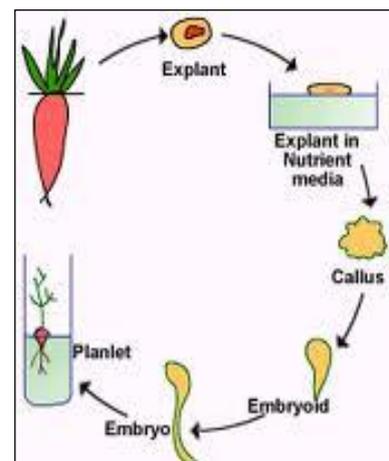
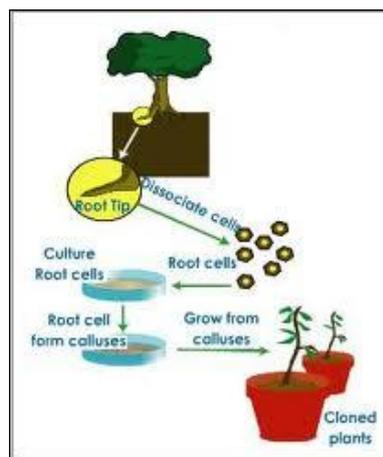
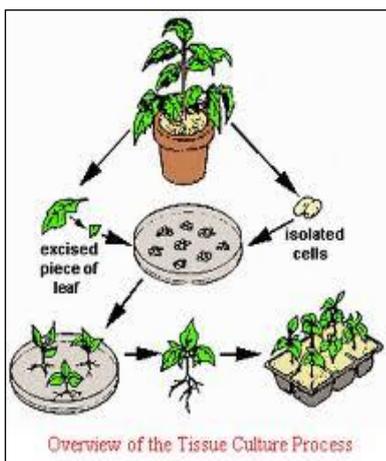


О. А. АВКСЕНТЬЕВА  
В. А. ПЕТРЕНКО

# БИОТЕХНОЛОГИЯ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ: КУЛЬТУРА *IN VITRO*

Учебно-методическое пособие



Харьков – 2011

УДК 602.3:58.086.83:582.4(075.8)

ББК 28.592я73

А 20

**Рецензенты:**

**Комаристая В. П.**, доцент кафедры ботаники и экологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина, кандидат биологических наук

**Задорожная О. А.**, заведующий лабораторией генетики и биотехнологии института растениеводства имени В. Я. Юрьева, кандидат биологических наук

*Рекомендовано Научно-методическим советом Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина (протокол № 1 от «11.11.2010» )*

**А-20 Авксентьева О. А., Петренко В. А. Биотехнология высших растений: культура in vitro – учебно-методическое пособие. – Х. : ХНУ имени В. Н. Каразина, 2011. – 60 с.**

В учебно-методическом пособии рассматриваются основные методы культур in vitro, используемые в биотехнологии высших растений. В основу учебно-методического пособия положена программа специального практикума, который преподается на кафедре физиологии и биохимии растений Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина.

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов и аспирантов биологических факультетов классических и аграрных университетов, а также специалистов, работающих в области биотехнологии растений.

УДК 602.3:58.086.83:582.4(075.8)

ББК 28.592я73

А 20

© О. А. Авксентьева, В. А. Петренко, 2011

© Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, 2011

© Макет обложки И. Н. Дончик, 2011

## СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений .....	5
Введение .....	6
<b>ТЕМА 1. Организация биотехнологической лаборатории.....</b>	<b>7</b>
Работа 1.1. Знакомство с обустройством и организацией работы в биотехнологической лаборатории .....	7
Работа 1.2. Подготовка биотехнологической лаборатории к работе .....	8
Работа 1.3. Работа в ламинарном боксе .....	9
<b>ТЕМА 2. Приготовление искусственных питательных сред для культивирования растительных эксплантов .....</b>	<b>12</b>
Работа 2.1. Приготовление маточных растворов макро- и микросолей, витаминов и фитогормонов .....	13
Работа 2.2. Приготовление агаризированной питательной среды Мурасиге и Скуга (МС) .....	14
<b>ТЕМА 3. Способы стерилизации в биотехнологии .....</b>	<b>17</b>
Работа 3.1. Стерилизация помещений, инструментов и оборудования .....	17
Работа 3.2. Стерилизация растительного материала. Выращивание асептических проростков .....	19
<b>ТЕМА 4. Каллюсная культура .....</b>	<b>22</b>
Работа 4.1. Получение первичного каллюса из асептических проростков .....	22
Работа 4.2. Получение первичного каллюса из листовых эксплантов .....	23
Работа 4.3. Получение первичного каллюса из зрелых зародышей .....	25
Работа 4.4. Субкультивирование (пассирование) каллюсов. Определение прироста каллюсной ткани .....	26
<b>ТЕМА 5. Суспензионная культура .....</b>	<b>29</b>
Работа 5.1. Получение и культивирование суспензии клеток .....	29
Работа 5.2. Подсчет плотности суспензии клеток .....	30
Работа 5.3. Определение степени агрегированности и жизнеспособности суспензионной культуры .....	31

<b>ТЕМА 6. Культура одиночных клеток .....</b>	<b>34</b>
<b>Работа 6.1. Получение клеточных клонов на агаризованных средах методом Плейтинга .....</b>	<b>34</b>
<b>ТЕМА 7. Культура изолированных протопластов .....</b>	<b>36</b>
<b>Работа 7.1. Приготовление ферментных растворов и ферментация тканей .....</b>	<b>37</b>
<b>Работа 7.2. Выделение и очистка изолированных протопластов высших растений .....</b>	<b>38</b>
<b>Работа 7.3. Культивирование изолированных протопластов и регенерация растений .....</b>	<b>40</b>
<b>ТЕМА 8. Культура гаплоидных клеток .....</b>	<b>42</b>
<b>Работа 8.1. Получение каллюсов из пыльников .....</b>	<b>43</b>
<b>Работа 8.2. Андрогенез: получение растений-регенерантов из пыльцевых каллюсов .....</b>	<b>43</b>
<b>ТЕМА 9. Гормональная регуляция в культуре клеток и тканей .....</b>	<b>45</b>
<b>Работа 9.1. Индукция различных путей морфогенеза <i>in vitro</i> каллюсной ткани под действием фитогормонов .....</b>	<b>46</b>
<b>ТЕМА 10. Микрклональное размножение растений .....</b>	<b>49</b>
<b>Работа 10.1. Выделение и культивирование апикальных и пазушных меристем картофеля .....</b>	<b>49</b>
<b>Работа 10.2. Выделение и культивирование апикальных меристем земляники .....</b>	<b>50</b>
<b>Работа 10.3. Пролиферация побегов и микрочеренкование стерильных проростков .....</b>	<b>50</b>
<b>Работа 10.4. Индукция корнеобразования при микрклональном размножении .....</b>	<b>51</b>
<b>Работа 10.5. Оздоровление посадочного материала методом термо- и химиотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем .....</b>	<b>52</b>
<b>Словарь терминов.....</b>	<b>55</b>
<b>Литература .....</b>	<b>59</b>

## Список сокращений

- АБК – абсцизовая кислота  
ГК – гибберелловая кислота  
ИУК –  $\beta$ -индолилуксусная кислота  
ИМК – индолил-3-масляная кислота  
ИПК – индолил-3-пропионовая кислота  
НУК –  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота  
МС – среда Мурасиге и Скуга  
РС – регенерационная среда  
6-БАП – 6-бензиламинопурин  
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксисукусная кислота  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота  
В<sub>1</sub> – тиамин  
В<sub>6</sub> – пиридоксин  
РР – никотиновая кислота  
ФГ – фитогормоны

## ВВЕДЕНИЕ

Под методом культуры клеток и тканей понимают выращивание *in vitro* изолированных клеток, тканей, органов в стерильных условиях на искусственных питательных средах. В последние годы значительно возрос интерес к методам культуры растений *in vitro*. Эти методы используются в фундаментальных исследованиях физиологии, цитологии, генетики, селекции, а также в практическом использовании клеточных технологий. Клетки растений, культивируемые *in vitro*, имеют ряд уникальных особенностей. Во-первых, их можно выращивать в виде неорганизованной клеточной массы (каллюс), которая сохраняет способность синтезировать специфические соединения, присущие растениям *in vivo*. Во-вторых, изолированные клетки можно стимулировать и вызывать образование растений-регенерантов, идентичных исходному растению.



**Схема 1.** Направления применения методов *in vitro* высших растений в фундаментальных и прикладных исследованиях

## ТЕМА 1. Организация биотехнологической лаборатории

### **Работа 1.1. Знакомство с обустройством и организацией работы в биотехнологической лаборатории**

Для организации биотехнологической лаборатории необходимы просторные, изолированные помещения, в которых возможно поддерживать стерильные (асептические) условия, современное оборудование и высококачественные реактивы.

Биотехнологическая лаборатория должна включать:

- моечную комнату;
- комнату для приготовления питательных сред;
- помещение для стерилизации (автоклавирования);
- ламинарный бокс;
- культуральную (световую) комнату.

1) Оборудование *моечной комнаты*: мойки с горячей и холодной водой; дистилляторы и бидистилляторы; сушильные шкафы с режимом работы для сушки посуды – до 100 – 130 °С, для инструментов – до 170 °С; шкафы для хранения чистой посуды и инструментов, ёмкости для хранения моющих средств, вытяжные шкафы с эксикаторами для хромпика ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  98 % +  $\text{K}_2\text{CrO}_7$ ).

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

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

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

5) Оборудование *культуральных (световых) комнат*: световое отделение – источники освещения со спектром, близким к спектру дневного света (от 3 до 10 кЛк), кондиционер для регуляции температуры ( $25 \pm 2$  °С) и влажности воздуха (70 %), стеллажи для штативов с культури-

вируемым материалом; темновое отделение – с тем же оборудованием, исключая источники освещения.

Для культивирования эксплантов в темноте желательно использовать термостаты или хладотермостаты, способные с высокой точностью поддерживать задаваемые режимы температуры и влажности воздуха.

Необходимый набор посуды, инструментов и материалов в биотехнологической лаборатории: мерные колбы, колбы Эрленмейера, химические стаканы, мерные цилиндры, чашки Петри, пробирки, 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 работы:** ознакомиться с организацией работы в биотехнологической лаборатории, освоить режимы работы приборов и оборудования б/т лаборатории, пройти инструктаж по технике безопасности.

**Материалы и оборудование:** сушильный шкаф, термостат, дистиллятор, автоклав.

#### **Ход работы:**

1. Ознакомиться с устройством биотехнологической лаборатории.
2. Под руководством преподавателя освоить принципы работы автоклава, сушильных шкафов, термостата, дистиллятора.
3. Пройти инструктаж по технике безопасности при работе в биотехнологической лаборатории.

#### **Работа 1.2. Подготовка биотехнологической лаборатории к работе**

Все работы с культурой клеток и тканей *in vitro* в биотехнологической лаборатории проводят в стерильных (асептических) условиях в стерильном боксе или ламинар-боксе, стерильными инструментами, в стерильной посуде, на стерильных питательных средах. Чаще всего для стерилизации помещений (боксов для пересадки тканей, культуральных комнат) используют ультрафиолетовое облучение в течение 0,5–2 часов (в зависимости от площади помещения). Облучение ультрафиолетовыми лучами (260 нм) – наиболее часто используется в лабораториях для стерилизации помещений, настольных боксов. При длительном воздействии эти лучи вызывают гибель всех бактерий. Бактерии погибают очень быстро, а споры грибов значительно медленнее. Поэтому в боксах устанавливают бактерицидные лампы БУФ-15 или БУФ-30, которые включаются на 30 минут за 1 час до работы. Кроме того, рекомендуется проводить профи-

лактическое облучение боксов. Работы в облученном помещении начинают через 15–20 минут после отключения бактерицидных ламп, так как под действием ультрафиолетового излучения двухатомный кислород воздуха  $O_2$  становится трехатомным озоном  $O_3$  – газом, токсичным для человека. Для достижения максимальной стерильности перед обработкой УФ все поверхности тщательно отмываются моющими средствами, водой и растворами хлорсодержащих веществ, поверхности ламинар-бокса обрабатывают 70 % спиртом.

**Цель работы:** освоить методы подготовки помещений, материалов, инструментов, оборудования к работе с культурой растительных тканей.

**Материалы и оборудование:** посуда: химические стаканы (50, 100, 250 мл), штативы с пробирками, чашки Петри; инструменты (пинцеты, скальпели, препаровальные иглы), моющие средства (стиральный порошок), хромпик.

#### **Ход работы:**

1. Подготовить помещение к работе – провести тщательную влажную уборку с использованием моющих средств.

2. Прокварцевать помещение в течение 1.5 – 2 ч. Соблюдать технику безопасности! Запрещено заходить (находиться) в помещении во время кварцевания! Нельзя смотреть без защитных очков на лампу! После окончания кварцевания (выключения УФ-лампы) 10–15 минут подождать.

3. Подготовить чистую стерильную посуду и инструменты.

4. 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.

5. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 2 часа при температуре 100 – 130 °С.

6. Стерильную посуду для хранения закрыть ватными пробками, фольгой, целлофаном.

7. Чистые инструменты завернуть в пергаментную бумагу и стерилизовать в сушильном шкафу 2 часа при температуре 100–130 °С.

#### **Работа 1.3. Работа в ламинарном боксе**

Все операции, связанные с разливом питательных сред, пересадкой (пассированием) каллюсов, вычленением эксплантов ведут в специальных комнатах или **ламинарных боксах**, где обеспечиваются стерильные условия работы.

**Ламинарный бокс (ламинар)** – приспособление для работы в стерильных условиях. Асептические условия в ламинаре создаются

с помощью тока воздуха. Ламинарное движение воздуха – движение, при котором струйки воздуха перемещаются параллельно, обтекая препятствие равномерными слоями. Воздух подаётся в ламинар через специальные фильтры, которые очищают его от спор микроорганизмов, частичек пыли и т. д. Ток воздуха, проходя через ламинар, движется к исследователю, что позволяет освобождать внутреннее пространство ламинара от спор микроорганизмов.

**Цель работы:** освоить навыки проведения работ в ламинарном боксе (разлив среды культивирования в чашки Петри, вычленение эксплантов, пассирования каллюсной, суспензионной культур и т. д.).

**Материалы и оборудование:** ламинарный бокс, спиртовка, простерилизованные инструменты и посуда, флакон со спиртом.

#### **Ход работы:**

1. В биотехнологической лаборатории провести влажную уборку с дезинфицирующими агентами.

2. Для надежности стерилизации перед началом работы помещение лаборатории и внутреннее пространство ламинара облучить УФ-лучами (0,5 – 1 ч).

3. Непосредственно перед работой необходимо протереть внутренние поверхности ламинара 70 % раствором этилового спирта, разложить в нем необходимые инструменты и материалы: спирт в закрытой посуде, спиртовку (горелку), спички, простерилизованный инструмент и посуду.

4. Все манипуляции с растительным материалом проводить либо на стерильной поверхности бокса, либо в простерилизованных чашках Петри за пламенем спиртовой горелки.

5. При работе с инструментами необходимо перед каждой манипуляцией помещать их (скальпель, препаровальную иглу, пинцет и т. д.) в стаканчик со спиртом, затем прожигать в пламени горелки. Каждый инструмент для манипуляции используется единожды!!!

6. После окончания работы привести рабочее место в порядок: протереть поверхность бокса моющим средством (или спиртовым раствором). Внутри бокса, кроме стаканчика с инструментами и горелки, ничего не оставлять!

#### **Контрольные вопросы**

1. Что подразумевают под «методами *in vitro*»?
2. Какие направления использования методов *in vitro*?
3. Каково практическое применение технологий *in vitro* высших растений?
4. Какие помещения должна включать биотехнологическая лаборатория?

5. Какие основные принципы работы в биотехнологической лаборатории?
6. Какое оборудование, посуду, инструменты, материалы должна иметь биотехнологическая лаборатория?
7. Что необходимо подготовить для проведения работ с культурой *in vitro*?
8. Какие существуют способы подготовки химической посуды и инструментов для работы в биотехнологической лаборатории?
9. Что такое ламинарный бокс? Как проводят работы в ламинаре?
10. Какие требования техники безопасности необходимо соблюдать для работы в биотехнологической лаборатории?

## ТЕМА 2. Приготовление питательных сред для культивирования растительных клеток и тканей

Питательная среда – основной фактор успешного культивирования изолированных органов, тканей и клеток растений. Основными компонентами питательных сред являются **минеральные соли** (макро- и микроэлементы), **источник углеводного питания** (сахароза), **витамины и регуляторы роста (фитогормоны)**. Иногда в состав питательных сред входят органические добавки (гидролизат казеина, кокосовое молоко, дрожжевой экстракт, эндосперм кукурузы). Среды по консистенции бывают **твердыми или агаризованными**, и **жидкими**, в зависимости от цели исследования. Для приготовления твердых питательных сред используется агар-агар. Питательные среды содержат железо в хелатированной форме, которая обеспечивает его доступность растению. Большинство тканей, культивируемых *in vitro*, способны синтезировать все необходимые для жизнедеятельности витамины. Но на первом этапе – при введении в культуру, обязательно добавлять витамины. Для регуляции дифференциации и морфогенеза необходимы регуляторы роста. Подбирая соотношение и концентрацию этих веществ, можно направленно регулировать их органогенное действие.

Культуры растительных тканей не автотрофны в отношении углеводного питания и их необходимо выращивать на питательных средах, которые содержат сахара. Самым оптимальным источником углеводного питания для большинства тканей является сахароза в концентрации 2–5 %.

Значение рН среды влияет на стойкость и усвояемость ряда составляющих. Значение рН большинства растительных тканей лежит в пределах от 5,0 до 7,0. Величину рН среды перед автоклавированием доводят до 6,5–7,0, потому что в дальнейшем она немного уменьшается в результате образования сахарных кислот во время автоклавирования.

Для удобства и ускорения процесса приготовления питательной среды целесообразно заранее приготовить концентрированные (**маточные**) растворы макро- и микросолей, витаминов и регуляторов роста.

Для приготовления маточных растворов каждую соль взвешивают и растворяют отдельно в новой порции дистиллированной воды. Растворы хранят в холодильнике при 2–4 °С в посуде из темного стекла не дольше 4–6 недель. Растворы витаминов и фитогормонов готовят в концентрации 1 мг/мл. Растворяют в дистиллированной воде и хранят в замороженном состоянии в морозильной камере. Углеводы и органические добавки взвешивают и добавляют непосредственно в среду.

После добавления в среду всех компонентов добавляют воду до нужного объема и доводят рН раствора до определённого значения.

Существует огромное разнообразие питательных сред для культивирования растительных клеток, тканей и органов в условиях *in vitro*. Наиболее известные, универсальные и часто используемые: среда Мурасиге и Скуга (МС) и ее модификации, среда Гамборга — среда В 5, среда Блейдза, среда Уайта, среда Шенка-Хильденбранта (ШХ) и др.

Для введения нового растительного объекта в культуру *in vitro* или для проявления различных путей морфогенеза *in vitro* необходимо эмпирически подбирать состав питательной среды.

### **Работа 2.1. Приготовление маточных растворов макро- и микросолей, витаминов, гормонов для среды Мурасиге и Скуга (МС)**

Маточные растворы макросолей готовят в концентрациях в 10 раз превышающих необходимые. Хранят в стерильной посуде или в замороженном состоянии. Маточные растворы микроэлементов готовят в концентрациях, которые в 100 раз превышают необходимые, из расчета, чтобы в 1 мл маточного раствора содержалась масса вещества, необходимая для приготовления 1 л среды. Для приготовления маточных растворов каждую соль взвешивают и растворяют отдельно в новой порции дистиллированной воды.

Растворы витаминов готовят в концентрации 1 мг/мл. Растворяют в 10 мл дистиллированной воды.

Растворы фитогормонов готовят следующим образом:

- цитокинины (кинетин, зеатин, БАП) сначала растворяют в небольшом количестве 1 н раствора щелочи или кислоты;
- ауксины (ИУК, НУК, 2,4-Д) – в капле этанола, подогревают и добавляют соответствующий объем дистиллированной воды;
- гиббереллины растворяют в дистиллированной воде. Концентрация растворов 1 мг/мл .

Растворы витаминов и фитогормонов разливают по 10 мл и хранят в замороженном виде в морозильной камере.

**Цель работы:** приготовить маточные растворы макро- и микросолей, витаминов, фитогормонов, Fe-хелата.

**Материалы и оборудование:**  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , спирт, 1 н  $\text{HCl}$  и 1 н  $\text{KOH}$ , весы, магнитная мешалка, шпатели, лабораторная посуда – стакан или колба объемом 1 л, мерные цилиндры 500 мл, 100 мл, мерные пипетки – 5 мл, 1 мл, посуда из темного стекла – 1 л, 100 мл, 50 мл, 25 мл.

Для хранения растворов макросолей, микросолей, фитогормонов и витаминов желательно использовать стерильную посуду.

#### Ход работы:

1. Приготовить 5 растворов макро- (по 1 л) и 7 растворов микросолей (по 100 мл), необходимых для приготовления питательной среды Мурасиге и Скуга (МС).

Макросоли:		Микросоли:	
1. $\text{NH}_4\text{NO}_3$	16.5 г	1. $\text{H}_3\text{BO}_3$	620 мг
2. $\text{KNO}_3$	19.0 г	2. $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2230 мг
3. $\text{CaCl}_2$	3.3 г	3. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860 мг
4. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.7 г	4. $\text{KI}$	83 мг
5. $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.7 г	5. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25 мг
		6. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2.5 мг
		7. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5 мг

Для приготовления маточных растворов каждую соль взвешивают и растворяют отдельно в новой порции дистиллированной воды. Взвесить указанное количество макросолей и растворить каждую в 1 л дистиллированной воды. Взвесить необходимое количество микросолей и растворить каждую в 100 мл дистиллированной воды. Хранить в холодильной камере при  $2 - 4^\circ\text{C}$  в течение месяца.

2. Приготовить раствор Fe-хелата:

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  557 мг;

$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  745 мг

Навески растворить отдельно в дистиллированной воде, слить и довести до кипения. Охладить, хранить в темной посуде в холодильнике при температуре при  $2 - 4^\circ\text{C}$ .

3. Приготовить растворы фитогормонов по 10 мл (ИУК, 2,4 -Д; кинетин, БАП) в концентрации 1 мг/мл. Хранить в замороженном виде.

4. Приготовить растворы витаминов РР, В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> по 10 мл в концентрации 1 мг/мл. Хранить в замороженном виде.

#### **Работа 2.2. Приготовление питательной среды Мурасиге и Скуга (МС)**

**Цель работы:** приготовить питательную среду МС и простерилизовать ее автоклавированием.

**Материалы и оборудование:** маточные растворы макро- и микросолей, Fe-хелата и витаминов, мезо-инозит, сахароза, агар, 1 н HCl и 1 н КОН, весы, шпатели, магнитная мешалка, рН-метр, автоклав, стакан или колба объемом 1 л, мерные цилиндры – 500 мл, 100 мл, мерные пипетки – 5 мл, 1 мл, ватные пробки или фольга.

### Ход работы:

Для приготовления 1 л среды Мурасиге-Скуга (МС) необходимо взять:

Макросоли МС	100 мл (каждого маточного раствора)
Микросоли МС	1 мл (каждого маточного раствора)
Fe-хелат	5 мл
Мезоинозит	100 мг
В <sub>1</sub>	1 мг (1 мл маточного раствора)
В <sub>6</sub>	1 мг (1 мл маточного раствора)
РР	0,5 мг (0,5 мл маточного раствора)
Сахароза	30 г
Агар-агар	7 г

**Таблица 1. Состав питательной среды Мурасиге-Скуга (МС) для культивирования растений *in vitro***

Компоненты среды	Количество на 1 л	
	Среда для асептических проростков	Среда для индукции первичного каллюсогенеза
Маточные растворы макросолей	100 мл	100 мл
Маточные растворы микросолей	1 мл	1 мл
Fe-хелат	5 мл	5 мл
Витамины: РР	0,5 мг	0,5 мг
В <sub>1</sub>	1 мг	1 мг
В <sub>6</sub>	1 мг	1 мг
Мезоинозит	100 мг	100 мг
ФГ: НУК	-	2 мг
ИУК	-	2 мг
2,4-Д	-	2 мг
Кинетин	-	1 мг
БАП	-	1 мг
Сахароза	30 г	30 г
Агар-агар	7 г	7 г

1. Колбу или стакан объёмом 1л поместить на магнитную мешалку, налить 50-100 мл дистиллированной воды и добавить необходимый объем макро- и микросолей, Fe-хелата, витаминов и фитогормонов (если входят в состав среды).

2. Взвесить необходимое количество мезоинозита, сахарозы. Каждую навеску растворить в отдельной порции воды и добавить к смеси.

3. Довести рН до 6,6–6,8 с помощью раствора 1н КОН или раствора 1н НСl.

4. Навеску агара поместить в термостойкую колбу или стакан, залить холодной водой (50-100 мл), оставить на 20 минут для набухания и нагреть, постоянно помешивая до полного растворения агара.

5. Добавить растворенный агар-агар к раствору среды МС и довести до нужного объема (1 л) дистиллированной водой. Среду подогреть до полного растворения всех компонентов.

6. Разлить теплую среду в колбы или пробирки и закрыть ватными пробками или фольгой.

*Объем среды в колбе для автоклавирования не должен превышать 1/2 – 2/3 объема колбы.*

7. Простерилизовать среду в автоклаве при давлении 0,8 – 1 атм (температура 115 – 120 °С) в течение 20 – 30 минут.

### **Контрольные вопросы**

1. Какие основные принципы составления питательных сред для культур растений *in vitro*?

2. Какие наиболее известные и часто употребляемые среды Вы знаете?

3. Чем отличаются по составу твердые и жидкие среды? Для каких целей их используют?

4. Перечислите обязательные компоненты сред?

5. Каковы особенности углеводного питания растений в условиях *in vitro*?

6. Каковы особенности азотного питания растений в условиях *in vitro*?

7. Какие органические добавки используют в составе сред культивирования?

8. Какие БАВ и для каких целей вводят в состав сред?

9. Какие витамины используют?

10. Какие фитогормоны используют?

11. Для чего используют безгормональные среды?

12. Какие синтетические ростстимулирующие вещества используют?

13. Для чего готовят маточные растворы?

14. Как вносят железо в состав среды культивирования?

15. Как готовят маточные растворы макро-, микросолей, витаминов и фитогормонов?

### ТЕМА 3. Способы стерилизации в биотехнологии

#### **Работа 3.1. Стерилизация помещений, оборудования, инструментов и материалов**

**Стерилизация** – полное уничтожение микроорганизмов и их покоящихся форм (например, спор). В случае нарушения условий стерильности в биотехнологической лаборатории на средах хорошо развиваются микроорганизмы (грибы, бактерии), нарушающие состав среды и подавляющие рост растительных эксплантов.

Существуют разные **методы стерилизации**:

- влажным паром (автоклавирование);
- сухим паром, (сухо-жаровой шкаф);
- облучение ультрафиолетовыми лучами (кварцевание, см. стр. 6);
- обработка химическими веществами (спирт, серная кислота, перманганат калия, хлорамин и т. д.);
- стерилизация обжиганием в пламени горелки;
- стерилизация кипячением.

**Стерилизация помещений и оборудования** (см. стр. 6)

**Стерилизация посуды.** Большинство культур в лабораторных условиях выращивают в пробирках, колбах Эрленмейера различного объема и чашках Петри одно- или многоразового использования. Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов, а также раствора двухромовокислого калия в серной кислоте (хромпика). Вымытую посуду ополаскивают водопроводной, затем дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения стерильных предметов из воздуха, *перед стерилизацией* их закрывают ватными пробками, заворачивают в оберточную (пергаментную) бумагу или закрывают фольгой (у стаканов, колб достаточно завернуть только горлышко). При *сухом способе стерилизации* чашки Петри, колбы, стаканы, завернутые в плотную бумагу, стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 140 °С в течение 2 часов, при температуре 180 °С – 30 минут. При более высоких температурах ватные пробки буреют, а бумага становится ломкой.

**Стерилизация инструментов.** Инструменты (скальпели, пинцеты, иглы и т. д.) стерилизуют в сушильном шкафу. Шприцы, ножницы, пробочные сверла удобнее кипятить. Металлические предметы нельзя автоклавировать: под воздействием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в процессе её инструменты помещают в стакан со спиртом и обжигают в пламени спиртовки.

Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции! Перед повторным употреблением его снова окунают в спирт и обжигают в пламени спиртовки.

**Стерилизация материалов.** Вату, марлю, ватные пробки, фильтровальную бумагу, халаты, косынки стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм в течение 25–30 мин.

### **Стерилизация питательных сред.**

**Автоклавирование** – обработка влажным паром под давлением, производится в автоклавах. Вегетативные клетки бактерий и грибов гибнут через 5–10 минут уже при температуре около 60 °С; для гибели спор дрожжей и грибов требуется температура 120 °С в течение 15 минут. Продолжительность автоклавирования зависит от величины (теплоемкости) пробирок, колб и объема питательной среды в них.

Автоклавирование питательных сред для выращивания культур тканей проводят *после их разлива* в пробирки или колбы под давлением 0.7 – 0.8 атм при температуре 115 – 120 °С в течение 15 – 30 минут, в зависимости от объема среды. Если в результате стерилизации среда помутнела, следовательно, был неправильно выбран режим стерилизации.

Посуду, халаты, вату, бумагу, дистиллированную воду, питательные среды стерилизуют в автоклавах под давлением пара 1-2 атмосферы и температурой 120 °С в течении 20–60 мин, в зависимости от объёма стерилизуемого материала.

Колбы, штативы со средой, вату, бумагу, халаты перед автоклавированием заворачивают в целлофановую бумагу, либо помещают в биксы.

**Цель работы:** ознакомиться и освоить методы стерилизации, применяемые в биотехнологической лаборатории; простерилизовать посуду, материалы, инструменты, питательную среду.

**Материалы и оборудование:** чашки Петри, колбы с дистиллированной водой, штативы с пробирками, заполненными питательной средой, препаровальные иглы, пинцеты, скальпели, вата, марля, бумага: фильтровальная и пергаментная.

### **Ход работы:**

1. Металлические инструменты завернуть в плотную бумагу и поместить в сушильный шкаф для стерилизации сухим жаром при  $t$  170–200 °С в течение 2 часов.

2. Чашки Петри, штативы с пробирками, заполненными питательной средой, вату, марлю, фильтровальную бумагу, колбы с дистиллированной водой (закрытые фольгой) завернуть в пергаментную бумагу и поместить в автоклав.

3. Автоклав привести в рабочее состояние: закрыть плотно крышку, воду залить до метки. Включить автоклав, давление пара довести до метки 1,2 атм. (в паровой камере), заполнить паром стерилизационную камеру, вытеснить конденсат в течении 10 минут, при этом давление пара в стерилизационной камере должно быть на уровне 0,1–0,2 атм. Довести давление в стерилизационной камере до 1 атм., включить автоматический режим.

4. Автоклавировать 20 минут при давлении в стерилизационной камере 1–1,2 атм.

5. Отключить автоклав, вытеснить пар из обеих камер довести давление до 0 атм. **Внимание!!! Проводить автоклавирование может только сотрудник кафедры, имеющий разрешение на работу с автоклавом. Студентам категорически запрещается работать с прибором!!!**

6. Проавтоклавированные материалы перенести в комнату для пересадки тканей и поместить в шкафы или на стеллажи.

### **Работа 3.2. Стерилизация растительного материала.**

#### **Выращивание асептических проростков**

Основное условие выращивания *in vitro* растительных клеток, тканей и органов – это стерильность. Но поверхностные ткани органов растений инфицированы эпифитными бактериями, грибами и их спорами. В связи с этим первым шагом для получения изолированных клеток, тканей и органов растений является **стерилизация растительного материала**. Как правило, режим стерилизации устанавливают экспериментально для каждого объекта. Но существуют общие правила, которых следует придерживаться.

Для стерилизации используют широкий спектр разных стерилизующих веществ: хлорамин, «белизна»; ртутные препараты – сулема, диацид; окислители – перекись водорода, перманганат калия. Правильный выбор стерилизующего вещества заключается в том, чтоб нейтрализовать эпифитную микрофлору и не повредить ткани растения. Кроме того, вещество не должно глубоко проникать в ткань и должно легко вымываться. Растительные ткани после стерилизации необходимо трижды промыть в стерильной дистиллированной воде по 10–20 минут каждый раз.

**Цель работы:** подобрать концентрацию стерилизующего раствора и время стерилизации семян, которые обеспечат наивысшую эффективность этого процесса. Простерилизовать семена и вырастить из них асептические проростки.

**Материалы и оборудование:** 70 % раствор этилового спирта, стерильная вода, «белизна», стаканчики для стерилизующих растворов, семена сои, пшеницы и др. культур, пробирки со стерильной безгормональной средой МС, инструменты, ламинарбокс.

**Ход работы:**

1. Приготовить раствор белизны разной концентрации – 1 : 1, 1 : 2, 1 : 3, 1 : 4 (растворы используются однократно и готовят непосредственно перед употреблением).
2. В марлевые мешочки поместить по 10 – 20 семян исследуемых растений.
3. Промыть семена мыльным раствором.
4. Мешочки с семенами погрузить в стаканчики с 70 %-ным этанолом на 1 – 2 минуты.
5. Стерильным пинцетом перенести мешочки в стаканчики соответствующей концентрации стерилизующего раствора и выдержать соответствующее время (см. таблицу).
6. Простерилизованные семена промыть стерильной дистиллированной водой – 3 раза по 10 минут.
7. В ламинарбоксе стерильным пинцетом перенести семена на безгормональную питательную среду в пробирки.
8. Пробирки соответственно подписать и поместить в термостат (люминестат) при температуре 26 °С на неделю.
9. Через 5–7 суток проанализировать чистоту посева и всхожесть семян.
10. Результаты представить в виде таблицы.
11. Определить наиболее эффективные условия стерилизации семян.
12. Сделать соответствующие выводы.

Разведение раствора белизны	Время стерилизации, мин	Кол-во семян, шт.	Кол-во инфицированных семян		Всхожесть семян		Эффективность стерилизации, %
			шт.	%	шт.	%	
1:1	10						
	20						
1:2	10						
	20						
1:3	10						
	20						
1:4	10						
	20						

Всхожесть семян в процентах рассчитывают как отношение количества проросших семян к общему числу посаженных, умноженное на 100 %.

Эффективность стерилизации рассчитывают как отношение количества проросших, не поврежденных инфекцией семян к общему количеству семян, посаженных на безгормональную среду. Выражают в процентах (%).

### **Контрольные вопросы:**

1. Какие методы стерилизации используют при работе в биотехнологической лаборатории?
2. Что такое стерилизация и какие существуют виды стерилизации?
3. Как проводят стерилизацию помещений?
4. Как стерилизуют материалы и инструменты?
5. Какими способами можно стерилизовать посуду?
6. Чем отличается стерилизация сухим и влажным паром?
7. Для чего проводят стерилизацию растительного материала?
8. Какие вещества используют для стерилизации семян?
9. Для чего необходимо подбирать режим стерилизации растительного материала?
10. Для чего используют аспетические проростки в методах культуры растительных клеток и тканей?

## ТЕМА 4. Каллюсная культура

Для растения *in vivo* каллюс – это группа клеток, возникающая при травмах и защищающая место поранения (раневого паренхима). В ней накапливаются питательные вещества для регенерации анатомических структур или утраченного органа.

Каллюс в условиях *in vitro* представляет собой ткань, состоящую из дедифференцированных клеток, характеризующихся постоянным неорганизованным ростом и пролиферацией.

На питательных средах с большим содержанием ауксинов или их синтетических аналогов клетки экспланта дедифференцируются и переходят к пролиферации. Клетки утрачивают прежние функции и морфологию. Причем, чем меньше структурно и химически дифференцирована клетка, тем легче получить каллюс.

Каллюсные ткани способны образовываться практически из любой части растения: из асептически проросшего семени, отрезков стеблей и корней, изолированной паренхимы корнеплода, изолированной сердцевины стеблей, из тканей, которые содержат камбий (стебель и корень), из листьев, органов цветка, зародышей, плодов.

Каллюс, выращиваемый поверхностным способом, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющих строго определенной структуры. Клетки каллюса либо бесцветны, либо имеют желтоватый или зеленоватый оттенок. В зависимости от происхождения, условий культивирования и плотности каллюсных тканей различают каллюсы:

- 1) рыхлые, с сильно оводненными, легко отделяющимися друг от друга клетками;
- 2) средней плотности, с зонами меристематической активности;
- 3) плотные, с зонами редуцированного камбия и сосудов.

### **Работа 4.1. Получение первичного каллюса из асептических проростков**

В биотехнологии для образования первичной каллюсной ткани принято использовать экспланты, полученные либо из непосредственно выращенного в естественных условиях растения, либо из асептических проростков. Последние получают путем проращивания стерильных семян в пробирках с питательной средой (см. работу 3.2). В дополнительной стерилизации экспланты, отобранные из незагрязненных инфекцией пробирок, не нуждаются.

**Цель работы:** освоить технику выделения экспланта из асептических проростков и получить первичную каллюсную ткань.

**Материалы и оборудование:** асептические растения, чашки Петри со стерильной средой для индукции первичного каллюса (с содержанием 2,4-Д), инструменты (пинцеты, препаровальные иглы, лезвия), ламинарный бокс.

**Ход работы:**

1. Из асептических растений, полученных через 5–7 дней после посадки на питательную среду, необходимо отобрать только чистые, лишенные инфекции, проростки.
2. В ламинар-боксе стерильным пинцетом достать растение из пробирки и поместить на поверхность стерильной чашки Петри.
3. Поддерживая растение пинцетом, скальпелем разрезать его на экспланты: стебель, листья, корни, гипокотили, эпикотили, мезокотили и т. д. размером по 5–10 мм.
4. Экспланты поместить в чашки Петри со средой для индукции каллюсогенеза по 5–10 штук в каждую чашку.
5. Чашки Петри маркировать (подписать) с обязательным указанием состава среды культивирования, даты пассажа, объекта, типа экспланта и т. д.
6. Чашки с растительным материалом культивировать в термостате при температуре 26 °С.
7. Через 2–4 недели провести оценку частоты каллюсообразования на эксплантах.
8. Результаты оформить в виде таблицы.
9. Сделать соответствующие выводы.

Объект, тип экспланта	Общее кол-во эксплантов	Кол-во эксплантов, образовавших каллюс	
		шт.	%

**Работа 4.2. Получение первичного каллюса из листовых эксплантов интактного растения**

Экспланты листьев большинства видов в условиях *in vitro* способны к образованию каллюса в раневой зоне. Культуру клеток листа используют также для размножения некоторых видов растений. Для культивирования листьев большинства растений, как правило, используют среду Мурасиге-Скуга, Уайта, Эйлера, Гамборга (В5).

**Цель работы:** освоить методы стерилизации и посадки листового материала на питательную среду, получить каллюсные ткани и определить эффективность процесса для этого типа эксплантов.

**Материалы и оборудование:** объекты – растения сои, томатов, пшеницы либо листья комнатных растений (нежелательно использовать растения с сильно опушенными листьями, т. к. этот фактор значительно усложняет процесс стерилизации); растворы «белизны» разной концентрации, колба со стерильной дистиллированной водой, 70 % этанол, чашки Петри со стерильной питательной средой для индукции каллюсогенеза, стерильные чашки Петри с фильтровальной бумагой, пинцеты, скальпели, спиртовка, ламинарный бокс.

**Ход работы:**

1. Листья промыть в проточной воде и выдержать 1 – 2 мин в мыльном растворе, промыть проточной, а потом дистиллированной водой.

2. Простерилизовать 10 – 20 сек в 70 %-ном этаноле, после чего промыть в дистиллированной воде.

3. Затем листья поместить в стерилизующий раствор «белизны» соответствующей концентрации на необходимое время, после чего промыть стерильной дистиллированной водой 3 раза.

Объект (тип экспланта)	Концентрация раствора «Белизны»	Длительность стерилизации (мин)	Общее количество эксплантов	Кол-во асептических эксплантов через 7 дней		Кол-во эксплантов, образовавших каллюс	
				штук	%	штук	%
	1:4	10					
		15					
		30					
	1:3	10					
		15					
		30					
	1:2	10					
		15					
		30					
	1:1	10					
		15					
		30					

4. Для подсушивания стерильным пинцетом перенести растительный материал в стерильную чашку Петри со стерильной фильтровальной бумагой.

5. Стерильным скальпелем разрезать лист на участки площадью не более 1 см<sup>2</sup>.

6. На листовых эксплантах сделать стерильным лезвием или скальпелем разрезы вдоль жилок листа – для индукции раневого каллюса.

7. Поместить экспланты на питательную среду (перед каждой манипуляцией инструменты обрабатывать спиртом и обжигать в пламени спиртовки).

8. Чашки Петри с эксплантами перенести в термостат для индукции каллюсогенеза при температуре  $25 \pm 2$  °С.

9. Через 4 – 7 дней определить оптимальные условия стерилизации. Жизнеспособность культуры оценить через 25 – 30 дней: по периметру или вдоль надрезов жизнеспособного экспланта образуется каллюс.

10. Результаты оформить в виде таблицы. Сделать выводы.

### ***Работа 4.3. Получение каллюса из зрелых зародышей***

Эксплантом для индукции первичного каллюсогенеза может быть любой орган растения. Однако максимально легко вводятся в культуру меристематические ткани. Поэтому прорастающие семена, где в растущем зародыше все ткани представлены меристематическими, часто используют для получения первичных каллюсных тканей.

**Цель работы:** освоить методы стерилизации данного вида экспланта, овладеть техникой выделения зрелых зародышей, получить каллюс, оценить эффективность процесса каллюсогенеза.

**Материалы и оборудование:** ламинар-бокс, чашки Петри с питательной средой (МС с концентрацией 2,4-Д – 2мг/л), семена пшеницы, инструменты: препаровальные иглы, пинцеты, скальпели, стерильная бумага, раствор «белизны» 1:2, стерильная дистиллированная вода, спиртовки, 70 % спирт.

#### **Ход работы:**

1. Отобрать необходимое количество семян и поместить их в марлевые мешочки.

2. Погрузить их в мыльный раствор на 5–10 минут, затем тщательно промыть в проточной воде.

3. Затем 2 минуты простерилизовать в стаканчике с 70 %-ным этанолом и снова промыть в проточной воде.

4. После этого поместить в раствор «белизны» на 20 минут, после чего промыть в трех порциях стерильной воды по 5 минут в каждой.

5. Мешочки с промытыми семенами стерильным пинцетом перенести в стерильную чашку Петри, развернуть, равномерно распределить по поверхности чашки.

6. Покрыть семена до середины стерильной водой и на сутки поместить в термостат при температуре  $25 \pm 1$  °С.

7. Через 30–36 ч семена достать из термостата, снова поместить в мешочки и повторно простерилизовать в растворе «белизны»

(разведение 1:5), затем промыть в нескольких порциях стерильной воды. **Все операции проводить в ламинарном боксе!**

8. Затем стерильным пинцетом извлечь каждую зерновку и лезвием вырезать зародыш.

9. Перенести зародыш в чашку Петри с питательной средой для каллюсогенеза (МС с 2,4-Д концентрацией 2 мг/л), по 5–10 эксплантов на чашку.

10. Чашки Петри поместить в термостат с температурой  $25 \pm 1$  °С.

11. Зарисовать каллюсы через 2-4 недели, сделать выводы о морфологии каллюсов.

12. Результаты эффективности каллюсогенеза оформить в виде таблицы.

Объект, № чашки	Общее кол-во эксплантов	Кол-во эксплантов, образовавших каллюс	
		штук	%

13. Сделать соответствующие выводы.

#### ***Работа 4.4. Субкультивирование (пассирование) каллюсов. Определение прироста каллюсной ткани***

В цикле выращивания каллюсные клетки после ряда делений проходят обычный онтогенез: растут растяжением, дифференцируются и деградируют (отмирают). Рост каллюса отражает S-образная кривая. Ростовый цикл начинается с посадки экспланта на среду (начало культивирования), а завершается в момент прекращения митозов (стационарная фаза).

В лаг-фазе (латентной фазе) клетки не делятся, не увеличиваются в размере, имеют низкую метаболическую активность. В экспоненциальной фазе (фазе логарифмического роста) клетки активно делятся митозом. В ранней экспоненте увеличивается количество митохондрий (синтезируется АТФ), рибосом, всех видов РНК, синтезируются белки, активизируется метаболизм, интенсивно поглощается кислород. Поздняя экспонента, или фаза латентного роста, характеризуется снижением удельной скорости роста, замедлением клеточного деления, увеличением среднего размера клеток за счет растяжения. В стационарной фазе размер клеток продолжает увеличиваться, а их деление прекращается. В поздней стационарной фазе (фаза деградации) за счет истощения среды клетки стареют и умирают. Продолжительность ростового цикла каллусных клеток составляет 21–28 дней.

В процессе культивирования каллюс 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. Среда для индукции первичного каллюсогенеза и культивирования пересадочной каллюсной культуры отличается по содержанию фитогормонов. Т. к. каллюсные клетки в пересадочной культуре способны самостоятельно синтезировать ауксины, их содержание в среде культивирования уменьшают.

Рост каллюсной ткани можно определить по многим критериям:

- 1) биомасса (сырая/сухая);
- 2) площадь;
- 3) число клеток в единице массы;
- 4) размер клеток каллюсных тканей;
- 5) метаболическая активность – синтез белка и т. д.

**Цель работы:** освоить технику пересадки (субкультивирования) каллюсных тканей (пассирования), оценить скорость прироста каллюса разными методами, построить кривую роста каллюса.

**Материалы и оборудование:** чашки с каллюсами, чашки с питательной средой для субкультивирования каллюсов, инструменты: пинцеты, препаровальные иглы, флакон с 96 % спиртом, ламинар-бокс, спиртовка, весы.

#### **Ход работы:**

1. В асептических условиях извлечь каллюсы из пробирок (чашек Петри) и поместить на стерильную поверхность (столик ламинар-бокса, обработанный 96 % спиртом и УФ-излучением).

2. Стерильной препаровальной иглой разделить каллюс на транспланты, стараясь выделить зоны меристематической активности (белые мелкие клетки).

3. Транспланты величиной 2-3 мм (60–100 мг) поместить на поверхность чашки с питательной средой для субкультивирования каллюсов.

4. В течение месяца раз в неделю проводить измерения прироста каллюса одним из двух методов: методом взвешивания или методом определения площади.

5. Массу каллюса определяют путем взвешивания в стерильных условиях чашки Петри с культивируемым каллюсом. *Чашку Петри не открывать!*

6. Площадь каллюса можно определить, измерив длину и ширину каждого культивируемого (промаркированного) каллюса, с обратной стороны чашки Петри. *Чашку Петри не открывать!*

Относительный прирост массы каллюсной ткани определить по формуле:

$$\Delta W = (W_t - W_o) / W_o \times 100 \%,$$

где  $W$  – относительный прирост массы,

$W_o$  – начальная масса каллюса,

$W_t$  – конечная масса каллюса.

Относительный прирост площади каллюсной ткани определить по формуле:

$$\Delta S = (S_t - S_o) / S_o \times 100 \%,$$

где  $S$  – относительный прирост площади,

$S_o$  – начальная площадь каллюса,

$S_t$  – конечная площадь каллюса.

7. По результатам измерений массы (площади) через 3-4 недели построить график роста пересадочной каллюсной культуры.

8. Сделать соответствующие выводы.

### **Контрольные вопросы:**

1. Что называют каллюсом?
2. В чем особенности состава питательной среды для индукции каллюсогенеза?
3. Дайте характеристику первичного каллюса.
4. Что такое дедифференциация и пролиферация клеток?
5. Чем характеризуются основные фазы ростового цикла каллюса?
6. Отличаются ли по морфологии каллюсы различных видов растений?
7. Для каких целей используют культуру каллусов в биотехнологии, генетике и селекции?
8. Какие питательные среды используют для индукции каллюсогенеза и культивирования каллусов?
9. Какие органы растения могут использоваться в качестве экспланта для получения каллюсной культуры?
10. По каким критериям классифицируют каллюсные ткани?
11. Чем отличается первичный каллюс от пересадочной каллюсной культуры?
12. Какие фазы выделяют в «кривой роста» каллюсной культуры?
13. Какими методами можно определить прирост каллюсной ткани?
14. Как часто и почему необходимо пассировать каллюсную культуру?
15. Что такое трансплант?

## ТЕМА 5. Суспензионная культура

### **Работа 5.1. Получение и культивирование суспензии клеток**

Суспензионная культура – это одиночные клетки, мелкие, средние и крупные агрегаты (группы клеток), выращиваемые в жидкой питательной среде при постоянной аэрации (доступ кислорода) в асептических условиях. Суспензию клеток можно получить из рыхлой каллюсной ткани. Для инициации суспензионной культуры необходимо 2-3 г свежей рыхлой массы каллюсных клеток на 60–100 мл жидкой питательной среды. Первичную суспензию культивируют в колбах с жидкой питательной средой на круговых качалках со скоростью 100–120 об/мин.

Модельная кривая роста суспензии так же, как и каллюсной культуры, имеет S-образную форму и включает: лаг-фазу, экспоненциальную фазу, стационарную фазу и фазу деградации. Форма реальных ростовых кривых отличается продолжительностью фаз. Это зависит от генетики популяции, количества инокулюма и состава питательной среды. Скорость нарастания биомассы колеблется от 15 до 70 суток.

Суспензии клеток используют для получения важных химических веществ растительного происхождения: органических кислот, ферментов, алкалоидов, белков, аминокислот, которые применяются в фармакологии, парфюмерии, пищевой, химической промышленности и сельском хозяйстве.

Суспензионные культуры используют также для фундаментальных исследований: из суспензионных клеток получают протопласты, необходимые для соматической гибридизации, генетической инженерии, а также для изучения метаболизма клеток.

**Цель работы:** получить суспензионную культуру клеток различных растительных объектов на средах различного состава.

**Материалы и оборудование:** Ламинар-бокс, пробирки с рыхлыми каллюсами, колбы с жидкой питательной средой для инициации суспензии, магнитные мешалки, стерильные инструменты, флакон с 96 % спиртом, ротационный шейкер.

#### **Ход работы:**

1. В асептических условиях извлечь каллюс из пробирки и поместить в колбу с питательной средой, из расчета 2–3 г на 100 мл среды:
2. Использовать среды различного состава:
  - 1) МС + 2,4-Д,
  - 2) МС + ИУК,
  - 3) МС + ИУК + 6-БАП,
  - 4) МС без гормонов.

3. Колбы с суспензией поместить на круговые качалки при 100-120 об/мин. и оставить на 2 недели.
4. Результаты культивирования суспензии на различных по составу средах проанализировать через 2–4 недели.
5. Сделать соответствующие выводы.

### **Работа 5.2. Подсчет плотности суспензии клеток**

По плотности суспензии можно не только охарактеризовать состояние клеточной популяции, но и определить время субкультивирования (отбора инокулята и пересадки на свежую питательную среду). В большинстве случаев суспензию для субкультивирования отбирают в конце экспоненциальной фазы (через 14–16 дней после начала культивирования). При построении кривой роста показатели снимают через день. Плотность суспензии за 2–3 недели культивирования возрастает в 20 раз. Клетки суспензий удобнее всего подсчитывать в специальных счетных камерах Фукса-Розенталя или камерах Горяева.

Подсчет клеток затрудняется, если в суспензии преобладает фракция агрегатов. В таких случаях к 1 объему суспензионной культуры добавляют 2 объема 8 % оксида хрома и нагревают до 70 °С в течение 2–15 минут. После охлаждения культуру встряхивают, чтобы распались агрегаты. Для разрушения агрегатов можно в суспензию добавить пектиназу – 0,25 % от объёма.

Плотность суспензии также можно определить по объёму осажённых клеток (ООК %) – соотношение объёма биомассы клеток (определяется центрифугированием) к общему объёму суспензии.

**Цель работы:** освоить метод подсчета плотности суспензионной культуры.

**Материалы и оборудование:** световой микроскоп, центрифуга, колбы с суспензионной культурой различных объектов и разных возрастов, стерильная пипетка, предметное стекло, покровное стекло, камера для подсчета числа клеток – Фукса-Розенталя, фильтровальная бумага.

#### **Ход работы:**

1. Колбу с суспензией встряхнуть и отобрать пипеткой несколько мл суспензии.
2. 1 мл суспензии смешать с 2 мл 8 % оксида хрома и поставить на 15 минут в термостат при температуре 70 °С.
3. Смесь пропустить 3 раза через шприц с толстой иглой (пипетировать). Это необходимо для равномерного распределения клеток в суспензии.
4. Камеру Фукса-Розенталя заполнить суспензией.

5. Подсчитать клетки под микроскопом.
6. Плотность суспензии рассчитать по формуле:

$$X = \frac{M \times n \times 1000}{3,2},$$

где X – число клеток в мл суспензии,

M – среднее число клеток в камере,

n – разведение.

7. Приготовить на менее 3-х препаратов, подсчеты провести не менее, чем в 3-х полях зрения.

8. Определить плотность суспензионных культур клеток различных растительных объектов и суспензий различного возраста.

9. Сделать соответствующие выводы.

### ***Работа 5.3. Определение степени агрегированности и жизнеспособности суспензионной культуры***

В зависимости от целей исследования условия культивирования и состав питательной среды подбирают так, чтобы в суспензии преобладала определенная фракция клеток. Обычно в суспензии различают 4 основные фракции: одиночные клетки, мелкие агрегаты, средние агрегаты, крупные агрегаты. Степень агрегированности определяют, подсчитывая клетки в нескольких полях зрения на временных препаратах под малым увеличением микроскопа (не менее 1000 клеток).

При работе с суспензиями необходимо учитывать и ее жизнеспособность. О жизнеспособности клеток можно судить по движению цитоплазмы, по степени проницаемости клеточной стенки для красителей, по активности ферментов.

Прижизненные красители, такие как метиленовый синий, клетки не убивают и через оболочки живых клеток в цитоплазму не проникают. Следовательно, неокрашенные клетки жизнеспособны и по их отношению к числу окрашенных клеток можно судить о жизнеспособности суспензионной культуры. Для количественного определения жизнеспособности суспензии можно использовать вещества, участвующие в метаболизме клетки: флуоресцеиндиацетат расщепляется в клетке эстеразами с образованием флуоресцеина, дающего флуоресценцию цитоплазмы живых клеток. Активность эстеразы определяют на спектрофотометре.

**Цель работы:** овладеть методикой оценки степени агрегированности и жизнеспособности суспензии.

**Материалы и оборудование:** световой микроскоп, колба с суспензионной культурой клеток, флакон с 0,1 % раствором метиленового синего, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, дистиллированная вода, пипетки.

### Ход работы:

1. Приготовить препарат суспензии: встряхнуть суспензию в колбе, пипеткой отобрать небольшое количество суспензии, поместить её каплю на предметное стекло, добавить каплю красителя, накрыть покровным стеклом, излишки жидкости убрать фильтровальной бумагой.

2. Поместить препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива.

3. Подсчитать неокрашенные и окрашенные клетки и агрегаты в 3-х полях зрения (просмотреть не менее трех препаратов).

4. Результаты записать в таблицу.

5. Препараты зарисовать, описать морфологию клеток различных суспензий (форму, величину).

6. Сделать выводы о степени агрегированности суспензий (какие фракции преобладают) и жизнеспособности суспензий различных растительных объектов и различных возрастов культивирования.

#### Степень агрегированности и жизнеспособности суспензии, %

Фракции	Препараты																	
	1						2						3					
	Поля зрения																	
	1		2		3		1		2		3		1		2		3	
	о	н	о	н	о	н	о	н	о	н	о	н	о	н	о	н	о	н
одиночные клетки																		
мелкие агрегаты (2–5 клеток)																		
средние агрегаты (6–20 клеток)																		
крупные агрегаты (21–50 клеток)																		
крупные агрегаты (50 и более клеток)																		

Примечание:

о – окрашенные клетки и агрегаты,

н – неокрашенные клетки и агрегаты.

Суспензия считается жизнеспособной, если более 70 % клеток не окрашиваются в синий цвет. Агрегат жизнеспособен, если более 50 % его клеток не окрасились.

Жизнеспособность рассчитать как отношение числа неокрашенных (живых) клеток к общему количеству анализируемых клеток, умноженному на 100 %.

Степень агрегированности рассчитать как отношение числа встречаемости данного агрегата к общему количеству проанализированных агрегатов, умноженному на 100 %.

### **Контрольные вопросы**

1. Что называют суспензионной культурой или суспензией клеток?
2. Каковы основные способы получения суспензионных культур?
3. В каких отраслях производства и науки используют суспензионные культуры?
4. Как определить степень агрегированности суспензионной культуры?
5. Какими способами можно определить жизнеспособность суспензии клеток?
6. Какой тип каллюсной культуры используют для получения суспензии клеток?
7. Какими способами можно подсчитать плотность суспензии клеток?
8. Как можно дезагрегировать суспензионную культуру?
9. Как работать с камерой Фукса-Розенталя или камерой Гаряева?
10. По какой формуле рассчитывают плотность суспензии при работе с камерами подсчета числа клеток?
11. Какая степень жизнеспособности допустима для суспензионной культуры и для агрегата?
12. Что такое объём осажденных клеток – ООК %? Как рассчитывают данный показатель?

## ТЕМА 6. Культура одиночных клеток

Культивирование отдельных (одиночных) клеток позволяет получать клоны и исследовать генетическую и физиологическую стабильность или изменчивость клонового материала. Одиночные клетки используются в клеточной селекции мутантных, гибридных и трансформированных линий. В эти клетки можно ввести новые гены, в то же время – это хорошая модель для изучения онтогенеза и физиологии клетки. Источником отдельных (одиночных) клеток являются клеточные суспензии, растущие на жидкой питательной среде; мацерированные ткани растений (мезофилл листа); изолированные протопласты после восстановления клеточной стенки. Наиболее эффективными методами для получения культуры одиночных клеток являются: метод «кормящего слоя», «культуры-няньки», кондиционированных сред, микрокапель. Для получения генетически стабильных клонов и клеточной селекции используется метод Плейтинга.

### **Работа 6.1. Получение клеточных клонов на агаризованных средах методом Плейтинга**

**Цель работы:** освоить получение клеточных клонов методом Плейтинга.

**Материалы и оборудование:** колбы с суспензией, стерильные чашки Петри, стерильный цилиндр, чашки Петри с агаризованной средой для каллюсогенеза (1,2 – 1,4 % агара), инструменты: пинцеты, препаровальные иглы, спиртовка, 96 % спирт.

#### **Ход работы:**

1. Пипеткой отобрать 5 мл верхней фракции суспензии (в верхнем слое суспензии преобладает фракция одиночных клеток).
2. Смешать фракцию суспензии с 5 мл агаризированной (1,4 % агара) среды.
3. Работу проводить в стерильной посуде: мерном цилиндре или стакане в стерильных условиях.
4. Полученную смесь разлить в чашки Петри слоем до 1 см.
5. Чашки Петри закрыть крышками и герметизировать парафилмом.
6. Культивировать в термостате при 25–26 °С.
7. Количество колоний подсчитать через 4–6 недель.
8. Результаты зарисовать, подсчитать плотность высева по формуле:

$$\text{Эффективность высева} = \frac{\text{количество образовавшихся колоний}}{\text{количество высеянных клеток}} \times 100 \%$$

### **Контрольные вопросы:**

1. Что называют культурой одиночных клеток?
2. Для каких целей используют данную культуру?
3. Какие основные способы получения данной культуры ?
4. Что может служить источником для получения культуры одиночных клеток?
5. В чем состоит сложность получения культур одиночных клеток?
6. Что такое «фактор кондиционирования»?

## ТЕМА 7. Культура изолированных протопластов высших растений

Изолированный протопласт – живое содержимое клетки, лишенное клеточной оболочки, но сохраняющее все физиологические и биохимические характеристики клетки.

Изолированные протопласты можно получить механическим и ферментативным (энзиматическим) способом.

Среда для получения и культивирования изолированных протопластов обязательно должна содержать осмотические стабилизаторы – маннит, сорбит, сахарозу, глюкозу и др.

Изолированные протопласты можно выделить из различных тканей и органов интактного растения (чаще используют хлоренхиму листьев) или каллюсной и суспензионной культуры.

При энзиматическом (более распространенном способе получения протопластов) используют ферментативные препараты, содержащие смесь пектиназ, гемицеллюлаз и целлюлаз – комплекс ферментов, разрушающих клеточную оболочку растительной клетки.

После удаления раствора ферментов начинается спонтанное образование (регенерация) клеточной стенки, после чего образовавшиеся клетки начинают делиться, образуя микроколонии, состоящие из 20-40 клеток. Затем из микроколоний образуются хорошо развитые пролиферирующие каллюсные ткани, из которых можно получить растение-регенерант, что свидетельствует о топиотентности протопластов.

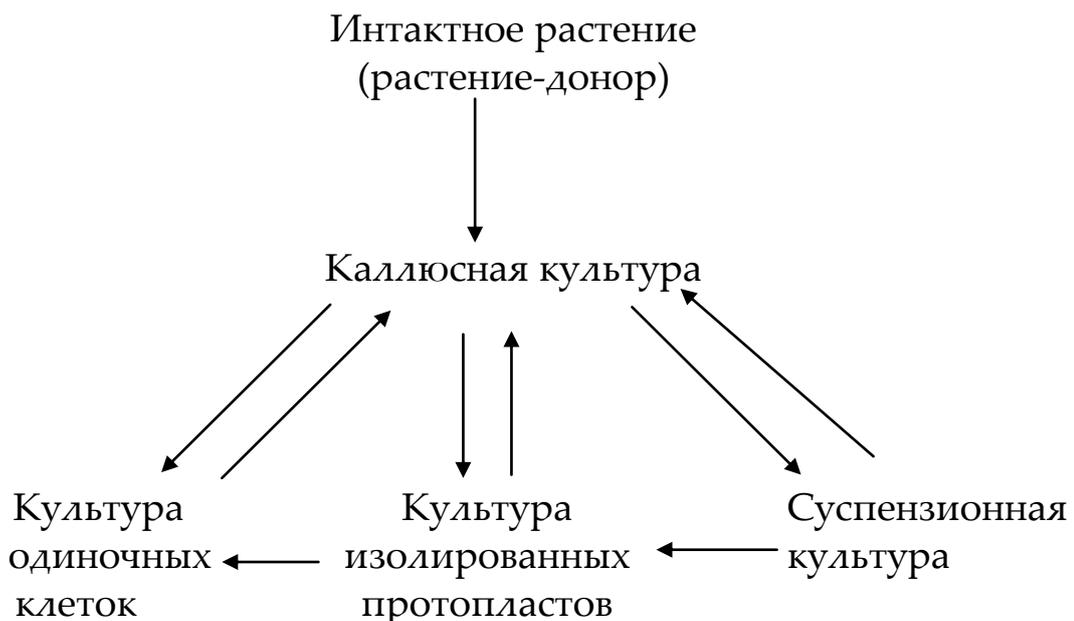


Схема 2. Взаимосвязь источников получения культур высших растений *in vitro*

## **Работа 7. 1. Подготовка к эксперименту. Приготовление ферментных растворов и ферментация тканей**

**Цель работы:** освоить метод энзиматического (ферментативного) выделения протопластов – приготовления ферментных растворов и проведения ферментации растительных тканей

**Материалы и оборудование:** асептические растения картофеля, листья интактных двудольных растений; ферментные препараты – Cellulysin, Macerase, Driselase; макро- и микросоли, витамины, фитогормоны; стаканы на 200 мл, мерные цилиндры, мерные пипетки, пастеровские пипетки, чашки Петри, колбы Эрленмейера, колбочки со стеклянными лейками и нейлоновыми фильтрами (диаметр пор 50–100 мкм), центрифужные пробирки с резиновыми пробками, шприц с насадкой с фильтрами (с диаметром пор 0,22 мкм или 0,45 мкм), стерильный фильтр Зейтца, весы, шпатели, пинцеты, скальпели, лезвия в держателе, магнитная мешалка, рН-метр, настольная центрифуга, инвертированный микроскоп, плитка, автоклав, ламинар-бокс, спиртовка, вата, фольга, спирт, парафилм.

### **Ход работы:**

#### **Этап 1. Подготовка к эксперименту**

1. Приготовить среду выделения протопластов S-1: 0,5 М р-р сахаразы с 5 мМ CaCl<sub>2</sub> (см. табл. № 2).
2. Приготовить среду W-5 для отмывания протопластов (см. табл. № 2).
3. Приготовить среду W-S-S для культивирования мезофильных протопластов (см. табл. № 2).
4. Приготовить среду ST-1, ST-2 для регенерации (см. табл. № 2).
5. Простерилизовать приготовленные среды для выделения, отмывания, культивирования и регенерации изолированных протопластов.

#### **Этап 2. Приготовление ферментных растворов и ферментация тканей**

1. Приготовить ферментную смесь, которая содержит 1 % Cellulysin, 0,5 % Macerase, 0,1 % Driselase в среде выделения.
2. Отцентрифугировать смесь 10–15 минут при 2 тыс об/мин для осаждения нерастворимых частиц.
3. Довести 1н КОН рН ферментной смеси до значения – 5,6.
4. В ламинар-боксе с помощью шприца с насадкой с фильтром профильтровать смесь в стерильную колбу Эрленмейера.
5. Разлить стерильный ферментный раствор по 7–10 мл в колбы Эрленмейера на 50 мл.

*Ферментные растворы лучше готовить непосредственно перед опытом или за сутки до опыта.*

6. В ламинар-боксе достать из пробирки 4-недельные асептические растения картофеля и поместить их в стерильные чашки Петри.

7. Придерживая растения пинцетом, скальпелем обрезать листики.

8. Аккуратно придерживая листья пинцетом, чтобы не повредить мезофилл, лезвием, закрепленным держателем, нарезать их тонкими (до 1 мм в ширину) полосками.

9. Полоски листьев поместить на поверхность ферментной смеси в колбы Эрленмейера, так чтобы ткань покрывала всю поверхность смеси ( $\approx 1$  г ткани на 10 мл ферментной смеси).

10. Колбы с растительным материалом поместить в термостат на 16 часов при температуре 26 °С.

*Оптимальную температуру и время инкубации необходимо подбирать для каждого конкретного случая.*

### **Работа 7.2. Выделение и очистка изолированных протопластов высших растений**

**Цель работы:** овладеть методикой выделения и очистки протопластов из мезофилла листа; получить изолированные протопласты из мезофилла листа растений картофеля.

**Материалы и оборудование:** ферментированный растительный материал (см. пред. работу), среда выделения для изолированных протопластов, центрифуга.

#### **Ход работы**

1. После инкубации добавить в колбы с растительным материалом такой же объем среды выделения.

2. Тотальный препарат протопластов профильтровать через нейлоновую сетку для того, чтобы избавиться от немацерированных кусочков тканей и элементов проводящей системы.

3. Фильтрат стерильной пипеткой перенести в центрифужные пробирки (4/5 объема пробирки).

4. На фильтрат по стенке пробирки аккуратно с помощью пипетки наслоить среду W-5 (1/5 объема). Закрывать пробирки и отцентрифугировать при 100 g 3 минуты.

5. Пока идет центрифугирование, в чистые центрифужные пробирки налить среду W-5 (4/5 объема).

6. С центрифугата аккуратно отобрать стерильной пипеткой верхний слой, в котором содержатся протопласты, которые флотировали на границе сред, и перенести в центрифужные пробирки со средой W-5 и отцентрифугировать при 80 g 3 минуты.

7. Пипеткой аккуратно отобрать надосадочную жидкость.

8. Провести отмывание протопластов еще раз.

**Таблица 2. Среды для выделения и культивирования протопластов и регенерации из них растений (мг/л)**

Компонент среды	W-5	S-1	W-S-S	ST-1	ST-2
NaCl	9000				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		250	1280		
KNO <sub>3</sub>		2500		1900	1900
CaCl <sub>2</sub> × 2H <sub>2</sub> O	18400	900	600	440	440
MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O		250	300	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			170	170	170
KCl	800		300		
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> × H <sub>2</sub> O		150			
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		134			
NH <sub>4</sub> Cl				267	267
Fe-хелат		250	250	250	250
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		3	6	6	6
MnCl <sub>2</sub> × 4H <sub>2</sub> O			24	24	24
ZnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O		2	10	10	10
CuSO <sub>4</sub> × 5H <sub>2</sub> O		0,025	0,025	0,025	0,025
CoSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O		0,025	0,025	0,025	0,025
KI		0,75	0,83	0,83	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O		0,25	0,25	0,25	0,25
MnSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O		14			
Мезоинозит		100	100	100	100
Глицин				2	2
Никотиновая кислота		1	1	5	5
Фолиевая кислота				0,5	0,5
Биотин				0,05	0,05
Аденин сульфат				40	80
Гидролизат казеина			500	300	100
В <sub>1</sub>		10	10	0,5	0,5
В <sub>6</sub>		1	1	0,5	0,5
НУК		0,2	2	0,1	
ИУК					0,1
2,4 Д		1	0,2		
БАП		0,2	0,5	0,5	
Зеатин					0,5
Сахароза		10000		2500	2500
Глюкоза	1000		7200		
Ксилоза			250		
Маннитол		72800		54600	34600
Агар-агар				1 %	1 %

### **Работа 7.3. Культивирование изолированных протопластов и регенерация растений**

**Цель работы:** освоить методы культивирования изолированных протопластов и регенерации растений.

**Материалы и оборудование:** концентрированная суспензия изолированных протопластов (см. пред. работу), среда для культивирования протопластов, среда для формирования микрокалюсов, регенерационная среда; микроскоп, люминестат для культивирования культур *in vitro*.

#### **Ход работы**

1. В стерильные чашки Петри диаметром 60 мм налить 2-3 мл среды для культивирования изолированных протопластов W-S-S.

2. 2-3 капли густой суспензии протопластов в среде W-5 пипеткой перенести в чашки Петри со средой W-S-S.

3. Культивировать протопласты на рассеянном свете при температуре  $25 \pm 1$  °С. Ежедневно наблюдать за развитием протопластов под микроскопом.

4. После образования клеточных колоний (через 8–10 суток) к суспензии клеток добавить свежую питательную среду W-S-S, по мере разведения суспензии часть колоний со средой перенести в новые чашки Петри.

5. Колонии, которые достигли размеров 0,5–1 мм, перенести на агаризованную среду ST-1 для формирования микрокалюсов.

Культивировать на свету 3-4 клк при 16-часовом фотопериоде.

6. Через 10–15 дней ярко-зеленые колонии диаметром 1–3 мм перенести на среду ST – 2 для органогенеза и культивировать при  $25 \pm 1$  °С, 16-часовом фотопериоде и освещении 3-4 клк 25–30 дней.

*Часто для регенерации растений необходимо повторно пересаживать колонии на свежую среду ST-2.*

7. Сформировавшиеся побеги высотой 3–10 мм отделить от каллюса и перенести на безгормональную среду ST-3 для укоренения.

#### **Оформление работы:**

- зарисовать изолированные протопласты и клеточные колонии;
- описать каллюсы и растения-регенеранты;
- сделать соответствующие выводы.

#### **Контрольные вопросы**

1. Что такое изолированный протопласт?
2. Какими способами можно получить изолированные протопласты?
3. Кем впервые была получена культура изолированных протопластов?

4. На чем основан ферментативный способ получения протопластов?
5. Для чего в среду культивирования протопластов необходимо вносить осмотические стабилизаторы?
6. Из чего можно получить изолированные протопласты?
7. Как взаимосвязаны между собой культуры *in vitro*?
8. Какими способами можно культивировать изолированные протопласты?
9. Для чего используют культуру изолированных протопластов?
10. В чем сущность метода слияния изолированных протопластов?
11. Что такое соматическая гибридизация?
12. Кем был разработан метод слияния изолированных протопластов?
13. Какие применяют физические и химические способы индукции слияния изолированных протопластов?
14. Что такое цибрид?
15. Чем отличается симметричный и асимметричный соматический гибрид?
16. Как в дальнейшем реализуется тотипотентность изолированных протопластов?

## ТЕМА 8. Культура гаплоидных клеток

Гаплоидом (или моноплоидом) называют организм, имеющий в соматических клетках гаплоидный набор негомологичных хромосом. Генотип гаплоидов имеет характерные особенности. У гаплоидов проявляются рецессивные гены. Гаплоиды по внешнему виду сходны с соответствующими диплоидами, но меньше их. Клетки гаплоидов имеют меньший размер, чем клетки диплоидов. Гаплоиды не образуют полноценных гамет. Путем удвоения числа хромосом соматических клеток гаплоида можно получить полностью гомозиготное диплоидное растение.

Гаплоиды получают, используя гаплопродюсеры (отдаленную гибридизацию, партеногенез). Гаплоиды можно получить в культуре тканей из пыльников (андрогагенез) и клеток зародышевого мешка (гиногенез). Гаплоиды в культуре тканей уже получены у 200 видов растений.

Для большинства растений оптимальным сроком посадки пыльников на питательные среды является стадия "средних" или "поздних" одноядерных вакуолизированных микроспор. На этой стадии микроспоры высвобождаются из тетрад и готовятся к первому митозу.

Для культивирования пыльников используют среды: Мурасиге-Скута с 1/2 концентрацией солей, среды с картофельным экстрактом, среду Нич. Ауксины либо вообще не добавляют, либо используют 2,4-Д. Из цитокининов применяют кинетин и 6-БАП. Агар-агар тщательно промывают, так как он содержит вещества неблагоприятно влияющие на развитие пыльников. Для адсорбции метаболитов ингибирующих ростовые процессы в культуре тканей в питательные среды добавляют активированный уголь.

Перед культивированием пыльники выдерживают при температуре 4–6 °С в течение 2–8 суток. Изолированные пыльники культивируют либо в темноте, либо при слабом освещении при температуре  $25 \pm 2$  °С.

На питательных средах микроспора может образовать каллюс или гаплоидный зародыш (сначала образуется 40–50-клеточный проэмбрио). Зародыш в глобулярной стадии разрывает экзину и проходит стадии, аналогичные развитию зиготического зародыша. Получение гаплоидов биотехнологическими методами позволяет быстро создавать гомозиготные линии, что делает данную технологию весьма ценной для селекции и генетики.

В процессе культивирования изолированных пыльников на питательных средах развитие идет двумя путями: либо прямым андрогагенезом (образованием эмбриоидов и гаплоидных растений-регенерантов), либо косвенным (непрямым) андрогагенезом, когда репродук-

тивные клетки дедифференцируются и переходят к пролиферации, образуя сначала каллюс, а затем при пассировании на специальные среды – морфогенный каллюс и регенеранты.

### **Работа 8.1. Получение каллюсов из пыльников вишни и яблони**

**Цель работы:** освоить метод получения культуры пыльников – андрогенеза.

**Материалы и оборудование:** ламинар-бокс, бутоны вишни и яблони, пробирки со средой для культивирования пыльников, препаровальные иглы, пинцеты, флакон с 96 % спиртом, 6 % раствор хлорамина, вата, фольга.

#### **Ход работы:**

Бутоны простерилизовать в 6 % растворе хлорамина 10 минут, для этого поместить бутоны в марлевый мешочек по 20 штук в каждый и опустить в стакан со стерилизующим раствором, затем тщательно промыть бутоны стерильной дистиллированной водой (5-6 раз).

Перенести бутоны на стерильную поверхность стола ламинар-бокса, осторожно отделить пыльцевые мешки от тычиночных нитей.

Стерильной препаровальной иглой перенести пыльники на поверхность питательной среды в пробирки по 5–10 пыльников в каждую.

Закрыть пробирки и перенести в термостат с температурой 26 °С и влажностью 70 %. Культивировать 2–4 недели.

Результаты эффективности каллюсогенеза оформить в виде таблицы.

Объект, № пробирки	Общее кол-во пыльников	Кол-во пыльников, образовавших каллюс	
		Штук	%

### **Работа 8.2. Получение растений-регенерантов из пыльцевых каллюсов вишни**

Способность каллюсов к морфогенезу определяется балансом фитогормонов как в питательных средах, так и в самих клетках (эндогенные фитогормоны). Для получения растений-регенерантов используют среды, содержащие кинетин – 0,1–0,3 мг/л, ГК – 4 мг/л, 6-БАП – 0,5–1,5 мг/л, ИУК – 0,5–1,5 мг/л. Каллюсы культивируют при 16-часовом фотопериоде и интенсивностью освещения 2-3 клк. Морфогенный каллюс имеет плотную консистенцию, бугристую поверхность, молочно-белый, желтоватый и зеленоватый цвет. Поверхностные слои

морфогенного каллюса состоят из меристематических, богатых цитоплазмой клеток, имеющих заполненные крахмалом пластиды и хорошо развитые митохондрии. Центральная часть каллюса представлена крупными вакуолизированными клетками с крупными ядрами, которые чередуются с меристематическими участками.

Для индукции побегообразования, каллюсы переносят на среды для регенерации: МС + кинетин – 1–2 мг/л, 6-БАП – 3–6 мг/л, аденин – 1–2 мг/л, ГК – 1–2 мг/л, феруловая кислота – 0,5–0,7 мг/л, ИУК – 0,2–0,4 мг/л, НУК – 0,2–0,4 мг/л, ИМК – 0,2–0,4 мг/л, 2,4-Д – 0,1–0,3 мг/л. Через 1,5–2 месяца культивирования морфогенных каллюсов на 16-ти часовом фотопериоде при освещенности 3 кЛк начинается пролиферация почек и побегов. Морфогенные каллюсы пассируют каждые 4–6 недель. Побего-регенеранты, полученные из пыльцевых каллюсов, неоднородны по морфологическим признакам. Это обусловлено гетерогенностью каллюсов.

**Цель работы:** освоить метод получения растений-регенерантов из пыльцевых каллюсов (андрогенез).

**Материалы и оборудование:** ламинар-бокс, спиртовки, флаконы с 96 % спиртом, пробирки с пыльцевыми каллюсами, пробирки со средами для получения морфогенного каллюса, пробирки со средами для регенерации, препаровальные иглы, пинцеты.

#### **Ход работы:**

1. В условиях ламинар-бокса извлечь каллюс из пробирки и перенести на стерильную поверхность. Стерильной препаровальной иглой выделить зону морфогенного каллюса (белые мелкие клетки, каллюс средней плотности).

2. Стерильной препаровальной иглой перенести кусочек (5-6 мм) морфогенного каллюса в пробирку со средой для регенерации, закрыть пробирку стерильной пробкой.

3. Перенести штативы с пробирками в культуральную комнату с температурой  $23 \pm 2$  °С, влажностью 70 %, освещенностью 4 кЛк.

4. После образования побегов (3–5 мм) перенести их в пробирки со средами для пролиферации побегов: МС +1–2 мг/л 6-БАП, 1 мг/л НУК.

5. Перенести побеги на среды для индукции корнеобразования: МС без гормонов, МС +1–2 мг/л ИМК + 1мг/л ГК и поместить на 20 дней в темноту.

#### **Контрольные вопросы**

1. Для чего используются гаплоиды в селекции и генетике?
2. Как получить морфогенный каллюс из пыльников?
3. Каковы основные способы получения гаплоидных и дигаплоидных растений-регенерантов?

## ТЕМА 9. Гормональная регуляция в культуре клеток и тканей

Фитогормоны – это биологические регуляторы роста и развития растений, осуществляющие взаимодействие клеток, тканей и органов, стимулирующие и ингибирующие морфогенетические и физиологические процессы в растительных организмах. Фитогормоны влияют на деление и рост клеток растяжением, состояние покоя, созревание, старение, формирование пола, устойчивость к стрессу, тропизмы, транспирацию; обеспечивают функциональную целостность растительного организма, закономерную последовательность фаз индивидуального развития. По химической природе гормоны растений четко подразделяются на две группы: производные мевалоновой кислоты (гиббереллины, абсцизины, брассины, фузикоцин, цитокинины), производные аминокислот (ауксины – из триптофана, этилен – из метионина и аланина). По функциональному действию различают 5 основных групп фитогормонов:

- ауксины;
- цитокинины;
- гиббереллины;
- абсцизины;
- этилен.

Биосинтез фитогормонов происходит в определенных органах растений: в апексах побегов образуется ИУК – индолил-3-уксусная кислота, лист служит донором ключевого продукта синтеза гиббереллинов – каурена, а также абсцизовой кислоты, в апексах корней синтезируется кинетин, а в зоне растяжения корня – гиббереллины, источником зеатина является эндосперм проростающих семян.

Ауксины в культуре тканей вызывают рост клеток растяжением, в больших концентрациях – деление клеток, в сочетании с цитокининами – органогенез. В биотехнологии применяют как природные ауксины (ИУК), так и синтетические ИМК (индолил-3-масляная кислота), ИПК (индолил-3-пропионовая кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксипуксусная кислота), НУК (нафтилуксусная кислота).

Цитокинины в сочетании с ауксинами индуцируют митозы, пролиферацию клеток, почек и побегов. К природным цитокининам относятся: зеатин, кинетин (6-фурфуриламинопурин), дифенилмочевина; к синтетическим – 6-БАП (6-бензиламинопурин).

Гиббереллины стимулируют рост клеток растяжением, а также синтез ауксинов и цитокининов. Сейчас известно около 60 видов гиббереллинов. В культуре ткани используется гибберелловая кислота.

Абсцизины (АБК – абсцизовая кислота) и этилен ингибируют ростовые процессы, деление клеток, в сочетании с цитокининами и хлорохлинхлоридом индуцируют органогенез (образование микроклубней). Гормональная система тесно связана с генетическим аппаратом клетки. Фитогормоны не только влияют на степень метилирования ДНК и таким образом регулируют экспрессию генов, но и связываются с белками – репрессорами на опероне, что приводит к активации структурных генов и синтезу определенных ферментов. Следовательно, изменяя соотношение гормонов в питательных средах, можно в какой-то степени изменять и генетические программы клеток и тканей. Эти процессы известны как дедифференциация, редифференциация и дифференциация клеток и тканей.

**Работа 9.1. Индукция различных путей морфогенеза *in vitro* каллюсной ткани под действием фитогормонов**

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 каллюс; если концентрация ауксинов значительно превосходит концентрацию цитокининов, то формируются корни; если концентрация ауксинов значительно меньше концентрации цитокининов, то образуются почки, побеги.

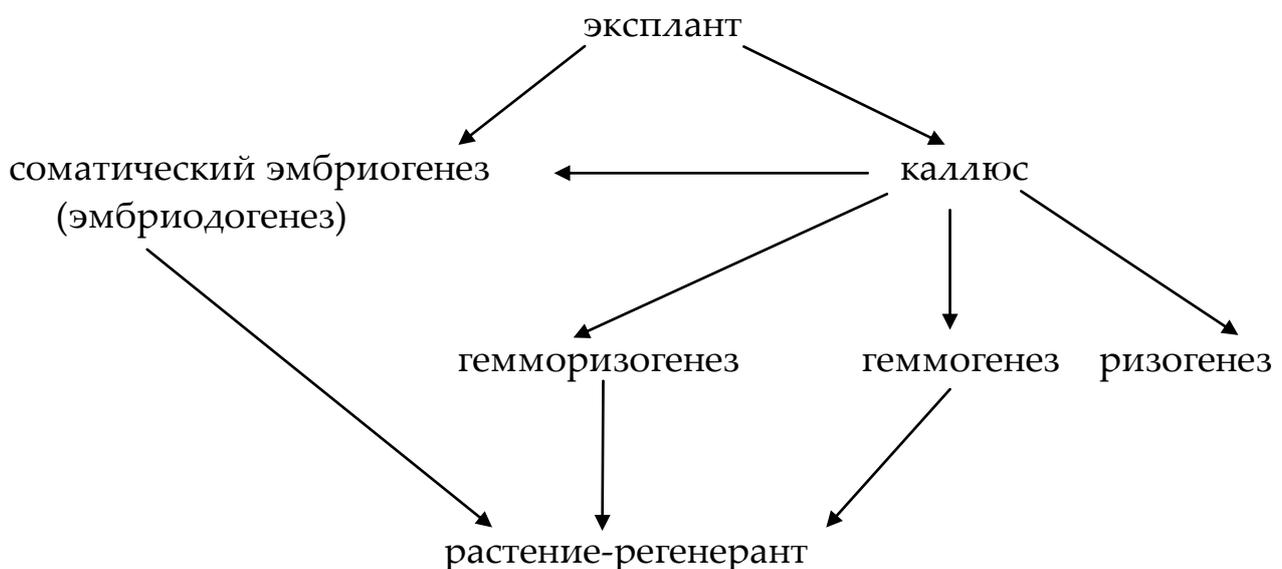


Схема 3. Разнообразие проявления путей морфогенеза *in vitro*

Геммогенез (побегообразование) происходит, когда в каллюсной ткани обособляется зона меристематической активной клетки. Этому способствует высокое содержание в среде культивирования цитокининов (кинетин, БАП). Геммогенез приводит к формированию большого количества растений-регенерантов из одного каллюса, но при этом формирующиеся растения-регенеранты не имеют корней, что требует обязательно дополнительного этапа – укоренения. Поэтому данный тип морфогенеза называют геммогенез, побегообразование или стеблевой органогенез.

Ризогенез – формирование каллюсом корней может происходить спонтанно или стимулироваться высоким содержанием в среде ауксинов. Обычно наблюдается при культивировании в условиях темноты. Данный путь морфогенеза не является полноценным для получения растений-регенерантов.

При соматическом эмбриогенезе (эмбриодогенез) в каллюсной ткани развиваются эмбриониды – зародышеподобные биполярные структуры, которые затем одновременно формируют апексы стебля и корня.

**Цель работы:** выявить фитогормональную регуляцию направленности процессов морфогенеза *in vitro*.

**Материалы и оборудование:** пробирки с каллюсами, колбы со средами для стеблевого органогенеза (геммогенеза), соматического эмбриодогенеза и индукции ризогенеза, флаконы с 96 % спиртом, стерильные пинцеты и препаровальные иглы, спиртовка, ламинар-бокс.

#### **Ход работы:**

1. Стерильным пинцетом переложить каллюсы на стерильную поверхность стола ламинар-бокса, разделить на кусочки 5х5 мм и поместить в колбы с питательными средами, содержащими различные наборы фитогормонов для индукции геммогенеза, ризогенеза, эмбриодогенеза.

2. Колбы перенести в культуральную комнату с температурой  $25 \pm 2$  °С, влажностью воздуха 70 % и интенсивностью освещения 5 клк.

3. Результаты эксперимента проанализировать и зарисовать через 4–8 недель.

4. Сделать соответствующие выводы.

#### **Контрольные вопросы**

1. Что такое фитогормоны и какие процессы в растительных клетках и тканях они стимулируют?

2. Какие группы фитогормонов стимулируют и ингибируют рост и развитие растений?

3. Какова химическая природа фитогормонов и в каких органах растения они синтезируются?
4. Как осуществляется гормональная регуляция в культуре клеток и тканей?
5. Какие пути реализации морфогенеза *in vitro* возможны?
6. Что такое геммогенез, стеблевой органогенез? Какие гормоны стимулируют данный путь морфогенеза?
7. В чем особенности ризогенеза? Какие гормоны стимулируют данный путь морфогенеза?
8. Что такое соматический эмбриодогенез?
9. Что такое соматический эмбриоид?
10. Чем отличаются прямой и непрямой пути морфогенеза?

## ТЕМА 10. Микрклональное размножение растений.

Микрклональное размножение – это бесполое вегетативное размножение в культуре *in vitro*, при котором получают растения генетически идентичные исходной родительской форме, что способствует сохранению генетически однородного посадочного материала.

На сегодня разработан ряд различных способов биотехнологии микрклонального размножения, в основе которых лежит три принципиальных подхода:

1. Индукция делений клеток пазушных меристем;
2. Образование из тканей экспланта побегов и эмбриоидов и их деление (прямой эмбриодогенез);
3. Получение каллюсной ткани с последующей индукцией органо-генеза (соматический эмбриодогенез).

Для микрклонального размножения растений *in vitro* используют различные модификации среды Мурасиге-Скуга.

### **Работа 10.1. Выделение и культивирование апикальных (пазушных) меристем картофеля**

**Цель работы:** овладеть методикой вегетативного размножения растений *in vitro*, которое базируется на активации апикальных или пазушных меристем.

**Материалы и оборудование:** клубни картофеля, стерильная среда МС, стерильные чашки Петри, инструменты, ламинар-бокс, бинокулярная лупа.

#### **Ход работы**

1. Клубни картофеля проращивают в темноте при температуре 20-22 °С на протяжении 2–3 недель.
2. От клубней отделяют ростки и стерилизуют их в растворе белизны (1:2) на протяжении 10–15 минут.
3. Потом три раза промывают стерильной дистиллированной водой по 15–20 минут.
4. Стерильные ростки помещают в чашку Петри и вычлениают апикальную или боковую меристемы, последовательно снимая кроющие листочки. Эту операцию проводят стерильной препаровальной иглой под бинокуляром.
5. Меристемы размером 100–250 мкм без примордиев на острие иглы переносят на среду в пробирку или колбу.
6. Через 3–4 недели наблюдают за развитием из меристемы побега и фиксируют этапы этого процесса.

## **Работа 10.2. Выделение и культивирование апикальных меристем земляники**

При культивировании апикальных меристем земляники на питательной среде с высоким содержанием кинетина (0,5–1 мг/л) под действием этого гормона происходит подавление апикального доминирования верхушечной меристемы и активация пазушных меристем. Через 1–2 месяца экпланты превращаются в конгломерат множества разновозрастных почек с развернувшимися листьями. Образовавшиеся почки легко отделяются одна от другой, но не образуют корней. Для корнеобразования почки должны быть пересажены на среду, содержащую ауксины (см. раб. 10.4).

**Материалы и оборудование:** столоны земляники, пробирки со стерильной средой для культивирования апикальных меристем, стерильная посуда и инструменты, бинокляр, ламинар-бокс.

### **Ход работы**

1. Столоны земляники промыть в мыльной воде, 3 раза прополоскать в дистиллированной воде.

2. Выделить скальпелем пазушные почки, находящиеся у основания листьев столонов земляники.

3. Почки собрать в марлевый мешочек и простерилизовать (см. работу 3.2).

4. Стерильные почки перенести в чашки Петри и вычленить меристематический купол с 2–3 листовыми примордиями. Вычленение проводят с помощью биноклярной лупы при десятикратном увеличении.

5. Вычлененные меристемы перенести в пробирки с питательной средой.

6. Пробирки маркировать, закрыть целлофаном (фольгой). Поместить в культуральную комнату.

7. Через 5–7 дней оценить степень инфицированности.

8. Через 3–4 недели сделать рисунки, проанализировать процесс микроразмножения земляники (индукции пазушных меристем).

9. Использовать образовавшиеся почки для укоренения (см. работу 10.4)

## **Работа 10.3. Пролиферация побегов и микрочеренкование стерильных проростков**

Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляется с помощью черенкования. Такое размножение основано на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем при удалении верхушки побега.

**Цель работы:** овладеть методикой микрочеренкования стерильных проростков, которая базируется на активации пазушных меристем.

**Материалы и оборудование:** асептические растения картофеля, стерильная среда МС, стерильные чашки Петри, инструменты, ламинар-бокс.

#### **Ход работы**

1. Стерильным пинцетом извлечь асептическое растение-регенерант из пробирки, в которой оно росло, и поместить на стерильную чашку Петри.

2. Поддерживая растение пинцетом, скальпелем разрезать стебель на сегменты с пазушными почками, длиной приблизительно 10 мм так, чтобы часть над почкой составляла 2–3 мм, а под ней – 5–7 мм.

3. Обрезать листики. У верхушки стебля листья не обрезать.

4. Пинцетом перенести каждый сегмент в пробирку с питательной средой МС. При этом пазуха листа, где находится пазушная почка, должна быть над уровнем агара.

5. Культивировать при температуре 25–28 °С, освещении 2-3 клк, 16-часовом фотопериоде, относительной влажности воздуха 70–75 %.

6. Через 3–4 недели из пазушных почек развиваются растения-регенеранты, которые снова можно использовать для размножения прививкой и других целей.

#### **Работа 10.4. Индукция корнеобразования при микроклональном размножении**

Для укоренения образовавшихся при микроклональном размножении почек (побегов), их необходимо пересадить на новую питательную среду. Черенки и побеги легко укореняются на средах с обедненным составом минеральных солей и обязательно содержащих ауксины – ИУК, НУК, ИМК. Проростки, сформировавшие корни в стерильных условиях, можно рассматривать как небольшие укорененные растения (растения-регенеранты), которые необходимо адаптировать к нестерильным обычным условиям выращивания (условия *ex vitro*). Такие растения лучше высаживать в грунт, когда полностью сформируются 5-6 листьев и достаточно разрастутся корни. Однако, разные виды культурных растений по-разному адаптируются к перенесению в нестерильные условия, и поэтому требуют специально подобранных условий культивирования в грунте, которые устанавливаются экспериментально.

**Цель работы:** освоить методы индукции корнеобразования при микроклональном размножении.

**Материалы и оборудование:** пробирки с проростками, пробирки со стерильной питательной средой для укоренения, стерильные инструменты, чашки Петри, ламинар-бокс.

#### **Ход работы**

1. В стерильных условиях извлекают конгломерат проростков из пробирок, освобождают от остатков агаризированной среды (если есть необходимость), промывают в стерильной воде, разъединяют на отдельные проростки.

2. Стерильным пинцетом переносят в пробирки со средой для укоренения. Пробку тщательно оборачивают фольгой.

3. Пробирки с пересаженными проростками ставят в штатив и культивируют в люминестате при освещенности 5 кЛк, 16-часовом фотопериоде, влажности воздуха 70 %.

4. Результаты укоренения оценивают через 1–4 недели.

5. Делают рисунки и соответствующие выводы.

#### ***Работа 10.5. Оздоровление посадочного материала методом термо- и химиотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем***

В случае заражения посадочного растительного материала вирусами применяют метод термо- и химиотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем. Клубни без бактериальных и грибковых инфекций размещают в кюветах со стерильным песком и проращивают 1–2 недели при температуре 28–30 °С, затем 4 недели при температуре 37–38 °С и влажности воздуха 70–80 %. Дважды в день песок увлажняют, через 7-10 дней проводят подкормку раствором Кнопа. Режим тепловой обработки для каждого сорта подбирают экспериментально.

В случаях заражения растений мозаичными, веретеновидными, нитевидными, палочковидными вирусами термическая обработка малоэффективна. Поэтому дополнительно используют биотехнологические методы – метод апикальных меристем. Термообработку обычно проводят осенью и зимой. Весной из растений вычленивают пазушные почки от 0,3 до 1 мм и высаживают на питательные среды (МС без гормонов, рН 5,7).

Для химиотерапии используют специальные вещества –ингибиторы вирусов: ферменты, влияющие на нуклеиновые кислоты (РНК-азы). Непосредственную обработку клубней ферментом можно проводить методом инфильтрации в вакуумной камере в течение 20 минут, что приводит к большому расходу вещества. Поэтому эффективнее добавлять РНК-азы в питательные среды для культивирования апексов.

РНК-аза стимулирует рост и развитие растений из апексов и ингибирует развитие вирусов.

В результате применения такой технологии выращивания на 10–35 % повышается приживаемость меристем на питательных средах, на 30–40 % больше образуется растений-регенерантов.

**Материалы и оборудование:** клубни картофеля, кюветы с песком, флаконы с водой, кюветы с проращенными и прошедшими термотерапию растениями, ламинар-бокс, бинокулярный микроскоп МБС-9 или МБС-10, стерильные скальпели, препаровальные иглы, флаконы с 96 % спиртом, хлорамином, спиртовки, пробирки с питательными средами.

### **Ход работы**

1. Здоровые клубни картофеля тщательно промыть проточной водой.

2. Клубни обработать стерилизующим раствором (спирт, хлорамин), промыть проавтоклавированной водой.

3. Вырезать глазки с частью паренхимы (1,5 × 1,5 см) и поместить в кюветы для проращивания и термотерапии.

4. Провести термотерапию: проращивать ростки 1–2 недели при температуре 28–30 °С, затем 4 недели при температуре 37–38 °С и влажности воздуха 70–80 %. Дважды в день песок увлажнять, через 7–10 дней провести подкормку раствором Кнопа.

5. Проростки, прошедшие термотерапию, поместить в 6 % раствор хлорамина на 5 минут, промыть стерильной дистиллированной водой.

6. В ламинар-боксе под микроскопом вычленив апикальные меристемы и поместить их в пробирки с питательными средами.

7. Весь растительный материал перенести в культуральную комнату. Условия культивирования: температура 25–26 °С, влажность воздуха 70–80 %, освещенность 5 клк, 16-часовой фотопериод.

8. Результаты зарисовать через 4 – 8 недель.

9. Оценить эффективность термотерапии (%). Эффективность рассчитать как отношение здоровых культивируемых растений к исходному количеству апикальных меристем, подвергшихся термотерапии, выраженному в процентах.

### **Контрольные вопросы:**

1. Что называют микроклональным размножением растений?

2. Какие существуют методы микроклонального размножения растений?

3. В чем преимущество метода микроклонального размножения в сравнении с традиционными методами размножения растений?

4. На чем основан метод культивирования апикальных меристем?
5. На чем основан метод культивирования пазушных меристем?
6. Что такое апикальное доминирование? Какие фитогормоны регулируют данный процесс?
7. Чем отличается прямой эмбриодогенез от соматического эмбриодогенеза?
8. Как осуществляется оздоровление посадочного материала?
9. На чем основан метод химиотерапии?
10. На чем основан метод термотерапии?

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

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

**Андрогенез** – процесс получения растений-регенерантов из пыльников или пыльцы (т. е. мужских половых клеток растения)

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

**Апекс** – верхушечная часть стебля или корня.

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

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

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

**Геммогенез** – процесс формирования и развития почек в условиях *in vitro* на каллюсной ткани или непосредственно на экспланте.

**Гиббереллины** – фитогормоны (ГК и др.), активизирующие рост стеблей за счет удлинения междоузлий, стимулирующие прорастание семян.

**Гибридизация соматическая** – процесс слияния изолированных протопластов, т. е. соматических клеток.

**Гиногенез** – процесс получения растений-регенерантов из зародышевых мешков (т. е. женских половых клеток растения).

**Гистогенез** – одна из форм проявления морфогенеза *in vitro* – процесс формирования тканей.

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

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

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

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

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

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

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

**Клон** – культура, возникшая из одной клетки.

**Компетенция** – способность клетки, ткани, органа воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать или не реагировать изменением развития.

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

**Культура изолированных протопластов** – выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризованной питательной среде.

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

**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 «нянька»** – каллюсная культура, которая используется как субстрат (источник «фактора кондиционирования») при культивировании культуры одиночных клеток

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

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

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

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

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

**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*.

**Органогенез** – одна из форм проявления морфогенеза *in vitro* – процесс формирования органов.

**Пассирование (субкультивирование)** – процесс периодической пересадки кусочка каллюса на свежую питательную среду для поддержания пересадочной каллюсной культуры

**Пластом** – совокупность генетической информации пластидной системы растительной клетки

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

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

**Растение – регенерант** – растение, полученное в результате реализации морфогенеза *in vitro*.

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

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

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

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

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

**Соматическая (парасексуальная) 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.

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

**Среда питательная** – среда для культивирования растительных клеток, тканей органов в стерильных условиях *in vitro*, содержащая набор макро- и микроэлементов, источник углеводного питания, витамины и регуляторы роста; бывает жидкая или твердая.

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

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

**Тератомы** – формирование морфологически аномальных, уродливых органов растений при культивировании *in vitro*.

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

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

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

**Химера** – организм-мозаик, который сочетает в себе клетки, ткани, органы разных организмов (пример: животное + растение).

**Цибрид** – растение, полученное при слиянии двух изолированных протопластов, ядерный материал одного из которых полностью элиминирован.

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

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

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

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

**Эмбриоид** – зародышеподобная структура, возникающая из соматических клеток

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

**Эпигенез** – процесс последовательной реализации генотипа в изменяющихся фенотипических условиях среды. В генетике развития сумма всех взаимодействий между генами и средой их функционирования в процессе онтогенеза и в ряду дифференцированных клеток.

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

**Эуплоид** – ядро, клетка, организм с числом хромосом, кратным  $n$ .

**Ex planta** – «вне растения» – биологический процесс, форма биологического анализа в органе, части организма, клетке, вычлененной из растения.

**In planta** – «внутри целостного растения» - биологический процесс или биологический анализ в целостном растении.

**Ex vitro** – перенесение культур *in vitro* в неасептические условия

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

**In vivo** – «внутри живого организма» – биологический процесс или биологический анализ в целостном живом организме.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Бабикова А. В., Горпенченко Т. Ю., Журавлев Ю. И. Растение как объект биотехнологии // Комаровские чтения. – Вып. LV. – 2007. – С. 184-211.
2. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.
3. Глазко В. И., Глазко Г. В. Русско-украинский толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике. – К.: Нора-принт, 2000. – 464 с.
4. Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Клеточная инженерия растений. – К.: Наук. думка, 1984. – 160 с.
5. Евтушенко А. Н., Фомичев Ю. К. Введение в биотехнологию: Курс лекций. – Минск: БГУ, 2002. – 105 с.
6. Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. – К.: Наук. думка, 1980. – 488 с.
7. Калинин Ф. Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В. В. Технология микрклонального размножения растений. – К.: Наук. думка, 1992. – 232 с.
8. Картель Н. А., Макеева Е. Н., Мезенко А. М. Генетика. Энциклопедический словарь. – Минск: Технология, 1999. – 448 с.
9. Кузьмина Н. А. Основы биотехнологии // <http://www.biotechnolog.ru/pcell>, 2005.
10. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
11. Лутова Л.А. Биотехнология высших растений. – СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2003. – 228 с.
12. Мусієнко М. М., Панюта О. О. Культура ізольованих клітин, тканин і органів рослин. – Київ: Фітосоціоцентр, 2001. – 48 с.
13. Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей: Учебное пособие / Составители: Сорокина И. К., Старичкова Н. И., Решетникова Т. Б., Гринь Н. А. – Изд-во СГУ, 2002. – 51 с.
14. Полевой В. В., Чиркова Т.В., Лутова Л. А. Практикум по росту и устойчивости растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербур. ун-та, 2001. – 212 с.

Навчальне видання

**Авксентьєва** Ольга Олександрівна  
**Петренко** Вікторія Анатоліївна

**БІОТЕХНОЛОГІЯ ВИЩИХ РОСЛИН: КУЛЬТУРА *IN VITRO***  
Навчально-методичний посібник

(Рос. мовою)

Коректор М. С. Хащина  
Комп'ютерна верстка В. А. Петренко  
Макет обкладинки І. М. Дончик

Видавець : виготовлювач Харківський національний університет  
імені В. Н. Каразіна  
61077, м. Харків, пл. Свободи, 4. Видавництво. Тел. : 705-24-32

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3367 від 19.01.2009