клеток и тканей растений.

Существуют различные типы *морфогенеза*: *соматический эмбриогенез* и *органогенез*, который подразделяют на стеблевой и корневой. При соматическом эмбриогенезе из каллусных клеток формируются биполярные структуры, подобные зародышу, у которых одновременно дифференцируются меристемы корня и стебля. В случае стеблевого органогенеза образовавшийся побег пересаживают на среду с повышенным содержанием ауксинов для дальнейшего укоренения сформировавшихся микропобегов. Если же морфогенез осуществляется по типу корневого органогенеза, то практически не удается получить побеги из корней.

Процесс *вторичной дифференцировки in vitro* зависит от многих факторов, главные из которых следующие:

- генотип (способность каллусных клеток к формированию монополярных и биполярных структур зависит от видовых и сортовых особенностей исследуемых растений)

- возраст (чем моложе эксплант, тем большей морфогенетической активностью обладают каллусные клетки, с увеличением возраста исходного материала, способность каллусной ткани к морфогенезу снижается)

- тип первичного экспланта (стерильные экспланты могут быть получены из корней, листьев, кусочков побегов и др.)

- сезонность изоляции (как правило, большую способность к морфогенезу проявляют клетки и ткани, изолированные в весенне-летний период)

- минеральный состав питательной среды (к примеру, присутствие в питательной среде азота в форме иона  $\text{NH}_4^+$  необходимо для начала морфогенеза, а для роста и развития дифференцированных морфогенных структур необходим азот в нитратной ( $\text{NO}_3^-$ ) форме; аминокислоты, нитрат серебра значительно повышают морфогенетическую активность каллусных клеток)

- баланс экзогенных гормонов (применение экзогенных гормонов и изменение их соотношения и концентраций являются главными факторами, влияющими на морфогенез каллусной ткани: преобладание ауксинов над цитокининами приводит к дифференциации меристематических очагов корня, а преобладание цитокининов над ауксинами – меристематических очагов апекса, дающих начало росту адвентивных побегов)

- условия выращивания (спектральный состав света, температура и другие физические факторы оказывают заметное влияние на морфогенез каллусных тканей: например, дифференциация адвентивных почек в каллусной ткани происходит при ее культивировании на свету с белым или синим спектром, в то время как при использовании света красного спектра в каллусной ткани дифференцируются меристемы корня)

- присутствие сигнальных белков и белков-акцепторов.

Таким образом, для повышения морфогенетического потенциала каллусной ткани необходимо подбирать индивидуальные условия культивирования для каждого исследуемого генотипа, учитывая при этом их наследственные особенности.

Существенное влияние на реализацию морфогенетического потенциала каллусной ткани оказывает число субкультивирований (пересадок) последней в условиях *in vitro*. С увеличением числа пассажей значительно снижается степень морфогенетической активности каллусных клеток.

Продолжительность ростового цикла каллусных клеток 21-28 дней. В процессе культивирования каллус пассируют (пересаживают на свежую питательную среду) каждые 4-6 недель. Масса транспланта (фрагмента ткани, который пассируют на свежую питательную среду) составляет 60-100 мг на 20-40 мл среды.

Цель занятия: Познакомиться с культурой каллусных клеток, с методами получения и культивирования каллусов.

Материалы и оборудование: сосуды с каллусами, сосуды с питательной средой для культивирования каллусов, инструменты: пинцеты, препарировальные иглы, скальпели, флакон с 96 % спиртом, ламинар-бокс, спиртовка.

Ход работы:

Познакомиться с имеющимися каллусными тканями различной консистенции, цвета, морфогенетического состояния.

В асептических условиях ламинар-бокса извлечь каллус из культуральных сосудов и поместить на стерильный бумажный матрасик.

Транспланты величиной 2-5мм поместить на поверхность питательной среды с различным содержанием ауксинов и цитокининов.

Результаты культивирования зарисовать через 2, 4 недели, описать растущие куллусные культуры по морфологическим признакам и заполнить таблицу 3. Взвесить сосуды с каллусами. По результатам взвешиваний через 2,4 недели построить график роста каллуса.

*Таблица 3. Морфологические характеристики каллусной культуры*

<i>Вид растения</i>	<i>Интенсивность каллусообразования</i>	<i>Цвет каллуса</i>	<i>Консистенция</i>	<i>Сырая масса, мг</i>

Результаты зарисовать и занести в таблицу через 2-3 недели.

## Лабораторная работа 10.

### АДАПТАЦИЯ ПРОБИРОЧНЫХ РАСТЕНИЙ К НЕСТЕРИЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ.

#### Объяснение:

Наиболее трудоемким этапом культивирования растений с применением технологии микроклонального размножения растений является переходная стадия из стерильных условий *in vitro* в нестерильные условия *ex vitro*, т.е. стадия адаптации. Адаптация растений к нестерильным условиям является непременным этапом клонального микроразмножения, сочетающим традиционные методы культивирования *ex vitro* и стерильные растения, выращенные *in vitro*.

В силу особенностей технологии микроклонального размножения (стерильность, 100% влажность в культуральных сосудах, доступность питательных веществ) растения, полученные в результате такого размножения, значительно отличаются от растений *in vivo*. Перенос в нестерильные условия, отличающиеся пониженной влажностью воздуха относительно культуральных сосудов, меньшей доступностью питательных веществ, более грубым субстратом, вызывает стресс у растений, последствия которого часто плачевны.

Самый большой выпад происходит в первые недели адаптации. Исследования показали, что немаловажными факторами при посадке регенерантов в условия *ex vitro* являются высота регенерантов, способ перенесения растений из пробирок, сроки высадки, длина корня, качество субстратов и др.

Самое благоприятное время для пересадки пробирочных растений в грунт – это весна-начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой способны адаптироваться к нестерильным условиям выращивания. Почвенный субстрат предварительно стерилизуют сухим жаром при 85...90°C в течение 1...2 ч. Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1). Исключение составляют растения из семейства Орхидные, для которых готовят субстрат, состоящий из сфагнома, смеси торфа, листьев бука или дуба, сосновой коры (1:1:1). Приготовленным заранее почвенным субстратом заполняют пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения регенеранты. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом и влажностью 90%. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают по мере адаптации растений.

Цель занятия: познакомиться с методами адаптации стерильных растений к почвенным условиям выращивания.

Материалы и оборудование: укорененные пробирочные растения, пинцеты, стаканчики с почвенным субстратом, пищевая пленка.

#### Ход работы:

Растения с хорошо развитой корневой системой и листьями осторожно вынимают из пробирки при помощи пинцета. Корни хорошо отмывают от остатков питательной среды (агара) под проточной водой. Растения переносят в стаканчики со

стерильным почвенным субстратом, почву утрамбовывают. Стаканчики с растениями закрывают пищевой пленкой и ставят в световую комнату. Через 1 неделю в пленке, закрывающей стаканчики, проделывают отверстие. Через 2 недели оценивают приживаемость пробирочных растений к нестерильным условиям в %. Результаты записывают в тетрадь.

## Лабораторная работа 11.

### ИНДУКЦИЯ ДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК И РОСТА КЛЕТОК РАСТЯЖЕНИЕМ ПОД ДЕЙСТВИЕМ АУКСИНА И ГИББЕРЕЛЛИНА.

Объяснение. В растении фитогормоны находятся в тесном взаимодействии друг с другом: ИУК индуцирует синтез этилена и цитокининов, ГК увеличивает содержание ИУК, цитокинины усиливают синтез МУК, но снижают содержание свободной АБК, этилен тормозит транспорт ИУК и увеличивает содержание АБК.

В культуре ткани фитогормоны, добавленные в различных пропорциях, регулируют синтез эндогенных гормонов растений, что проявляется в разнообразных морфогенетических реакциях клеток и тканей.

В 1955 г. Скуг и Миллер предложили гипотезу гормональной регуляции в культуре клеток и тканей, которая сейчас известна, как правило Скуга-Миллера: если концентрация ауксинов и цитокининов в питательной среде относительно равны или концентрация ауксинов незначительно превосходит концентрацию цитокининов, то образуется каллус; если концентрация ауксинов значительно превосходит концентрацию цитокининов, то формируются корни; если концентрация ауксинов значительно меньше концентрации цитокининов, то образуются почки, побеги.

Фитогормоны способны изменять проницаемость клеточных мембран. Под действием ауксинов и гиббереллинов усиливается выброс протонов из клетки, что приводит к подкислению клеточной стенки и ослаблению связей между целлюлозными фибриллами в результате частичного кислотного гидролиза пектиновых веществ. Поэтому клеточная стенка становится более эластичной и под действием тургорного давления вакуоли клетка приобретает способность к растяжению.

Материалы и оборудование. Семена пшеницы и тритикале, колбы с дистиллированной водой, 6 % хлорамин, чашки Петри с растворами гормонов, стерильные пинцеты, спиртовки, 96% спирт, ламинар-бокс.

#### Ход работы.

1. Отобрать 30 здоровых семян пшеницы или тритикале.
2. Семена простерилизовать в растворе хлорамина в течение 5 минут.
3. Промыть семена автоклавированной водой 3 раза.
4. Стерильным пинцетом поместить семена в чашки Петри с дистиллированной водой, раствором 2,4-Д (5-10 мг/л), раствором гибберелловой кислоты (2-4 мг/л).
5. Закрыть чашки Петри и поместить в термостат при температуре  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  и влажности воздуха 70 %.
6. Результаты опыта зарисовать через 2-4 недели.

## Минеральная основа MS:

1. Макроэлементы (1 маточный раствор – 100 мл на 1 л)		
Название вещества	Количество вещества	1л маточного раствора 1
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	16,5г	
$\text{KNO}_3$	19г	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7г	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,7г	
2. Микроэлементы (2 маточный раствор – 5 мл на 1 л)		
Название вещества	Количество вещества	0,5л маточного раствора 2
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,62г	
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,69г	
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,41г	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,86г	
KJ	0,083г	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025г	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025г	
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0025г	
3. Хелат железа (3 маточный раствор – 10 мл на 1 л)		
Название вещества	Количество вещества	100 мл маточного раствора 3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,278г	
$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,373г	
4. Другие компоненты		
Название вещества	Количество вещества	Вносятся в среду предварительно растворенными в небольших объемах $\text{H}_2\text{O}$ . Взвешиваются сухими перед приготовлением. Агар растворяется в 400 мл воды на водяной бане.
Мезоинозит	100мг	
Глицин	400 мг	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	170мг	
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	196 мг	
$\text{CaCl}_2$	332мг	
Сахароза	30г	
Агар	6,5г	
5. Витамины		
Название вещества	Количество вещества	Маточные растворы количество на 1л среды
$\text{B}_6$ (Пиридоксин хлорид)	5мл	
$\text{B}_1$ (Тиамин хлорид)	10мл	
PP (Никотиновая кислота)	5мл	
C (Аскорбиновая кислота)	10мл	

Маточные растворы витаминов имеют концентрацию 100мг/л, то есть в 1 мл маточного раствора содержится 0,1мг витамина (приготовление: 10мг на 100мл воды).

#### б. Гормоны

Приготовление гормонов:

ИУК: 10мг ИУК + 0,5мл C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH – в 100мл воды

ИМК: аналогично ИУК

6-БАП: 10мг 6-БАП + 0,5мл HCl – в 100 мл воды

ЦФ: аналогично 6-БАП

Полученные маточные растворы фитогормонов содержат 0,1мг в 1мл

#### Расчет необходимого количества гормонов.

Концентрация гормонов в среде	Количество миллилитров маточного раствора
0,1мг/л	1мл
0,5мг/л	5мл
1мг/л	10мл
5мг/л	50мл

**Примерные вопросы к экзамену по биотехнологии для студентов**

1. Биотехнология – как научная дисциплина. Предмет, история развития, цели и задачи биотехнологии. Обзор сфер применения.
2. Объект биотехнологии.
3. Какие существуют типы клеточного строения.
4. Этапы роста культуры.
5. Что такое селекция и генная инженерия.
6. Биореактор. Строение, принцип работы.
7. Способы культивирования микроорганизмов.
8. Закрытая и открытая системы культивирования.
9. Биоиндустрия ферментов. Что значит иммобилизованные ферменты, как их получают.
10. Технология рекомбинантных ДНК. Нуклеиновые кислоты, их функции.
11. Рестриктаза, ДНК-лигаза, вектор, реципиент, плазида.
12. Полимеразная цепная реакция. Синтез генов с помощью ПЦР.
13. Технология получения трансгенных растений и животных.
14. ГМО: за и против.
15. Результаты и перспективные возможности использования трансгенных животных и растений.
16. Получение трансгенных растений, устойчивых к насекомым – вредителям, вирусам, гербицидам, стрессовым воздействиям.
17. Биотехнологические процессы в пищевой промышленности.
18. Биотехнология получения первичных метаболитов (аминокислоты, нуклеотиды, витамины, коферменты, моносахара)
19. Биотехнология получения вторичных метаболитов (антибиотики, пигменты, токсины).
20. Основы инженерной энзимологии (получение интерферонов, инсулина, гормона роста).
21. Сахарозаменители, их преимущества перед сахаром.
22. Сохранение генофонда высших растений в коллекциях и криобанках.
23. Биотехнология кормовых препаратов.
24. Получение инсулина, соматотропина, интерферонов на основе методов генетической инженерии.
25. Отходы биотехнологических производств, их обезвреживание и утилизация.
26. Основные источники загрязнения воды и качественный состав сточных вод.
27. Способы очистки сточных вод.
28. Что такое аэротенк, его назначение.
29. Очистка газовоздушных выбросов.
30. Методы культивирования *in vitro* клеток и тканей высших растений. Асептика. Питательные среды и физические факторы, оптимальные для культур.
31. Клональное микроразмножение растений и оздоровление посадочного материала.
32. Тотипотентность культивируемых клеток в популяции. Типы дифференцировки. Морфогенез.
33. Отходы биотехнологических производств, их обезвреживание и утилизация.

34. Значение биотехнологии в растениеводстве и селекции растений. Назовите биотехнологические методы ускорения селекционного процесса.
35. Что понимают под микроклональным размножением растений? Назовите основные этапы микроклонального размножения растений.
36. Что понимают под каллусной тканью? Получение каллусной ткани и возможные нежелательные явления.
37. Что представляют собой опухолевые и «привыкшие» ткани.
38. Методы получения протопластов у растений.
39. Назовите основные типы мутаций, индуцированных в условиях *in vitro*.
40. В чем заключается сущность криосохранения.

## ТЕРМИНОЛОГИЯ

*In vitro* – выращивание растительных объектов «в стекле» (пробирке, колбе, биореакторе) на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

*Тотипотентность* – свойство соматических клеток полностью реализовать генетический потенциал целого организма.

*Омнипотентность ядер* – сохранение ядрами соматических клеток растений всех потенций ядра зиготы, то есть сохранение всей генетической информации.

*Культура тканей in vitro* – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений.

*Культура органов in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней, стеблевых апексов, незрелых частей цветка, незрелых плодов.

*Культура корней in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней.

*Культура меристем in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде изолированного апекса или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями.

*Культура суспензионная* или *культура клеток in vitro* – асептическое выращивание отдельных клеток или их небольших групп во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде.

*Культура зиготических зародышей in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде незрелых или зрелых изолированных зародышей.

*Апекс* – верхушечная часть стебля или корня.

*Меристема* – образовательная ткань с мелкими, активно делящимися клетками.

*Апикальное доминирование* – явление подавления роста боковых почек побега в присутствии терминальной почки.

*Адвентивные почки* – почки, возникшие из тканей и клеток растения, обычно их не образующих.

*Фитогормоны* – (гормоны растений) – биологически активные соединения, образующиеся в растениях в малых количествах, вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект.

*Ауксины* – фитогормоны (ИУК, НУК, 2,4-Д), активизирующие рост стеблей и корней, стимулирующие образование корней у проростков.

*Цитокинины* – фитогормоны (кинетин, 6-БАП), активизирующие развитие меристем, стимулирующие образование почек.

*Гиббереллины* – фитогормоны (ГК и др.), активизирующие рост стеблей, вызывающие прорастание семян.

ГК – гибберелловая кислота

ИУК –  $\beta$ -индолилуксусная кислота

НУК –  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

6-БАП – 6-бензиламинопури

*Клональное микроразмножение* или *микрклональное размножение* – получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному (метод вегетативного размножения растений в культуре *in vitro*).

*Эксплант* – фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

*Пролиферация* – новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

*Дедифференциация* – переход специализированных клеток к пролиферации и неорганизованному каллусному росту (утрата клетками специализации).

*Редифференциация* – переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

*Дифференциация* – комплекс процессов, приводящих к различиям между клетками.

*Дифференцировка* – состояние специализации клеток, отличающее их от других.

*Морфогенез in vitro* – процесс формообразования, то есть заложения, роста и развития клеток (цитогенез), тканей (гистогенез) и органов (органогенез) в культуре клеток и тканей in vitro.

*Ризогенез* – процесс заложения, роста и развития корней.

*Регенерация* – восстановление целостного организма из клетки, ткани, органа.

*Эмбриоидогенез* – процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) неполовым путем в культуре тканей и клеток in vitro.

*Каллус* – группа дедифференцированных клеток, возникших in vivo или in vitro путем неорганизованной пролиферации.

*Культура каллусов in vitro* – выращивание в длительной пересадочной культуре каллусов, возникших путем дедифференциации и пролиферации клеток, тканей, органов растений.

*Культура «привыкших» тканей* – выращивание тканей, возникших путем редифференциации или мутации клеток нормальных каллусных тканей, и способных расти на питательных средах без гормонов.

*Трансплант* – часть каллусной ткани, используемая для переноса на свежую питательную среду.

*Инокулюм* – часть клеточной суспензии, используемая для переноса на свежую питательную среду.

*Субкультивирование* – процесс переноса транспланта или инокулюма в культуральный сосуд на свежую питательную среду.

*Цикл выращивания* – период от помещения клеточного инокулюма или каллусного транспланта на питательную среду до последующего субкультивирования.

*Ростовой цикл* – рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризующийся сигмоидальной (S-образной) кривой. Фазы ростового цикла: латентная (лаг-фаза), экспоненциальная (лог-фаза, фаза логарифмического роста), замедления роста, стационарная, деградациии.

*Штамм* – культура, возникшая после первого субкультивирования, и состоящая из многих клеточных линий, возникших из клеток первичного каллуса.

*Линия* – культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

*Клон* – культура, возникшая из одной клетки.

*Клеточная селекция in vitro* – метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.

*Соматоклональные вариации и варианты* – фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органелльных цитоплазматических геномов культивируемых клеток. От истинных генных мутаций отличаются большей частотой

возникновения и комплексностью изменений (изменения в структуре генов, хромосом, геномов).

*Эпигенетические вариации* – фенотипическое выражение дифференциальной активности генов. От мутаций и соматических вариаций отличаются тем, что не сохраняются в цикле клетка-растение-клетка.

*Соматическая гибридизация* – способ создания гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений путем генетической рекомбинации хромосом и генов ядра и органелл вне сексуального цикла, например путем слияния изолированных протопластов.

*Изолированный протопласт* – растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного или механического разрушения.

*Цитопласт* – ограниченный мембраной участок цитоплазмы, возникший при фрагментации изолированного протопласта.

*Субпротопласт* – изолированный протопласт, потерявший часть цитоплазмы, сохранивший ядро.

*Слияние изолированных протопластов* – формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

*Культура изолированных протопластов* – выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризованной среде, содержащей в качестве дополнительного компонента осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации. При регенерации стенок изолированные протопласты превращаются в культуру клеток.

*Соматический гибрид* – растение, полученное путем гибридизации изолированных протопластов.

*Цибрид* – растение, полученное при слиянии изолированного протопласта с цитопластом, протопластом с инактивированным ядром или с энуклеированным протопластом.

*Карิโอтип* – набор хромосом, характерных для данного вида.

*Моноплоид* – ядро, клетка, организм, характеризующиеся основным числом хромосом в полиплоидной серии (символ  $X$ ).

*Гаплоид* – ядро, клетки, организм, характеризующиеся набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду (символ  $n$ ).

*Диплоид* – ядро, клетки, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленным числом, характерным для данного вида (символ  $2n$ ).

*Псевдодиплоид* – ядро, клетки, организм, характеризующиеся диплоидным числом хромосом, отличающиеся от зигот данного вида по кариотипу.

*Полиплоид* – ядро, клетки, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символ  $3X$ ,  $4X$  и т.д.).

*Эуплоид* – ядро, клетки, организм с числом хромосом, кратным  $X$ .

*Анеуплоид* – ядро, клетки, организм с числом хромосом, отклоняющимся от  $X$  и от чисел, кратных  $X$ .

*Мутация* – изменения в генетическом материале клеток путем перестройки ДНК ядер и органелл, изменений в структуре хромосом или уровне ploидности организма.

*Рецессив* – ген или генетически обусловленный признак, проявляющийся в диплоидной клетке или организме при условии, когда оба набора хромосом несут данные гены.

*Доминант* – ген, проявляющийся как признак при условии, когда гомологичные наборы имеют разные гены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бутенко Р.Г. Рост и дифференциация в культуре клеток растений // Рост растений и природные регуляторы – М.: Наука, 1977.
2. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.
4. Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений – Новосибирск: Наука, 1990.
5. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений – Киев: Наукова думка, 1984.
6. Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. – М.: Колос, 2006.
7. Калинин Ф.Л., Бутенко Р.Г. Методы культуры тканей в физиологии растений – Киев: Наукова думка, 1980.
8. Калинин Ф.Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений – Киев: Наукова думка, 1992.
9. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений – М.: Наука, 1983.
10. Лабораторно-практические занятия по сельскохозяйственной биотехнологии: Методические указания / Сост. Г.М. Артамонова, С.И. Герасимова, С.В. Дегтярев, Е.З. Кочиева, Д.В. Калашников, И.К. Блиновский, Л.И. Хрусталева. Под ред. акад. ВАСХНИЛ В.С. Шевелухи. Москва: Изд-во МСХА, 1991.
11. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. – Киев: Наук. думка, 1980.
12. Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве / Сб. науч. трудов ВНИИГиСП – Мичуринск, 1989.
13. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Порофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологий. – М: Наука, 1990.
14. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учебное пособие / Составители: Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б., Гринь Н.А. – С.-П., 2002.
15. Основы микроразмножения редких растений: учебно-методическое пособие / Составители: О. Г. Баранова, О.Н. Дедюхина, Е.А. Китова и др. – Ижевск: Изд-во «Удмуртский университет», 2009.
16. Полевой В.В. Фитогормоны: Учебное пособие. – Л.: Изд-во Ленингр. ун-та, 1982.
17. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro*. – Киев: Наук. думка, 2008.

Малаева Е.В.

# **КУЛЬТУРА РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ**

**ПРАКТИКУМ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ**

*Учебное пособие*

Подписано в печать 14.06.16. Формат 60x84/8. Печать офсетная.  
Бумага офсетная. Гарнитура «Times». Физ. печ. л. 5,75. Заказ 446п