

ПРИДНЕСТРОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. Т.Г.ШЕВЧЕНКО

Естественно-географический факультет
Кафедра генетики и зоологии

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методические рекомендации

Тирасполь
2011

Составитель: канд. с-х наук, доц. **Т.Н. Звездина**

Рецензенты: канд. биол. наук, доц. **С.И. Филипенко**
канд. с-х наук, доц. **Н.Н. Трескина**

Утверждено решением НМС ПГУ им. Т.Г.Шевченко
от 7 декабря 2011 г., протокол № 4

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология – это наука о клеточных и генно-инженерных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения.

Биотехнология как наука формировалась на базе таких дисциплин, как молекулярная биология, генетики, цитология, биохимия, физиология, микробиология, селекции, информатика. Все направления биотехнологических исследований основаны на культивировании живых клеток различных организмов в условиях *in vitro* и нацелены на определение принципов и разработку методов управления процессами жизнедеятельности клеток.

В настоящее время биотехнология охватывает различные сферы человеческой деятельности: медицину, промышленность, сельское хозяйство. Благодаря возможностям биотехнологии можно существенно интенсифицировать производство, повысить эффективность использования природных ресурсов, создавать новые источники энергии, решать проблемы, связанные с восполнением дефицита белка. Клеточная и тканевая биотехнология, а также генетическая инженерия растений – перспективные направления размножения, сохранения и увеличения генетического разнообразия растений.

Цель практикума – ознакомить студентов с биотехнологическими методами и привить навыки работы в лаборатории биотехнологии.

Задачами практикума являются:

- знакомство с требованиями, предъявляемыми к лабораториям биотехнологических исследований;
- освоение методик приготовления питательных сред, способов стерилизации питательных сред, растительного материала;
- знакомство с методиками клонального микроразмножения растений;
- знакомство с методами создания трансгенных растений.

При завершении практикума студенты должны обладать следующими теоретическими знаниями и практическими навыками:

- знать способы стерилизации помещений, посуды, инструментов, питательных сред, растительного материала;

- уметь подбирать оптимальные условия культивирования растений in vitro;
- освоить технологии:
 - приготовления питательных сред;
 - получения растительных эксплантов;
 - пассирования каллусных тканей;
 - клонального микроразмножения растений;
- знать этапы клонального микроразмножения растений;
- иметь представление о приемах и способах направленного синтеза биологически активных веществ микроорганизмами;
- знать технологию бактериальной трансформации растений.

**Тема: Основные требования к лаборатории
по проведению биотехнологических работ**

Общие сведения. Культивирование клеток и тканей *in vitro* предполагает выполнение определенных этапов работ в специализированных помещениях, основными из которых являются следующие:

1. Лаборатория для работы с химическими реактивами – предназначена для приготовления питательных сред
2. Бокс – предназначен для введения растительного материала в культуру *in vitro* и пересадки микрокультуры
3. Культуральная комната – используется для выращивания растительных тканей в условиях *in vitro*.
4. Автоклавная – предназначена для стерилизации питательных сред, инструментов и вспомогательных материалов
5. Комната для мытья и стерилизации химической посуды

Проведение биотехнологических исследований требует определенного набора оборудования.

Оборудование для химической лаборатории:

- аналитические весы
- электронные весы
- рН-метр
- холодильник

Оборудование для бокса:

- бактерицидные лампы
- ламинар-боксы
- бинокулярные лупы
- микроскопы

Оборудование для культуральной комнаты:

- световые установки
- качалки для суспензионных культур
- кондиционеры
- увлажнители воздуха
- установка для автоматического поддержания заданного фотопериода, температурного режима и уровня влажности воздуха

Оборудование для автоклавной:

- автоклавы
- бьюксы для размещения стерилизуемых объектов

Оборудование помещения для мытья и стерилизации посуды:

- дистиллятор

- водонагреватель
- сушильные шкафы
- шкафы для хранения химической посуды

Представленный перечень помещений и оборудования является минимально необходимым и претерпевает изменения и дополнения в зависимости от направления исследований *in vitro*.

Материалы, инструменты, посуда, необходимые для проведения работ по биотехнологии

Для приготовления и выращивания растений в культуре *in vitro* применяют стеклянную посуду. В работе обычно используют:

- колбы Эйленмейера (конические) на 0,5; 1; 2; 3; 5 л;
- колбы мерные на 50, 100, 200, 250, 500 мл и 1 л;
- стаканы химические на 50, 100, 200, 250, 500 мл и 1 л;
- цилиндры мерные вместимостью от 10 мл до 1 л;
- пробирки биологические (длиной 20 см, диаметром не менее 20 мм);
- банки стеклянные из темного стекла для хранения маточных растворов на 0,5, 1 и 2 л;
- стаканы стеклянные для стерилизации растительного материала на 150...250 мл;
- чашки Петри;
- бутылки для хранения дистиллированной воды;
- микропипетки объемом от 0,001 до 1,0 мл с носиками к ним;
- пипетки объемом от 0,1 до 5 мл (можно использовать одноразовые стерильные шприцы на 1...20 мл);
- спиртовки

Для работы с культивируемым материалом обычно используют биологические пробирки с ватными пробками. Ватные пробки изготавливают из негигроскопичной нестерильной ваты и марли. Вместо ватных пробок можно использовать парафилм или полиэтиленовую пленку

Для размещения пробирок с культивируемым материалом обычно используют штативы. Количество штативов должно соответствовать количеству и диаметру пробирок.

В настоящее время используют как одноразовые (стерильные), так и многоразовые скальпели, пинцеты.

Выращивание и поддержание культур *in vitro* требует обеспечения постоянного температурного режима, определенного уровня влажности, а также заданной интенсивности и продолжительности светового периода. Все эти параметры определяются типом культивируемого объекта и задачами эксперимента.

Следует помнить, что работа в биотехнологической лаборатории требует строгого соблюдения правил техники безопасности.

Правила по технике безопасности при работе в биотехнологической лаборатории

При проведении работ нужно соблюдать общие правила техники безопасности:

1. К выполнению работы студенты могут приступать только после инструктажа по технике безопасности.

2. Для соблюдения стерильности студенты должны работать в белом халате.

3. Лаборатория должна быть оснащена медицинской аптечкой для оказания первой помощи.

4. Категорически запрещено:

- пробовать какие-либо вещества на вкус
- выливать в раковины остатки стерилизующих веществ, отработанные питательные среды

- при взвешивании запрещено насыпать химические вещества непосредственно на чашу весов

- при нагревании жидкостей и твердых тел в химической посуде направлять отверстие сосуда на себя или соседей

- работать в ламинар-боксе при включенной ультрафиолетовой лампе

5. Спиртовую горелку следует заправлять спиртом вдали от открытых источников огня, не допускать сильного нагревания резервуара, не оставлять зажженную спиртовку без присмотра.

6. При попадании кислоты (хромпика) на кожу необходимо немедленно смыть ее водой и обработать пораженные участки тела мыльным раствором.

7. При попадании щелочи на кожу необходимо немедленно смыть ее водой, остатки щелочи нейтрализовать небольшим количеством буфера для нейтрализации.

8. При возникновении пожара следует немедленно отключить электроприборы, засыпать песком или накрыть одеялом очаг возгорания, большое пламя тушить с помощью огнетушителя. О пожаре следует немедленно сообщить дежурному пожарной охраны.

Цель работы. Ознакомиться:

- с основными требованиями к организации биотехнологической лаборатории;

- с техническими параметрами используемого оборудования и правилами работы на нем;

- с основными реактивами, применяемыми при проведении биотехнологических исследований;

- с правилами техники безопасности при работе в лаборатории;



Рис. 1 Ламинар-бокс



Рис. 2 Световая установка для культивирования экспериментального материала

– проведением экономических и производственных расчетов при создании биотехнологической лаборатории

Материалы и оборудование:

- аналитические весы,
- электронные весы,
- рН-метр,
- ламинар-бокс,
- дистиллятор,
- автоклав,
- сушильные шкафы,
- качалки для суспензионных культур,
- химическая посуда и инструменты.

Порядок проведения работы. Знакомство с биотехнологической лабораторией, параметрами и правилами работы на оборудовании, основными реактивами, применяемыми при проведении исследований *in vitro*, правилами техники безопасности.

Экономические и производственные расчеты

При создании лаборатории нужно знать:

- цель создания лаборатории (например, микрклональное размножение растений или создание новых форм);
- предполагаемое конечное количество размноженных растений в год;
- перечень культур;
- средний коэффициент размножения выбранных растений (например, для хризантем 15...20 растений за один пассаж, где пассаж составляет 40...45 дней);
- число сотрудников (при средней работоспособности один сотрудник может пересаживать от 15 до 30 тыс. растений ежемесячно с соблюдением условий стерильности);
- распределение обязанностей и размещение сотрудников

Только зная все вышеизложенное, можно правильно рассчитать площадь, штатные единицы, сроки получения посадочного материала, финансовые затраты на открытие лаборатории.

Например, для создания биотехнологической лаборатории, целью которой является получение посадочного материала при предполагаемой производительности лаборатории 1 млн. растений ежегодно, необходимо следующее.

1. Закупить оборудование (для выполнения всех работ, за исключением работ по адаптации микрорастений), у.е.*:

Дистилятор Д-10 (2 шт.)	600
Автоклав российского производства (1 шт.)	3000
Ламинар-бокс (6 шт.)	19200
Сушилка для посуды (2 шт.)	2000
Инструмент (10 наборов)	1000
Биологическая посуда (выбор по ассортименту)	500
Стеллажи (в зависимости от материалов и типа светильников)	20000

* Без подключения и мебели (в том числе шкафов для хранения посуды, химических реактивов и расходных материалов).

2. Приобрести расходные материалы, у.е.:

Питательная среда МС (минимум 24000 л в год)	21000
Спирт (700 л в год)	2335
Пленка	2000
Крафт-бумага	300
Вата, марля	300
Моющие агенты, ершики, губки и т.д.	50

3. Рассчитать площадь* световой комнаты (для выращивания растительного материала в условиях *in vitro*), м²:

Одна полка	625
Две полки	312,5
Три полки	208,4
Четыре полки	156,3

* Под площадью понимают «чистую рабочую» поверхность (пространство, которое занято микрокультурой, без проходов).

4. Рассчитать необходимое количество персонала. Для получения 1 млн растений в год лаборатория должна быть оснащена 8... 10 штатными единицами (2...4 лаборанта и 6...8 научных сотрудников). Персонал лаборатории не занимается адаптацией пробирочных микрорастений к почвенным условиям.

5. Рассчитать сроки получения растений. При введении в культуру *in vitro* продолжительность первого этапа работы составляет около 2 мес. – время, которое затрачивается на адаптацию первичных эксплантов к условиям *in vitro*. На адаптацию к почвенным условиям отводят 1 мес.

Задача 1. Рассчитать какое количество регенерантов можно получить в год при определенном коэффициенте размножения (К) данного вида растения (К находят по литературным источникам).

Дано: К = 5, длительности пассажа (субкультивирования) Р = 35...45 дней.

Решение. Рассчитаем количество пассажей. Так как в году 12 мес., то 12 мес. - 2 мес. (на введение в культуру тканей) -1 мес. (на адаптацию) = 9 мес.

Оставшиеся 9 мес. делим на количество дней в пассаже (45) и получаем 6 пассажей (Рр).

Так как материал нарастает в геометрической прогрессии, то коэффициент размножения $K^{Pp} = 5^6 = 15\,625$. Из этого следует, что из одного первичного экспланта теоретически можно получить 15 625 микрорастений.

При расчете коэффициента размножения необходимо учитывать, что во время адаптации растений к почвенным условиям в среднем 20...30% материала может погибнуть.

Задача 2. Рассчитать, сколько необходимо затратить времени на получение 100 000 регенерантов при К = 6.

Решение. Сначала подсчитываем количество растений, которое надо вырастить. Так как гибель растений при адаптации составляет примерно 20 %, то надо вырастить 120 000 растений. Затем данное количество растений делим на коэффициент размножения (6):

1) $120\ 000 : 6 = 20\ 000$

2) $20\ 000 : 6 = 3334$

3) $3\ 334 : 6 = 556$

4) $556 : 6 = 93$

5) $93 : 6 = 15,5$ (16)

6) $16 : 6 = 3$

Таким образом, для того чтобы получить 120 000 растений, необходимо осуществить 6 пассажей на этапе микроразмножения. Для этого количество первичных эксплантов должно быть равно 3 шт. (или 6 шт. при проведении 5 пассажей).

Далее рассчитываем весь цикл технологии: 6 пассажей на микроразмножение + 2 мес. (на введение в культуру тканей) + 1 мес. (на адаптацию к почвенным условиям).

Известно, что продолжительность одного пассажа составляет 40...45 дней. Следовательно, $6 \times 45 \text{ дней} + 3 \text{ мес.} = 270 \text{ дней} + 90 \text{ дней} = 360 \text{ дней}$

Для получения 100 000 микрорастений потребуется около 360 дней.

Лабораторная работа № 2

Тема: Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений

Общие сведения. Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы (азот, фосфор, калий, кальций, серу, магний, железо), микроэлементы (бор, цинк, медь, марганец и др.), а также витамины, углеводы, фитогормоны или их синтетические аналоги. Некоторые питательные среды включают гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль (трилон Б), которые переводят железо в доступное для клеток состояние в широких пределах pH.

Углеводы – незаменимые компоненты питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние не способны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве источника углерода используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 2...4 %. Полисахариды, как правило, не применяют, но поскольку некоторые ткани, например опухолевые, содержат активные гидролитические ферменты (амилазу и др.), они могут расти на средах с растворимым крахмалом.

Фитогормоны необходимы для дедифференцировки клеток и индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред следует обязательно включать ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление дедифференцированных клеток. В случае индукции стеблевого морфогенеза содержание ауксинов можно снизить или полностью исключить. На безгормональной среде растут опухольные и «привыкшие» клетки. Автономность по отношению к обоим гормонам или к одному из них связана со способностью этих клеток продуцировать гормоны.

В качестве источников ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), β -индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), α -нафтилуксусную кислоту (НУК). ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д. Для индукции каллуса необходимо применять ауксины (чаще это 2,4-Д) в высоких концентрациях. При последующих пересадках их концентрацию уменьшают.

В качестве источников цитокининов в питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП), 2-изопентенил-аденин (*2ip*), зеатин. Зеатин и БАП по сравнению с кинетином более активны при поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза. В состав некоторых питательных сред входит аденин.

Кроме веществ ауксинового и цитокининового механизма действия в отдельные питательные среды включают гибберелловую кислоту (ГК), присутствие которой в среде необязательно, но в некоторых случаях она стимулирует рост изолированной ткани.

Для индукции первичного каллуса и, реже, для поддержания его пролиферативной активности в состав питательной среды иногда вводят растительные экстракты. Наибольшей ростактивирующей способностью обладает кокосовое молоко – жидкий эндосперм кокосового ореха.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар – полисахарид, получаемый из морских водорослей. Наименьшее количество нежелательных примесей содержит бактериальный агар (*Bacto Agar*). Обычно концентрация агара в среде составляет 0,7 %.

С целью рационального использования времени растворы макро- и микросолей, витаминов и фитогормонов готовят более концентрированными. Концентрированные (маточные) растворы хранят в холодильнике (растворы витаминов хранят при отрицательной температуре).

Для культивирования клеток, тканей и органов растений используют питательные среды различного состава. Наиболее широко применяют среды Мурасиге-Скуга (МС), Уайта, Гамборга (B_5) (таблица 1)

Таблица 1

**Состав питательных сред для культивирования
изолированных тканей растений**

Компоненты питательной среды	Питательные среды			
	Мурасиге- Скуга (МС)	Гамборга (В ₈)	Уайта	Грессхофф и Доу (ГД)
	Концентрация, мг/л			
Na ₂ SO ₄	—	—	200	—
Ca(NO ₃) ₂	—	—	200	—
NH ₄ NO ₃	1650	2500	—	—
KNO ₃	1900	—	80	1000
KCl	—	—	65	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	150	—	150
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	360	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	130	—	200
KH ₂ PO ₄	170	—	16,5	—
Na ₂ ЭДТА	37,3	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,95	27,95	27,95	27,8
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	—	150	—	90
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	1,5	3,0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	10,0	4,5	10,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	2,0	1,5	3,0
KI	0,83	0,75	0,75	0,75
Fe ₂ (SO ₄) ₃	—	—	2,5	—
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,0025	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,02	0,25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	—	0,25
Глицин	2	—	3,0	2,0
Мезоинозит	100	100	10	10
Никотиновая кислота	0,5	1,0	0,5	1,0
Пиридоксин – HCl	05	1,0	0,1	0,1
Тиамин — HCl	1	10,0	0,1	0,1
Сахароза	30000	30000	20000	20000

Цель работы. Ознакомиться с:

- принципами составления питательных сред
- основными группами веществ, входящими в состав питательных сред
- составом основных питательных сред
- методикой приготовления питательной среды

Материалы и оборудование:

- стаканы химические на 1 л (4 шт.),
- мерные цилиндры на 500 мл и 1 л (2 шт.),
- колбы с притертыми пробками для хранения маточных растворов (на 1 л — 2 шт., на 500 мл — 2 шт., на 100 мл — 5 шт.),
- пластиковые флаконы (10 шт.),
- мерные пипетки на 10, 5 и 1 мл,
- весы электронные,
- весы аналитические,
- электроплитка,
- химреактивы.

Порядок выполнения работы. Приготовление питательной среды Мурасиге-Скуга (МС).

1. Маточные растворы солей готовят на дистиллированной воде.
2. Каждую навеску макросолей растворяют в отдельном стаканчике при нагревании.

Исключение: не нагревают раствор $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

3. Приготовленные растворы макросолей сливают в колбу и объем доводят до 1 л. Раствор $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ вливают последним в охлажденную смесь, что предотвращает выпадение осадка. **Исключение:** соль CaCl_2 готовят и хранят отдельно

4. Хелат железа (раствор FeSO_4 и $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$) готовят при нагревании и хранят отдельно.

5. Каждую соль микроэлементов растворяют отдельно и сливают в общий стаканчик, а объем доводят до 500 мл.

6. Полученные растворы макро- и микроэлементов сливают в колбы с притертой пробкой (хелат железа — в колбу из темного стекла), наклеивают этикетку и помещают в холодильник.

7. Для приготовления концентрированных растворов витаминов берут 10-кратные навески и растворяют их (каждый витамин в отдельности) в 10 мл воды. Хранят растворы в замороженном состоянии.

1 мл маточного раствора содержит концентрацию витамина, необходимую для приготовления 1 л раствора по прописи Мурасиге-Скуга.

8. Растворы фитогормонов готовят следующим образом:

- берут 10 мг вещества и растворяют;
- ауксин (2,4-Д, ИУК, НУК) в 0,5...2,0 мл этанола;
- цитокинин (кинетин, зеатин, БАП, *2ip*) в небольшом количестве 0,5 н. HCl или КОН,

- абсцизовую кислоту (АБК) в 70%-ном этаноле.

Затем объемы растворов доводят водой до 100 мл, таким образом, в 10 мл раствора содержится 1 мг гормона.

Маточные растворы фитогормонов можно хранить в холодильнике при температуре 4°C не более 1 месяца.

На основе маточных растворов готовят питательную среду МС.

Для приготовления питательной среды в химический стакан вместимостью 1 л помещают 30 г сахарозы, доливают дистиллированной водой примерно до 400 мл и после растворения сахарозы вносят необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей (табл. 2), витаминов и гормонов, после чего проверяют pH раствора. Если pH превышает 5,5...5,6, в питательную среду вносят 0,1%-ный раствор КОН. Одновременно в другом стакане нагревают предварительно замоченный для набухания агар-агар, осторожно помешивая до полного растворения, затем агар смешивают с приготовленными растворами и доводят объем до 1 л.

Таблица 2

Состав маточных растворов по прописи МС

№ п/п	Компоненты питательной среды	Навеска реактива, г	Количество маточного раствора (мл) для приготовления 1 л питательной среды
Макросоли, г на 1 л маточного раствора			
1	KNO ₃	38	50
2	NH ₄ NO ₃	33	
3	KH ₂ PO ₄	3,4	
4	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,4	
5	CaCl ₂ · 2H ₂ O	8,8	50
Микросоли, мг на 500 мл маточного раствора			
1	H ₃ BO ₃	620	5
2	MnSO ₄ · 2H ₂ O	2230	
3	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860	
4	KI	83	
5	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25	
6	CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5	
7	CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,5	
Хелат железа, мг на 500 мл маточного раствора			
1	FeSO ₄	2795	5
2	Na ₂ ЭДТА	3730	

Приготовленную питательную среду разливают в пробирки, стеклянные банки или колбы (примерно на треть объема), закрывают ватными пробками или алюминиевой фольгой и стерилизуют в автоклаве.

Лабораторная работа № 3

Тема: Методы стерилизации оборудования, питательных сред и растительных объектов при проведении работ с культурой изолированных клеток и тканей растений

Общие сведения. Необходимым условием работы с культурой изолированных клеток и тканей является соблюдение строгой стерильности. В таких помещениях как бокс и культуральная комната должно осуществляться периодическое обеззараживание поверхностей стен и пола с помощью моющих и дезинфицирующих средств, а также стерилизация воздуха с помощью ультрафиолетовых ламп, которые включаются в нерабочее время. Помимо этого в боксах, как правило, используются ламинар-боксы, которые дополнительно очищают воздух, пропуская его через систему фильтров разной степени очистки, создавая ламинарный поток стерильного воздуха, подаваемого на рабочую поверхность стола. Рабочая поверхность стола перед началом работы обрабатывается 70%-ным спиртом.

Работа с культурой изолированных клеток и тканей также требует соблюдения стерильности питательной среды, инструментов, посуды и самого материала, первично переводимого в культуру *in vitro*.

Посуду тщательно моют с использованием детергентов, а также раствора хромпика. Вымытую посуду трижды ополаскивают дистиллированной водой и помещают в сушильный шкаф.

Стеклянную посуду, инструменты обычно стерилизуют в сушильных шкафах сухим горячим воздухом при температуре 140° С - 160° С в течение 2 часов с момента установления нужной температуры. За это время погибают не только бактерии, но и их споры. Еще более строгой стерилизации можно добиться под давлением в автоклаве, поскольку влажный жар более губителен для микроорганизмов и спор патогенов. Автоклавируют под давлением 2 атм. в течение 25...30 мин. Металлические предметы нельзя автоклавировать, т.к. под действием пара они ржавеют и тупятся.

Для сохранения стерильности перед помещением в сушильный шкаф или автоклавированием колбы, стаканы закрывают крышечками из фольги и плотной (крафт) бумаги, инструменты, чашки Петри и другие материалы упаковывают в оберточную плотную бумагу (крафт). После стерилизации

посуду и инструменты переносят в бокс, где они могут быть еще дополнительно поверхностно обработаны ультрафиолетовым облучением при стерилизации помещения.

Во время работы предварительно простерилизованные инструменты опускают в стакан с 96% спиртом и обрабатывают в пламени горелки. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Перед каждым повторным использованием инструмент опять опускают в спирт и обжигают.

Материалы и оборудование (вата пробки, марля, дист. вода, фильтры) также стерилизуются в автоклаве под давлением 2 атм. в течение 25...30 мин.

На искусственных питательных средах хорошо развиваются микроорганизмы, что представляет двойную опасность. Во-первых, в результате жизнедеятельности микроорганизмов может существенно измениться состав питательных сред. Во-вторых, изолированные от растения ткани, клетки и в особенности протопласты легко повреждаются микроорганизмами. Поэтому разлитые в пробирки или стеклянные колбы питательные среды закрывают ватными пробками или фольгой, заворачивают плотной бумагой или целлофаном и автоклавируют при температуре 120 °С, давлении 1 атм в течение 20 мин.

Органические жидкости, не поддающиеся тепловой обработке, гормоны освобождают от бактерий путем пропускания их через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

Для стерилизации семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют следующие растворы:

- 0,1%-ной сулемы (дихлорид ртути);
- 0,1%-ного диацета;
- 13...20%-ного пероксида водорода;
- 10%-ного хлорамина;
- 8%-ного гипохлорита натрия или кальция.

Перед стерилизацией ткань растения предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, снимают кожуру (у корней и корнеплодов), кроющие чешуи (у листьев), промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд (семена на 1...2 мин) в 70%-ный этиловый спирт. При обработке тканей этанолом повышается эффективность основного стерилизующего раствора. Затем растительные объекты многократно прополаскивают в стерильной воде.

Пероксид водорода рекомендуется использовать для фасоли, люпина, подсолнечника (с очищенной кожурой), сулему — для томатов, тыквы и др.

Продолжительность стерилизации семян сулемой составляет 10... 15 мин, перексидом водорода — 30 мин, для меристем и кусочков тканей требуется примерно в два раза меньше времени. Опушенные семена (хлопчатника) обрабатывают концентрированной серной кислотой в течение 5 мин. Легче всего семена отмываются от пероксида водорода. После сулемы и диацида воду меняют 5...6 раз.

Семена томатов, яблоны, тыквы, бобов и табака ко времени созревания заключены в мясистые, деревянистые или костянквидные покровы. Поэтому здоровые, с неповрежденной поверхностью плоды этих культур тщательно промывают мыльной водой и несколько раз — спиртом, после чего в строго асептических условиях их разрезают. Стерильным пинцетом вынимают семена и помещают их в стерильные чашки Петри для проращивания.

Продолжительность стерилизации растительного материала приведена в таблице 1.

Таблица 1

Продолжительность стерилизации исходного растительного материала (мин.) (по Р. Г. Бутенко, 1999)

Объект	Диацид 0,1%-ный	Сулема 0,1%-ная	Гипохлорит Na 5...9%- ный	Пероксид водорода 12%-ный
Семена сухие	15...20	10...15	15...20	12...15
Семена набухшие	6...10	6...8	10...15	6...8
Ткани мясистого корня, клубня, стебля	20...30	15...25	15...20	—
стебля одревесневшего	20...40	20...25	20...25	—
Листья	1...3	1...3	3...6	3...5
Апексы	1...10	1...7	3...15	2. 7

Цель работы. Ознакомиться с:

- условиями работы с культурой изолированных клеток и тканей
- методами обеспечения стерильности помещений, питательных сред, экспериментального материала и др.

Материалы и оборудование:

- чашки Петри (10 шт., в том числе одна — с фильтровальной бумагой),
- стаканы химические на 300...500 мл (4 шт.),
- колбы на 0,5 л с дистиллированной водой (2 шт.),
- пробирки или колбы с питательной средой,

- пинцеты, скальпели (4 шт.), ножницы
- целлофан, шпагат, крафт-бумага.

Порядок выполнения работы. Проводят стерилизацию инструментов, посуды и питательных сред, необходимых для проведения работ по клеточной инженерии.

Стекланную посуду (чашки Петри, химические стаканы) и инструменты (скальпели, пинцеты), завернутые в плотную крафт-бумагу, стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу в течение 2 часов при температуре 140° С - 160° С.

В автоклаве стерилизуют колбы с дистиллированной водой (в колбу наливают треть объема дистиллированной воды, закрывают ватной пробкой или фольгой, а сверху — плотной бумагой и целлофаном). Автоклавируют под давлением 2 атм. в течение 30 мин.

Пробирки с питательной средой, закрытые ватными пробками, также стерилизуют в автоклаве в течение 20 мин под давлением 1 атм.

Лабораторная работа № 4

Тема: Получение стерильных эксплантов

Общие сведения. Получить стерильный растительный материал часто бывает достаточно трудно, что связано с необходимостью правильного выбора стерилизующего агента и времени экспозиции. Помимо стерилизаторов, содержащих активный хлор или ртуть, которые наиболее часто применяются, в культуре *in vitro* могут использоваться и антибиотики в концентрации 4...5 мг/л.

Стерилизующее вещество должно обеспечивать наибольший процент неповрежденных тканей, способных к росту и новообразованиям, при наименьшем проценте инфекции.

Источником эксплантов могут служить как семена растений, так и их проростки.

В зависимости от задачи эксперимента семена проращивают на воде или на агаризованной питательной среде.

Экспланты могут быть использованы для получения каллусной ткани или прямой регенерации растений.

Цель работы. Ознакомиться с методами стерилизации растительных эксплантов.

Материалы и оборудование:

- семена огурца, пшеницы, подсолнечника, гороха, фасоли и др. (20 шт.);
- стерильные чашки Петри с одним-двумя слоями фильтровальной бумаги,
- коническая колба на 300..500 мл, дно которой покрыто ватой или фильтровальной бумагой,
- химические стаканы (5 шт.),
- пробирки, пинцеты, ножницы, марлевые мешочки;
- колбы со стерильной дистиллированной водой (3 шт.);
- пробирки с питательной средой МС (1/2 нормы) без гормонов;
- 0,1%-ный раствор сулемы или другого стерилизующего агента;
- 96%-ный этиловый спирт; спиртовка; спички.

Таблица

Характеристика методов стерилизации семян огурца и пшеницы

Метод стерилизации	Стерилизующее вещество	Концентрация, % (мл)	Экспозиция, мин и с	Цель стерилизации
Предстерилизация				
Стерилизация				
Постстерилизация				

Порядок выполнения работы:

1. Отбирают по 10 здоровых, одинаковых по размеру семян, тщательно промывают в мыльном растворе, а затем водопроводной и дистиллированной водой.

В ламинар-боксе подготовленные семена помещают в марлевые мешочки и погружают их на 10 с (экспозиция может быть увеличена до 2 мин.) в 96%-ный этиловый спирт, потом в 0,1%-ный раствор сулемы на 10... 15 мин. После этого семена промывают в 3...6 объемах стерильной дистиллированной воды и слегка подсушивают.

Пинцетом раскладывают по 10 семян в чашки Петри (на дно колбы) на один-два слоя фильтровальной бумаги и добавляют по 10... 15 мл стерильной воды, закрывают крышками и парафином.

Подготовленные растительные объекты проращивают в термостате при 25 °С или в световой комнате в течение 2...3 сут.

2. Для получения стерильных проростков на агаризованной безгормональной питательной среде МС в одну пробирку помещают по одному семени. Пробирки, колбы и чашки Петри с семенами ставят в термостат или в световую комнату на 5 дней, где поддерживают температуру 25 °С.

В рабочей тетради зарисовывают схему процесса стерилизации и заполняют таблицу, с указанием стерилизующего агента, его концентрации и времени экспозиции:

Лабораторная работа № 5

Тема: Получение каллусной ткани

Общие сведения. Каллусная культура – это структурно неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т. е. становятся особым образом дифференцированными.

Процесс каллусогенеза зависит от размера первичного экспланта, его места расположения на растении, возраста и состава питательной среды.

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению, а цитокинины – пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток.

Если в питательную среду без гормонов поместить любой растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению.

Каждая клетка проходит три фазы роста:

- деление;
- растяжение;
- дифференцировку.

На заключительной фазе роста происходит утолщение вторичной клеточной стенки и потеря клеткой способности к делению. Для того, чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т. е. клетки как бы возвратились в меристематическое состояние.

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

По анатомической структуре каллусная ткань аморфна, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции:



Рис. 1 Каллусная ткань

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

Каллусная ткань *in vitro* бывает белого или желтоватого, реже светло-зеленого или интенсивно зеленого цвета. Коричневая окраска чаще всего появляется при старении каллусных

клеток и связана с накоплением в них фенолов, которые окисляются в хиноны.

Каллусную ткань можно получить на искусственных питательных средах, включающих фитогормоны, из различных частей растений: стеблей, корней, тканей клубня, листа, зародыша и др. (рис. 2).

Каллусная ткань может быть использована для получения суспензионной культуры, изолированных протопластов, растений-регенерантов, количественного и качественного исследования вторичных метаболитов, а также для исследований по клеточной селекции на устойчивость к неблагоприятным факторам абиотической и биотической природы.

Табак (*Nicotiana tabacum* L.) — классический объект для получения каллусной ткани и дальнейшего ее исследования. Клетки табака легко дифференцируются и переходят к делению, образуя быстрорастущую каллусную ткань. Кроме того, в каллусной ткани табака легко индуцировать регенерацию.

Не менее известным объектом для получения каллусной ткани являются экспланты корнеплодов моркови (*Daucus carota* L.). В 1932 г. французский ученый Готре впервые использовал их для получения каллусной ткани, которая продолжала расти неопределенно долгое время, не утрачивая способность к делению, благодаря пассированию (пересадке) на свежие питательные среды. Образование каллусной ткани происходит в области первичных или вторичных меристем, а также из паренхимы, прилегающей к этим меристемам. Инициация каллуса из паренхимы или камбия активируется при наличии в экспланте зрелой сосудистой ткани.

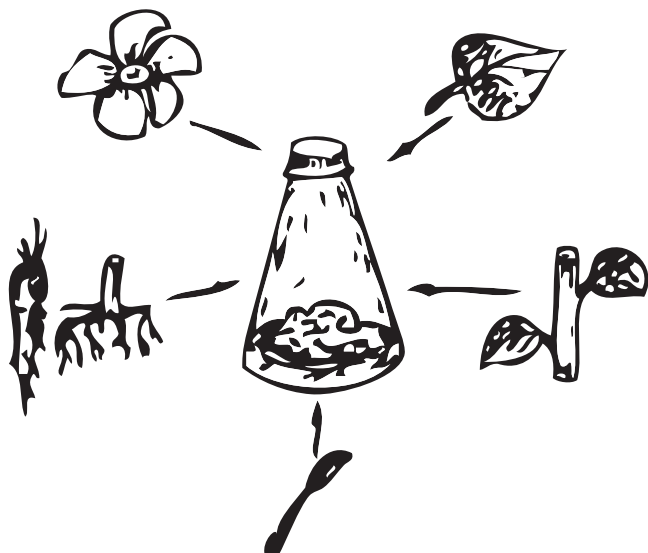


Рис. 2. Получение культуры каллусной ткани из различных эксплантов: сегментов стебля, корня, листа, лепестков, тычинок (по Р. Г. Бутенко, 1999)

Культивирование фрагментов семядолей, листьев и гипокотилей огурца (*Cucumis sativus* L.) на питательных средах определенного состава приводит к следующим морфогенетическим процессам:

- образованию эксплантом первичного каллуса с последующей регенерацией адвентивных почек;
- образованию меристематических очагов в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Каллусная ткань огурца, образованная в условиях *in vitro*, обычно имеет темно-зеленый, темно-желтый или желто-зеленый оттенок в зависимости от выбранного генотипа.

Цель работы. Ознакомиться с:

- составом питательных сред для получения каллусной ткани
- методами и условиями получения каллусных культур
- морфологическими особенностями каллусной ткани

Получение и культивирование каллусной ткани из:

- листьев табака (*Nicotiana tabacum* L.).
- зародышей пшеницы (*Triticum aestivum* L.)
- стерильных проростков подсолнечника (*Helianthus annuus* L.)

- стерильных проростков огурца (*Cucumis sativus* L.)
- корнеплодов моркови (*Daucus carota* L.)

Материалы и оборудование:

- растения табака любого возраста (стерильные или нестерильные);
- замоченные в течение 1 суток зрелые семена пшеницы и семена пшеницы в стадии молочной спелости (на 12-е сутки после опыления);
- стерильные 5...7-дневные проростки подсолнечника
- чашки Петри с 7-дневными стерильными проростками огурца
- корнеплоды моркови
- этанол;
- 0,1%-ный раствор сулемы или диацида,
- стаканы со стерильной водой;
- стерильные марлевые мешочки;
- скальпель, пинцет, стерильные препаровальные иглы, ножницы, пробкоруб;
- парафилм;
- спиртовки, вата.
- чашки Петри
- пробирки, колбы или чашки Петри со стерильной питательной средой МС (табл. 1)

Таблица 1

Состав питательных сред для получения каллусной ткани

№ п/п	Компоненты питательной среды	Эксплант					
		листья табака	зре- лые	незре- лые	проростки		корнеплоды моркови
			зародыши пшеницы		подсол- нечника	огурца	
Минеральные элементы и витамины по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС)							
1.	Сахароза	30000	30000	30000	30000	30000	20000
2.	2,4-Д	1,0	3,0	2,0	4,0	-	2,0
3.	НУК	-	-	-	-	0,1	-
4.	БАП	0,2	0,5	0,2	1,0	0,5	-
5.	Кинетин	-	-	-	-	-	0,2
6.	Мезоинозит	100	100	100	100	-	100
7.	Гидролизат козеина	-	-	-	-	200	-
8.	Глицин	-	-	-	-	100	-
9.	Агар-агар	7000	7000	7000	7000	7500	7000

Порядок выполнения работы:

1. В ламинар-боксе из простерилизованных листьев табака стерильным скальпелем вырезают сегменты длиной 1,5...2 см, шириной 1 см у основания листьев ближе к центральной жилке. Для лучшего каллусообразования делают надсечки (поранения) по всей поверхности листовых сегментов.

Стерильным пинцетом подготовленные участки листьев переносят в пробирки с питательной средой и помещают их в термостат при температуре 26 °С.

Через 3 недели изучают и зарисовывают образовавшийся каллус

2. Для получения каллуса из зрелых зародышей пшеницы семена, замоченные за 1 сутки до начала работы, стерилизуют в течение 25 мин в 0,1%-ном растворе сулемы или диацита, после чего их тщательно промывают 5 раз стерильной дистиллированной водой и скальпелем изолируют зародыш. Все операции проводят в ламинар-боксе.

Изолированные зародыши помещают на агаризованную питательную среду МС в пробирки или чашки Петри.

Культивируют зародыши в световой комнате при температуре 25 °С.

Через 3 недели изучают и зарисовывают образовавшийся каллус

3. Для получения каллусной ткани из незрелых зародышей пшеницы их изолируют на 12-е сутки от начала цветения. Семена стерилизуют 0,1%-ным раствором сулемы или диацита в течение 7 мин с последующим 5-кратным промыванием стерильной дистиллированной водой. Зародыши изолируют с помощью препаровальной иглы и скальпеля в асептических условиях.

Зародыш переносят на питательную среду. Пробирки или чашки Петри со стерильными зародышами помещают в культуральную, где поддерживают температуру 25 °С.

Через 3 недели изучают и зарисовывают образовавшийся каллус

4. Колбу со стерильной средой нагревают на электроплитке (или водяной бане) до расплавления агара. Затем колбу открывают, горлышко обжигают над пламенем спиртовки. В стерильные чашки Петри, с которых снята крафт-бумага, разливают питательную среду по 15 мл и сразу закрывают крышками.

Пробирки с проростками подсолнечника протирают спиртом, горлышко обжигают над пламенем спиртовки. Стерильное растение вынимают пинцетом из пробирки, проросток разделяют на отдельные сегменты: корень, гипокотиль, семядоли длиной 5...7 мм. Стерильным скальпелем делают надсечки на эксплантах для появления в дальнейшем в местах поранения раневого каллуса.

Экспланты размешают на поверхности агаризованной среды, чуть вдавливая их пинцетом для усиления контакта со средой. В каждую чашку помещают по 10...20 эксплантов.

Чашки Петри закрывают и обматывают парафилом в два слоя. Парафилм при обматывании следует равномерно натягивать для предотвращения разрывов при его усыхании.

Чашки Петри помещают в культуральную, где поддерживают температуру 22...25°C и влажность воздуха 70 %.

Через 3 недели изучают и зарисовывают образовавшийся каллус.

5. Стерильную питательную среду из колбы разливают в стерильные чашки Петри (см. выше).

Чашки Петри с пророщенными семенами огурца протирают спиртом, снимают парафилм и пинцетом вынимают стерильные проростки (2...3 шт.), острым скальпелем вырезают участки гипокотыля, семядоли и листа длиной 1,5...2 см.

Экспланты размещают на поверхности застывшей агаризованной среды (от 10 до 20 шт. в каждую чашку Петри), после чего закрывают крышками и обматывают парафилом.

Чашки Петри с высаженными эксплантами размещают в световой комнате и культивируют при 26 °C, влажности 70 % и освещенности 8... 10 тыс. лк.

Через 1 неделю изучают, зарисовывают образовавшийся каллус.

6. Отбирают здоровые корнеплоды моркови, тщательно моют щеткой с мылом, затем промывают водопроводной водой и погружают для стерилизации в 96%-ный спирт на 5 мин без дальнейшего промывания стерильной водой.

Таблица 2

Индукция каллусогенеза

Первичный эксплант	Число эксплантов, шт.		Экспланты, сформировавшие каллус, %	Каллус	
	Высажено,	сформировали каллус		консистенция	окраска
Сегменты листьев					
Незрелые зародыши					
Зрелые зародыши					
Сегменты корня					
Сегменты гипокотыля					
Сегменты семядолей					
Сегменты корнеплода					

В стерильных условиях отрезают верхнюю часть корнеплода моркови и стерильным пробкобуром извлекают цилиндры из ткани. Эксплант корнеплода моркови должен содержать ксилемную, флоэмную паренхиму и камбий.

Изолированные цилиндры помещают в стерильную чашку Петри и разрезают на диски шириной 1...2 мм, на которых затем делают надсечки. Далее с помощью пинцета их переносят на питательную среду.

Культивируют в термостате или световой комнате при температуре 25 °С.

Через 3 недели изучают и зарисовывают образовавшийся каллус, заполняют таблицу 2.

Лабораторная работа № 6

Тема: Пассирование каллусной ткани

Общие сведения. После того как на экспланте образовался каллус, его изолируют и переносят на свежую питательную среду для самостоятельного роста в культуре.

Частота дальнейших пассажей зависит от скорости роста каллусной ткани, диаметра культурального сосуда и количества питательной среды. Обычно пассирование каллусной ткани проводят по истечении 4...6 недель

Причиной задержки или полной остановки роста каллусной ткани может быть возникновение анаэробных условий во внутренних участках ткани, при которых в последней накапливаются токсические вещества и ингибируется клеточное деление.

Колонии тканей, выращиваемые в пассируемой культуре, могут значительно различаться по морфологии: они могут быть сферическими (каллусная ткань огурца), ленточными и пластинчатыми, а также бесформенными, растущими по типу бактериальной культуры (например, каллусная ткань пыльников пшеницы).

Цель работы. Ознакомиться с:

- методом пассирования каллусной ткани
- приемами снятия характеристик каллусной ткани

Материалы и оборудование:

- культура каллусной ткани огурца;
- культура каллусной ткани картофеля;
- пробирки или чашки Петри со стерильной агаризованной средой МС для пересадочной каллусной ткани
- 70%-ный и 96%-ный этанол;
- стерильные чашки Петри,
- пинцеты, скальпели;

- спиртовки; вата;
- аналитические весы.

Пассирование каллусной ткани:

- огурца (*Cucumis sativus* L.)
- картофеля (*Solanum tuberosum* L.)

Порядок выполнения работы.

1.1. Чашку Петри или пробирку с каллусной культурой огурца открывают и пинцетом извлекают каллус.

1.2. На стерильной чашке Петри каллус разделяют скальпелем на кусочки массой до 100 мг и помещают на поверхность агаризованной питательной среды.

1.3. Чашки с высаженными в них культурами (по 5...7 шт. в каждой) ставят в световую комнату.

1.4. Через 1 неделю растущие каллусные культуры описывают по морфологическим признакам.

2.1. Чашку Петри или пробирку с каллусной культурой картофеля открывают и пинцетом извлекают каллус.

2.2. На стерильной чашке Петри каллус делят скальпелем на кусочки примерно по 100... 150 мг.

2.3. Аналитические весы протирают спиртом изнутри. На стерильной фольге взвешивают каллусную ткань.

2.4. После взвешивания каллусную ткань переносят на свежую питательную среду.

2.5. Чашки Петри или пробирки с каллусными культурами помещают в световую комнату.

2.6. Через 4 недели каллусную ткань взвешивают в стерильных условиях.

2.7. Интенсивность роста каллусной ткани (в %) рассчитывают по формуле

$$\dot{E} = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \cdot 100,$$

где m_1 — масса каллусной ткани в начале пассажа; m_2 — масса каллусной ткани в конце пассажа.

Таблица

Характеристика каллусной ткани

Первичный эксплант	Каллус		Наличие меристематиче- ских очагов	Сырая масса, мг	
	конси- стенция	окраска		в начале пассажа	в конце пассажа
Сегменты листьев					
Сегменты клубня					

Кроме снятия ростовых характеристик необходимо отмечать цвет и консистенцию каллусной ткани и заполняют таблицу.

**Тема: Вторичная дифференцировка и морфогенез
в культуре каллусных тканей.
Получение растений-регенерантов**

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

Благодаря присущему клетке свойству тотипотентности из каждой каллусной клетки (независимо от того, из какого органа растения был взят эксплант) может регенерировать целое растение. Однако эта потенциальная способность реализуется далеко не всегда. До сих пор не получены растения-регенеранты из одной изолированной клетки (протопласта) некоторых бобовых растений и большинства хлебных злаков: пшеницы, ржи, кукурузы и др. (исключение составляет рис).

Индукция морфогенеза и регенерация растений — сложный, многоступенчатый процесс. Разные генотипы в пределах любого вида растений обладают неодинаковой регенерационной способностью. Поэтому изучение механизма регенерации растений из каллусных клеток, оптимизация состава питательных сред и условий культивирования для индукции морфогенеза являются важнейшими вопросами культивирования изолированных клеток и тканей растений.

Существуют различные типы морфогенеза:

- стеблевой органогенез - процесс образования стеблевых и цветочных почек на участках одного органа (стебля, гипокотыля, листьев)
- корневой органогенез или ризогенез - процесс образования корней
- соматический эмбриогенез.

Каллусная ткань, используемая для непрерывных пересадочных культур *in vitro*, в определенных условиях способна к регенерации адвентивных почек и побегов. Переход клеток к организованному развитию является результатом изменения количественных соотношений между фитогормонами из групп ауксинов и цитокининов. Преобладание ауксинов над цитокининами в составе среды вызывает ризогенез, а при изменении этого соотношения в сторону цитокининов появляются почки. Образование почек *in vitro* может происходить как из экспланта, так и из каллуса. Формирование регенерантов из первичного экспланта называют прямой регенерацией. Однако, для получения полноценных растений-регенерантов необходим этап укоренения. В случае стеблевого органогенеза образовавшийся побег пересаживают на среду с повышенным

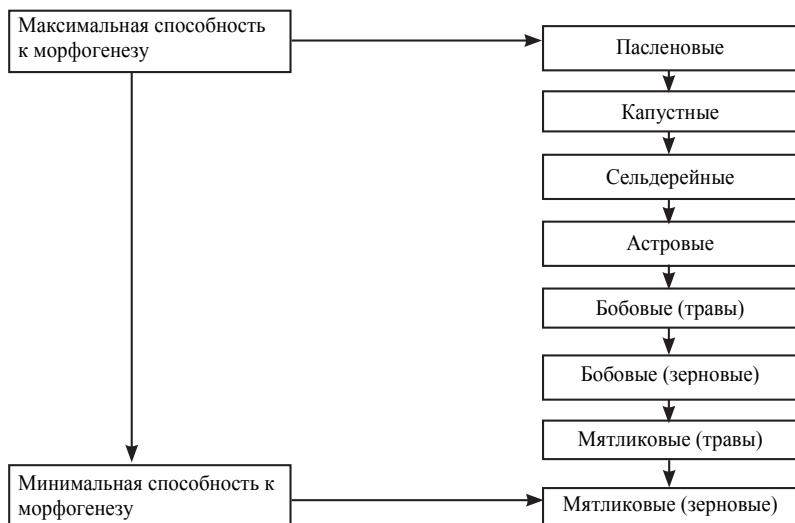
содержанием ауксинов для дальнейшего укоренения сформировавшихся микропобегов. Если же морфогенез осуществляется по типу корневого органогенеза, то практически не удастся получить побеги из корней.

При соматическом эмбриогенезе из каллусных клеток формируются биполярные структуры, подобные зародышу, у которых одновременно дифференцируются меристемы корня и стебля.

Процесс вторичной дифференцировки *in vitro* зависит от многих факторов, главные из которых следующие: генотип, возраст, тип первичного экспланта, сезонность изоляции, минеральный состав питательной среды, баланс экзогенных и эндогенных гормонов, условия выращивания, а также присутствие сигнальных белков и белков-акцепторов.

Способность каллусных клеток к формированию монополярных и (или) биполярных структур главным образом зависит от видовых и сортовых особенностей исследуемых генотипов, для которых принципиально важно учитывать принадлежность к однодольным или двудольным растениям, а также тип первичного экспланта. Далее приведен перечень семейств высших растений, расположенных по степени снижения способности к морфогенезу (Р. Г. Бутенко, 1999):

Материнский эффект при наследовании способности к морфогенезу отмечали многие ученые (В. С. Шевелуха, Е. А. Калашникова, Е. С. Воронин и др., 2003). На основании полученных данных было сделано предположение о вероятном участии митохондриальных генов в регуляции процесса морфогенеза (Ю.И. Долгих, 2005).



Физиологический возраст первичного экспланта, из которого была получена каллусная ткань, имеет несомненное значение для проявления способности каллусных клеток к морфогенезу. Установлена прямая корреляция между возрастом первичного экспланта и морфогенезом: чем моложе эксплант, тем большей морфогенетической активностью обладают каллусные клетки. С увеличением возраста исходного материала, как правило, снижается способность каллусной ткани к морфогенезу.

Существенное влияние на реализацию морфогенетического потенциала каллусной ткани оказывает число субкультивирований последней в условиях *in vitro*. С увеличением числа пассажей значительно снижается степень морфогенетической активности каллусных клеток. Такая зависимость особо сильно проявляется на трудных объектах, таких, как: пшеница, ячмень, рис, подсолнечник и др.

Применение экзогенных гормональных препаратов и изменение их соотношения и концентраций являются главными факторами, влияющими на морфогенез каллусной ткани. Преобладание ауксинов над цитокининами приводит к дифференциации меристематических очагов корня, а преобладание цитокининов над ауксинами — меристематических очагов апекса, дающих начало росту adventивных побегов.

Изучению регуляции морфогенеза экзогенными факторами посвящено много работ, однако молекулярные механизмы эндогенной регуляции почти не исследованы. Учитывая большое значение баланса эндогенных гормонов в реализации свойства тотипотентности (Л. А. Лутова, 2003) можно предположить, что компетентность клеток к морфогенезу в значительной степени обусловлена количеством и соотношением эндогенных регуляторов роста. При сопоставлении уровней гормонов в морфогенных и неморфогенных тканях некоторых видов растений были обнаружены заметные различия. Экспериментально доказано, что в большинстве случаев для морфогенных тканей характерны преобладание цитокининов над ауксинами и невысокий уровень АБК, а для неморфогенных — обратное соотношение (Ю. И. Долгих, 2005).

Из трофических факторов особое внимание необходимо уделять наличию в питательной среде минеральных солей, содержащих азот в нитратной или аммонийной форме. Присутствие в среде NH_4^+ необходимо для начала морфогенеза, тогда как для роста и развития дифференцированных морфогенных структур предпочтение по концентрации отдается NO_3^- .

Не только минеральные соли могут регулировать морфогенетические процессы в каллусной ткани. Аминокислоты (тирозин, аспарагин, глутамин), а также нитрат серебра (ингибирует синтез этилена), добавленные в питательную среду, значительно повышают морфогенетическую активность каллусных клеток.

Особое влияние на морфогенез каллусной ткани оказывают стрессовые факторы, такие, как: тяжелые металлы, хлорид или сульфат натрия, низкие положительные температуры, низкие концентрации токсинов или культурального фильтрата патогенов. Например, в конце 60-х гг. XX в. в лаборатории академика РАСХН и чл.-корр. РАН Р.Г. Бутенко Института физиологии растений РАН на культуре ткани моркови показано стимулирующее действие 0,5%-ного NaCl на морфогенез и регенерацию растений *in vitro*, что было в дальнейшем подтверждено на каллусной культуре пшеницы. На культуре каллусных клеток риса установлена существенная роль низких положительных температур на морфогенетический потенциал дедифференцированных клеток.

Интенсивность освещения, спектральный состав света, температурный режим, а также другие физические факторы воздействия оказывают особое влияние на морфогенез каллусной ткани. Доказано, что дифференциация адвентивных почек в каллусной ткани происходит при ее культивировании на свету с белым или синим спектром, в то время как при использовании света красного спектра в каллусной ткани дифференцируются меристемы корня. Для большинства растений температурный оптимум составляет 23...25°C. Однако среди исследуемых растений существуют исключения, например подсолнечник, для которого температурный режим, обеспечивающий морфогенез каллусной ткани, находится в пределах 18...22 °C.

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

Процесс морфогенеза в культуре неорганизованно растущих каллусных тканей — важная составная часть клеточных технологий, создаваемых для селекции. После 2...3 недель культивирования эксплантов на среде для каллусообразования наблюдается появление гетерогенных каллусов: они представляют собой рыхлую, светлую ткань, в которой локально выделяются участки плотной ткани, часто зеленеющей на свету. Такие участки, представленные мелкими меристематическими клетками, получили название меристематические очаги. Этим морфогенная каллусная ткань отличается от неморфогенной.

Индукция органогенеза каллусной ткани картофеля (Solarium tuberosum L.). Для индукции органогенеза каллусную ткань, полученную из стеблевого или листового экспланта стерильного растения картофеля (2-й и последующие пассажи), пересаживают на среду с высоким содержанием цитокининов, а для укоренения образовавшихся побегов используют среду с повышенным содержанием ауксинов. У картофеля этот процесс можно подразделить на несколько стадий:

- индукцию зеленых меристематических зон;
- появление почек *de novo*;
- формирование микропобегов с последующим их укоренением.

Чем моложе каллусная культура (т. е. чем меньше времени прошло с момента ее получения), тем больше ее регенерационная способность. Состав сред для индукции морфогенеза и регенерации растения у разных сортов картофеля неодинаковый, но общим правилом является повышенное содержание цитокининов (зеатина или БАП).

Индукция органогенеза каллусной ткани моркови. В каллусной ткани моркови при пересадке ее на среду, содержащую 0,2 мг/л БАП, индуцируется образование почек или эмбриоидов. Через 2...3 недели в каллусах развиваются зеленые почки или эмбриоиды размером 0,5...2,0 мм. Их образованию предшествует возникновение на светлой поверхности каллусной ткани зеленых очагов, которые появляются через несколько дней после пересадки. Почки или эмбриоиды могут развиваться одновременно на одном каллусе.

Для получения растений-регенерантов сформировавшиеся зачатки стеблей и эмбриоидов помещают на среду без гормонов, где через 2...3 недели формируются растения. Иногда может наблюдаться нарушение нормального развития растений (образование каллусной ткани, преимущественное развитие корня или побега, утолщение различных органов). В этом случае материал следует пересаживать на среду без гормонов и с уменьшенной вдвое концентрацией всех входящих в нее компонентов. Срок, необходимый для прохождения всех стадий процесса регенерации растений из тканевых культур, составляет около 2 мес.

Цель работы. Ознакомиться с:

- составом питательных сред для морфогенеза каллусной ткани
- условиями для морфогенеза каллусной ткани
- типами морфогенеза

Материалы и оборудование:

- каллусная ткань картофеля;
- каллусная ткань огурца;
- каллусная ткань моркови;
- каллусная ткань пшеницы;
- стерильные чашки Петри или пробирки,
- пробирки или колбы со средой для морфогенеза (табл.1);
- пинцеты, скальпели;
- спиртовка; спирт; вата.



Рис.1 Получение растений-регенерантов

Таблица 1

Состав питательной среды для индукции морфогенеза каллусной ткани

№ п/п	Компоненты питательной среды	Каллусная ткань		
		картофеля	огурца	моркови
		концентрация, мг/л		
Минеральные элементы по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС), pH 5,8				
1.	Сахароза	24000	30000	30000
2.	Глюкоза	10000	-	-
3.	2,4-Д	-	1,0	-
4.	ИУК	0,1	-	1,0
5.	НУК	-	0,5	-
6.	БАП	-	-	0,2
7.	Зеатин	1,0	витамины по прописи МС	1,0
8.	Фолиевая кислота	0,5		-
9.	Биотин	0,05		-
10.	Никотиновая кислота	5,0		-
11.	Пиридоксин	0,5		-
12.	Тиамин	0,5		1,0
13.	Мезоинозит	100		80,0
14.	Аденин	40		-
15.	Гидролизат козеина	1000		-
16.	Глицин	2,0		-
17.	Агар-агар	7000	7000	7000

Порядок выполнения работы.

Индукция стеблевого органогенеза каллусной ткани картофеля.

1. Каллус вынимают из пробирки или чашки Петри
2. Каллусную ткань разделяют на кусочки размером 5х5 мм и стерильным пинцетом переносят на агаризованную питательную среду для индукции морфогенеза (табл. 1).
3. Пробирку закрывают пробкой (в случае использования чашек Петри их закрывают крышками и парафином) и ставят в световую комнату с температурой 20...25 °С, освещенностью 3 тыс. лк и влажностью воздуха 70 %.
4. Через 1 неделю отмечают появление структурированных очагов.
5. Через 3...5 недель отмечают появление меристематических зон ярко-зеленого цвета.

6. Через следующие 1...2 недели отмечают появление апексов.

7. В рабочую тетрадь записывают количество апексов, появившихся на каждом каллусе.

При дальнейшем культивировании апексы превращаются в микропобеги. На одном экспланте может дифференцироваться до нескольких десятков побегов, когда они достигнут высоты 10 мм, их отделяют от каллусной ткани и переносят на среду для укоренения. Через 5... 10 дней отмечают появление корней.

Индукция стеблевого органогенеза каллусной ткани огурца.

1. Каллус вынимают из пробирки или чашки Петри

2. Каллусную ткань разделяют на кусочки размером 5х5 мм и стерильным пинцетом переносят на агаризованную питательную среду для индукции морфогенеза (табл.1).

3. Пробирку закрывают пробкой (в случае использования чашек Петри их закрывают крышками и парафином) и ставят в световую комнату с температурой 23...27 °С, освещенностью 8-10 тыс. лк и влажностью воздуха 70 %.

4. Через 1-2 недели отмечают появление глобул и меристематических зон ярко-зеленого цвета.

5. Через 4 недели отмечают образование апексов и небольших побегов. На одном экспланте может быть до нескольких десятков побегов

6. Побеги высотой 10 мм отделяют от каллуса и переносят на среду для укоренения.

7. Проводят учеты количества глобул, меристематических зон и апексов стебля для каждого экспланта, образовавшего каллус, и отмечают появление корней.

8. Полученные данные вносят в таблицу, зарисовывают апексы стебля, образованные в каллусной ткани.

Индукция стеблевого органогенеза каллусной ткани моркови (Daucus carota L).

1. Каллусную ткань, полученную из корнеплодов моркови, пересаживают на новую питательную среду МС (табл.1). Эта среда стимулирует дифференцировку в каллусной ткани клеток меристематического и эмбрионального типа, из которых в дальнейшем формируются почки и эмбриониды соответственно.

2. Пересаженные каллусы помещают в световую комнату с температурой 23...27 °С, освещенностью 8-10 тыс. лк и влажностью воздуха 70 %, 16-часовым фотопериодом.

4. Через 3 недели отмечают развитие зеленых почек или эмбрионидов (зарисовать).

5. Сформировавшиеся почки или эмбриониды используют для получения растений-регенерантов. Для этого их переносят на агаризован-

ную питательную среду МС без гормонов и выращивают в световой комнате.

Таблица 2

Способность к стеблевому органогенезу каллусной ткани

Эксплант, образовавший каллус	Число каллусов, образовавших							% каллусов, образовавших		
	глобулы	%	меристематические зоны	%	апексы стебля	%	растения-регенеранты	%	корни	побеги

6. Через 3 недели полученные данные вносят в таблицу 2, отмечают образование побегов и проростков, формирование растений-регенерантов.

Лабораторная работа № 8

Тема: Культура клеточных суспензий

Общие сведения. Суспензионные культуры клеток растений представляют относительно гомогенную популяцию клеток, которые легко подвергнуть воздействию химических веществ. Суспензионные культуры клеток широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма, индукции ферментов и экспрессии генов.

Культуру клеточных суспензий можно получить из каллусной ткани, поместив ее в жидкую питательную среду с автоматическим перемешиванием. Постоянное перемешивание является необходимым условием культивирования клеточных суспензий.

Для получения суспензионной культуры берут жизнеспособную, интенсивно пролиферирующую каллусную ткань. При переносе клеток на свежую питательную среду используют только мелкие агрегаты.

Деление суспензионных клеток поддерживается при наличии в среде ауксинов и цитокининов, т.е. тех гормонов, которые необходимы для индукции и роста каллусных клеток. Таким образом, суспензионные культу-

ры представлены типичными каллусными клетками, обладающими всеми свойствами, характерными для клеток такого рода.

Суспензии лучше образуются из рыхлой каллусной ткани, легко распадающейся на небольшие клеточные агрегаты и отдельные клетки получаемой на средах с 2,4-Д. При исключении из питательной среды ионов кальция образование суспензионной культуры облегчается. Еще более интенсивно этот процесс идет при добавлении в среду фермента пектиназы, который разрушает пектат кальция, склеивающий отдельные клетки.

Минимальный объем инокулята (критическая концентрация клеток в суспензии), обеспечивающий клеточное размножение, обычно составляет 10...20% общего объема суспензии в начале культивирования. Повышенные количества инокулята приводят к ингибированию роста клеточной популяции вследствие недостатка кислорода и накопления в среде токсических продуктов метаболизма.

Длительность первого цикла выращивания клеточной суспензии обычно составляет 3...4 недели и зависит от:

- исследуемого генотипа растения, из которого она получена;
- первичного экспланта и его возраста;
- состава питательной среды;
- условий выращивания;
- частоты вращения роллера.

Последующие циклы сокращаются до 2 недель. В процессе выращивания каллусных клеток в суспензионной культуре часть клеток отмирает, а другая — интенсивно делится.

Для работы с клеточными суспензиями необходимо знать их характеристики: жизнеспособность, плотность клеток в суспензионной культуре, степень агрегированности, скорость роста.

Жизнеспособность клеток определяют по их окрашиванию красителем (метиленовым синим). Живые клетки не окрашиваются красителем вследствие непроницаемости для него клеточных мембран. В мертвые клетки краситель легко проникает, и они окрашиваются в синий цвет. Существует правило: если более 50 % клеток в агрегате не окрашивается, он считается живым.

Одним из основных показателей, характеризующих состояние клеточной суспензии, служит плотность клеточной популяции. Число клеток определяют в счетной камере Фукса-Розенталя (рис. 1) под микроскопом после их мацерации (разделения). В качестве мацерирующего вещества применяют хромовую кислоту (10...20%-ную), которая гидролизует срединные пластинки, соединяющие клетки.

Хорошо растущая суспензия имеет, как и каллусная культура, S-образную кривую роста. Различают три фазы ростового цикла

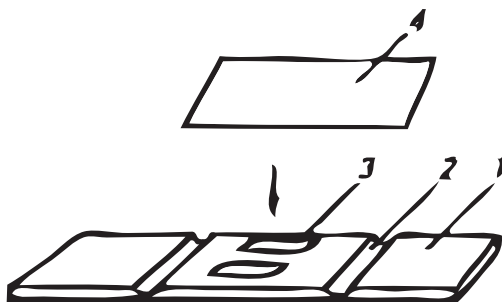


Рис. 1 Камера Фукса-Розенталя:

1 – предметное стекло;

2 – желобок для удаления лишнего раствора;

3 – область, в которой подсчитывают клетки;

4 – покровное стекло

- суспензии;
- лаг-фаза (2...3 суток);
- фаза экспоненциального роста (2...10 суток);
- стационарная фаза (10...15 суток).

Продолжительность фаз зависит от вида растений и первичного экспланта, из которого получена каллусная культура (и затем суспензия), начального количества клеток (первичного инокулята), условий выращивания. Обычно длительность пассажа составляет 14...16 дней. При этом плотность возрастает от $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ кл/мл. Суспензию для субкультивирования берут в конце экспоненциальной фазы. Увеличение числа клеток, их сырой и сухой массы – основные критерии роста суспензионных культур.

Качество суспензии зависит от степени агрегированности ее клеток. Агрегаты не должны содержать более 10... 12 клеток. Поэтому, чтобы удалить крупные агрегаты, суспензию фильтруют через марлевые, нейлоновые или металлические фильтры. Одновременно это дает возможность освободиться от остатков экспланта или плотных кусков каллусной ткани.

Суспензионная культура по степени агрегированности бывает мелкоагрегированная, среднеагрегированная, крупноагрегированная.

Для проведения работ по клеточной селекции мелкоагрегированную суспензионную культуру высевает на агаризованную питательную среду. При этом одиночные клетки и клетки, входящие в состав мелких агрегатов, делятся и образуется каллусная ткань, из которой в дальнейшем формируются растения-регенеранты.

В биотехнологии клеточные суспензии используют для получения вторичных метаболитов, многие из которых являются ценными лекарственными препаратами, для промышленного выращивания клеточной биомассы и для клеточной селекции. Наряду с этим суспензии клеток можно применять в качестве исходного материала для получения изолированных протопластов.

При использовании суспензионных культур в качестве продуцентов вторичных веществ применяют закрытые или открытые системы ферментеров в периодическом или проточном режимах выращивания клеток. В закрытой системе клеточная суспензия лишена притока свежей питательной среды до конца выращивания, а в случае непрерывного режима выращивания в открытой системе питательную среду меняют на свежую. Как при периодическом, так и при проточном режимах выращивания в открытой системе клетки остаются в питательной среде и не удаляются даже при ее замене. Однако в открытых системах культивирования при замене питательной среды (периодическом или непрерывном) вместе со средой отбирают и часть суспензионных клеток.

Для получения 100 мл клеточной суспензии необходимо 2...3 г свежей каллусной ткани.

Цель работы. Ознакомиться с:

- составом питательных сред для получения суспензионной культуры
- методами и условиями получения суспензионной культуры
- методами пассирования суспензионной культуры
- приемами снятия основных характеристик суспензионной культуры

Материалы и оборудование:

- каллусная ткань, полученная из различных эксплантов стерильных растений картофеля;
- колбы с суспензионной культурой,
- колбы с жидкой питательной средой (табл. 1);
- среда для роста клеточной суспензии с двойным содержанием агара (1,2... 1,4 %)
- стерильная пипетка, резиновая груша,
- стерильные пинцеты, скальпели,
- чашки Петри;
- краситель (метиленовый синий),
- предметное стекло, стеклянная палочка, цилиндр;
- камера Фукса-Розенталя,
- микроскоп;
- спиртовка; спирт; спички; вата.

Таблица 1

**Состав питательной среды для получения
суспензионной культуры картофеля**

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л
Минеральные элементы по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС), pH 5,8		
1.	Сахароза	20000
2.	Глюкоза	20000
3.	2,4-Д	3,0
4.	ИУК	0,1
5.	НУК	-
6.	Зеатин	0,05
7.	Кинетин	0,2
8.	Фолиевая кислота	0,5
9.	Глицин	1,0
10.	Никотиновая кислота	5,0
11.	Пиридоксин	0,5
12.	Тиамин	0,5
13.	Мезоинозит	100
14.	Аденин	10
15.	Гидролизат козеина	1000

Порядок выполнения работы:

1. Получение суспензионной культуры из каллусной ткани картофеля (*Solanum tuberosum L.*) и ее пассирование

1.1 Стерильным пинцетом кусочки рыхлого каллуса перекладывают на стерильную чашку Петри,

1.2. Отбирают светлые участки каллуса и помещают их в колбочки со стерильной жидкой средой для суспензии из расчета 3...5 г каллуса на 100 мл жидкой среды.

Объем суспензии должен составлять 10...20% объема колбы (например, в колбу вместимостью 500 мл наливают 50... 100 мл суспензии).

Колбу закрывают ватно-марлевой пробкой с целлофаном или фольгой и ставят на качалку на 3...4 недели (оптимальная длительность первого пассажа).

Пассирование суспензионной культуры осуществляют одним из следующих способов.

- суспензию оставляют на 1...2 мин, чтобы осели крупные агрегаты. Стерильной пипеткой берут несколько миллилитров суспензии из верхней части ее объема.

- суспензию профильтровывают через капроновую ткань или нейлоновый фильтр и добавляют в нее свежую среду.
- суспензии дают отстояться 1...2 мин и переливают 5... 10 мл в колбу со свежей средой.

Обычно для хорошо растущей суспензионной культуры используют разведение 1:10, т. е. в колбу на 500 мл помещают 5 мл суспензии и 45 мл свежей среды. Более точно разведение определяют исходя из ростовых характеристик.

Колбы с суспензионной культурой закрывают ватно-марлевой пробкой с целлофаном или фольгой и ставят на качалку до следующей пересадки.

2. Основные характеристики суспензионной культуры.

Для подсчета жизнеспособности клеток:

2.1 Камеру Фукса-Розенталя и покровное стекло моют хромпиком, высушивают. Притирают покровное стекло к камере до появления колец Ньютона.

2.2. На предметное стекло наносят каплю суспензии, рядом — каплю красителя. Смешивают стеклянной палочкой.

2.3. Смесь переносят в камеру Фукса-Розенталя, для этого пипеткой с узким носиком набирают суспензию клеток и подносят к краю покровного стекла, при этом жидкость заполняет весь объем камеры.

2.4. Под микроскопом подсчитывают число живых и мертвых клеток; одиночных клеток, мелких и крупных агрегатов; общее число клеток. Подсчет клеток осуществляют в пяти больших квадратах (в четырех по диагонали и в одном в любом верхнем или нижнем углу сетки).

2.5. Плотность суспензии, т. е. число клеток в 1 мл рассчитывают по формуле

$$X = \frac{i \cdot \bar{i} \cdot 1000}{3,2},$$

где $\bar{i}$ — среднее из 2...3 повторностей число клеток в камере;

i — кратность разведения.

2.6. Результаты записывают в таблицу 2.

Таблица 2

Характеристика суспензионной культуры

Жизнеспособность, %	Степень агрегированности	Плотность суспензии, кл/мл

2.7. Показатели снимают через день в процессе всего культивирования и по ним строят S-образную кривую роста.

3. *Высев суспензионной культуры на твердую агаризированную питательную среду (метод Плейтинга)*

3.1. Клеточную суспензию переливают в стерильный цилиндр и оставляют на 5 мин. 3.2. Пипеткой отбирают 5 мл верхней фракции суспензии (она обогащена одиночными клетками) и смешивают в стерильном цилиндре с 5 мл теплой (36 °С) питательной среды для роста каллусной ткани. Эта среда должна содержать двойное количество агара, т. е. 1,4 %.

3.3. Содержимое цилиндра быстро разливают в чашки Петри, дают остыть, закрывают крышками и парафилмом.

3.4. Через 3...5 недели подсчитывают колонии клеток диаметром более 1 мм.

3.5. Эффективность посева в процентах рассчитывают по формуле

$$ЭВ = \frac{\text{Количество образовавшихся колоний}}{\text{Количество посеянных клеток}} \cdot 100$$

Плотность посева обычно оставляет $1 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл. Этот показатель не должен быть очень высоким, чтобы растущие колонии не сливались.

Лабораторная работа № 9

Тема: Клональное микроразмножение сельскохозяйственных и декоративно-цветочных культур

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

- получение генетически однородного посадочного материала;
- получение безвирусных растений за счет использования меристемной культуры;
- высокий коэффициент размножения (например, из одного растения земляники можно получить в год 1 млн растений);
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;

- возможность размножать трудноукореняемые растения (например, розы, орхидеи, орехоплодные и хвойные растения);

- легкость транспортировки пробирочных растений

Процесс клонального микроразмножения включает в себя четыре этапа:

- выбор растения-донора и получение хорошо растущей стерильной культуры;

- собственно микроразмножение;

- укоренение микропобегов и при необходимости их депонирование при пониженных температурах;

- адаптацию пробирочных растений к почвенным условиям теплицы или открытого грунта (рис. 1).

Существует несколько методов клонального микроразмножения растений:

- активация развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки и интеркалярные зоны стебля);

- индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;

- индукция соматического эмбриогенеза;

- дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Меристема представляет собой образовательную ткань с активно делящимися клетками, состоящую из конуса нарастания и одного-двух листовых зачатков (примордиев).

Меристематические ткани апексов и пазушных почек растений используют для получения генетически однородного материала любой культуры в неограниченно количестве.



Рис.1 Процесс черенкования in vitro.

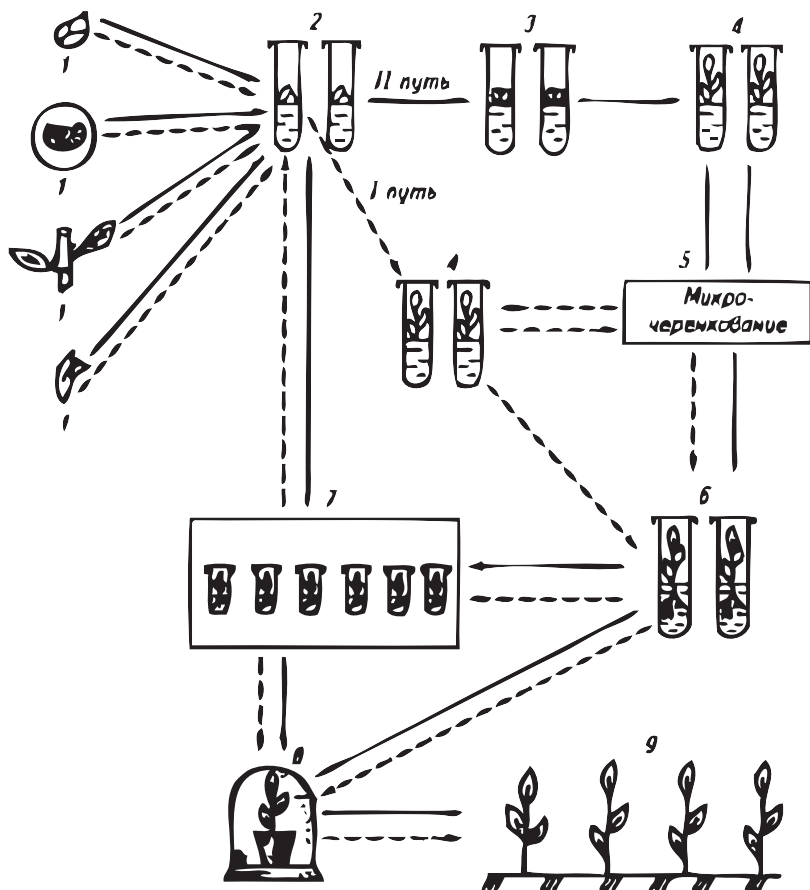


Рис 2. Схема клонального микроумножения растений методами:
 активации развития существующих меристем (I путь),
 индукции образования адвентивных почек на первичном экспланте (II путь):
 1 – исходный эксплант;
 2 – получение стерильной культуры;
 3 – образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте;
 4 – рост почек и формирование микропобегов;
 5 – размножение микропобегов (микрочеренкование);
 6 – укоренение микропобегов;
 7 – депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2 «С»);
 8 – перевод растений в тепличные условия;
 9 – высадка растений-регенерантов в поле

Приживаемость меристемного экспланта определяется, в том числе, и его размером. Чем больше на экспланте листовых зачатков, тем легче идет процесс морфогенеза, заканчивающийся получением нормально развитого пробирочного растения.

Культуру изолированных апикальных меристем используют для получения свободного от вирусов материала. Метод основан на том, что клетки меристемы, как правило, не содержат вирусов. Причем, безвирусная меристематическая зона различается для различных групп вирусов, а также зависит от сорта и вида растения.

Для повышения эффективности оздоровления метод верхушечной меристемы сочетают с термо- и химиотерапией, что вызывает как инактивацию вирусов, так и ингибирование их развития.

Безвирусные регенеранты размножают *in vitro*. Одним из наиболее распространенных способов размножения *in vitro* является микрочеренкование в пробирочной культуре, т. е. разделение исходного растения-регенеранта, полученного из меристемы, на микрочеренки, состоящие из листа с пазушной почкой и стеблевой ткани. Черенки высаживают в пробирки с питательной средой. Размножение методом черенкования предусматривает, прежде всего, удаление верхушечной почки, чтобы исключить апикальное доминирование и стимулировать рост пазушных меристем.

Снятие апикального доминирования, что может быть достигнуто добавлением в питательную среду веществ цитокининового механизма действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин), а также 2-изопентениладенин (2ip) и зеатин. Побег, полученный таким образом, отделяют от первичного материнского экспланта и вновь культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.

В настоящее время этот метод широко используют в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур как технических (сахарной свеклы, хмеля, табака, топинамбура, стэхиса), так и овощных (томатов, картофеля, огурца, перца, тыквы, спаржи и др.), а также для размножения культур промышленного цветоводства (гвоздики, хризантемы, розы, фуксии), тропических и субтропических растений (рододендрона, азалии, камелии, чая и др.), плодовых и ягодных культур (яблони, сливы, вишни, груши, винограда, малины, смородины, крыжовника и др.) и древесных растений (тополя, ивы, ольхи, березы, рябины, секвойи, туи, можжевельника и др.).

Для отдельных сельскохозяйственных культур, например, таких как картофель, технология клонального микроразмножения позволяет получать из одной меристемы более 10^5 растений в год.



Рис.3 Выделение меристемных эксплантов

Индукция образования адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте является эффективным методом клонального микроразмножения для некоторых видов растений, например, для подсолнечника. Образование адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий), если их удастся получить свободными от инфекции. Этот процесс, как правило, происходит на питательных средах, включающих в качестве гормональных компонентов только один из цитокининов или сочетание цитокинина с ауксином в соотношении 10:1 или 100 : 1. В качестве ауксина в этом случае наиболее часто используют ИУК или НУК.

Образовавшиеся адвентивные почки после их отделения от первичного экспланта и самостоятельного культивирования на безгормональной питательной среде или среде, содержащей невысокие концентрации цитокинина, формируют побеги, способные в дальнейшем к укоренению.

Пересадка растений-регенерантов в почвенные условия – ответственный этап, завершающий процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений – это весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом, корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат легкого гранулометрического состава. При необходимости растения подкармливают растворами Клопа, Кнудсона и др.

В настоящее время технология микроклонального размножения стала коммерческим производством. Наибольшее распространение микроклональное размножение получило при культивировании декоративных и тропических растений, а для картофеля, спарagusа, земляники, некоторых

подвоев яблони и персика оно начинает заменять традиционные способы размножения и селекции (табл. 1).

Таблица 1

**Промышленное производство культур, млн. шт.,
выращенных in vitro
в США, Странах Азии и Европы в 2000 г.**

Культура	США	Европа	Азия
Цимбидиум гибридный (орхидея)	0,5	0,2	0,2
Бегония	2,5	10	—
Рододендрон	—	3,5	—
Гербера	2,5	—	0,5
Ирис гибридный	5,0	2,8	2,5
Папоротник	15	15	—
Фикус	1,7	4,5	—
Диффенбахия	6,0	—	—
Земляника	4,0	—	2,0
Картофель	7,0	—	—
Роза	—	5,7	—

В последние годы резко возрос спрос на многие цветочные и декоративные культуры. Вместе с тем некоторые ценные виды находятся на грани исчезновения и занесены в Красную книгу. Сохранение и размножение редких, исчезающих и декоративных видов растений возможно с помощью методов клеточной инженерии, и в частности клонального микроразмножения. Как правило, первичным эксплантом служат сегменты чешуи (луковичные культуры), листья (розеточные культуры) и пазушные почки (растения с вертикальным ростом). Разработанные технологии позволяют в течение 1,5...2 мес. получать на одном экспланте от 8 (гиацинты) до 70 (бегонии) адвентивных почек, способных впоследствии развиваться в нормальные растения. По предварительным расчетам, можно получить в течение 6 мес. 1250 микролуковиц из 15 сегментов лукович фритиллярии (рябчик императорский), до 7 тыс. растений из одного листа бегонии и до 15 тыс. растений из одной пазушной почки хризантемы. В течение года можно вырастить до 8 тыс. растений из одной луковички лилии. Эти технологии основываются на микрочеренковании или на индукции образования дополнительных почек или лукович непосредственно на первичном экспланте.

В коммерческих целях метод клонального микроразмножения широко применяют для растений семейства Орхидные (у них размножаемые растения являются сложными гибридами). Некоторые представители этого семейства сочетают геномы трех-четырех разных родов. В обычных условиях осуществить вегетативное размножение этих растений сложно, а в случае завязываемости семян и их прорастания растение достигает фазы цветения лишь через 3...5 лет.



Рис. 4 Культивирование пробирочных регенерантов



Рис.5 Получение микроклубней in vitro

Цель работы. Ознакомиться с:

- составом питательных сред для культивирования меристем и микроклонирования сельскохозяйственных и декоративно-цветочных культур
- методами выделения и культивирования меристем
- приемами клонального микроразмножения сельскохозяйственных и декоративно-цветочных культур

Материалы и оборудование:

- стерильные 3-дневные проростки огурца;
- растения-регенеранты огурца, полученные из меристем;
- клубни картофеля;
- пробирочные растения картофеля;
- 5-дневные пробирочные растения подсолнечника;
- растения хризантем;
- луковицы лилий;
- растения сенполий;
- бинокулярная лупа;
- пинцеты, скальпели, препаровальные иглы;
- чашки Петри, стаканы;
- два фарфоровых стакана с 96%-ным и 70%-ным спиртом;
- 0,1 %-ный раствор сулемы;
- стерильная дистиллированная вода;
- спиртовка; спички;
- культуральные сосуды со стерильной питательной средой МС для культивирования апикальных меристем огурца (табл. 2)
- культуральные сосуды со стерильной питательной средой для культивирования апикальных меристем картофеля (табл. 2).
- пробирки с модифицированной стерильной питательной средой МС для клонального микроразмножения картофеля (табл. 4);
- пробирки с модифицированной стерильной питательной средой МС для микрочеренкования огурца (табл. 4);
- чашки Петри со стерильной питательной средой МС для регенерации растений подсолнечника (табл. 3);
- пробирки со стерильной питательной средой МС для клонального микроразмножения хризантем (табл.4);
- пробирки со стерильной питательной средой МС для клонального микроразмножения лилий (табл. 4);
- чашки Петри со стерильной питательной средой МС для клонального микроразмножения сенполий (табл.4).

Таблица 2

Состав питательных сред для культивирования апикальных меристем

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л	
		для меристем	
		огурца	картофеля
		минеральные элементы и витамины по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС), pH 5,8	минеральные элементы по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС), pH 5,7 - 5,8
1.	Сахароза	20000	20000
2.	Глюкоза	-	20000
3.	Гидолизат козеина	-	1000
4.	Мезоинозит	-	100
5.	Тиамин	-	1,0
6.	Пиридоксин	-	1,0
7.	B ₁₂	-	0,015
8.	Никотиновая кислота	-	2,0
9.	Фолиевая кислота	-	0,5
10.	Пантотенат кальция	-	10,0
11.	Рибофлавин	-	0,5
12.	Биотин	-	1,0
13.	Кинетин	0,5	0,5
14.	ГК	2,0	1,0
15.	Аденин	40,0	40,0
16.	Глицин	2,0	-
17.	Агар-агар	7500	7000
18.	Активированный уголь	-	10000

Таблица 3

**Состав питательной среды для регенерации растений
из каллусной ткани подсолнечника**

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л
Минеральные элементы по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС), pH 5,7 - 5,8		
1.	БАП 0	,5
2.	Сахароза	30000
3.	Мезоинозит	100
4.	Эпин I	,0
5.	Агар-агар	7000

Таблица 4

**Состав питательной среды для клонального микроразмножения
некоторых растений**

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л				
		черенки			чешуйки луковиц лилий	листья сенполий
		картофеля	огурца	хризантем		
		минеральные элементы по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС), рН 5,8	минеральные элементы и витамины по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС), рН 5,7 - 5,8			
1.	Аденин	40,0	-	-	-	-
2.	Мезоинозит	100,0	-	100,0	100,0	100,0
3.	Тиамин	1,0	-	-	-	-
4.	Пиридоксин	1,0	-	-	-	-
5.	ГК	2,0	-	-	-	-
6.	Никотиновая кислота	2,0	-	-	-	-
7.	БАП	-	-	1,0	1,5	1,0
8.	Кинетин	2,0	-	-	-	-
9.	ИУК	0,1		0,5	-	0,5
0\	НУК	-	-	-	1,5	-
11.	Пантотенат кальция	10,0	-	-	-	-
12.	Аскорбино- вая кислота	-	-	20,0	40,0	20,0
13.	Ак т и в и р о - ванный уголь	10000	3000	-	-	-
14.	Сахароза	30000	10000	20000	60000	20000
15	Агар-агар	7000	7500	7000	7000	7000

Порядок выполнения работы:

1. Выделение и культивирование *in vitro* апикальных меристем огурца (*Cucumis sativus* L.)

1.1. Проростки огурца вынимают пинцетом из чашек Петри, скальпелем отделяют семядольные листья и освобождают точку роста.

1.2. Под бинокулярной лупой изолируют меристему размером не более 0,25 мм с одним-двумя листовыми примордиями.

1.3. Изолированные меристемы переносят на поверхность питательной среды.

1.4. Культуральные сосуды с высаженными эксплантатами переносят в световую комнату, 1.5. Через 1 неделю описывают побеги, развившиеся из меристем

1.6.. Заполняют таблицу 5.

Таблица 5

Результат культивирования апикальных меристем огурца

Объект	Количество меристем, %		Регенерация побегов	
	высажено	выжило	шт.	%

2. Изолирование и культивирование апикальных меристем картофеля (Solanum tuberosum L.)

2.1. Клубни картофеля проращивают в темноте при 20...22 °С.

2.2. Ростки картофеля опускают в химический стакан и заливают 0,1%-ным раствором диацита на 3...5 мин (либо 1...6%-ным раствором гипохлорита кальция или натрия, либо 0,1%-ным раствором сулемы). Затем не менее 3-х раз промывают стерильной водой, помещают в стерильную чашку Петри и добавляют несколько капель стерильной воды для предупреждения подсыхания.

2.3. Под бинокулярной лупой с верхушки ростка удаляют покровные листочки, последовательно обнажая боковые и верхушечные меристемы с примордиальными листочками. 2.4. Изолируют меристему размером 100...250 мкм без листовых зачатков (примордиев), 2.5. Меристему переносят на поверхность питательной среды.

2.6. Культуральные сосуды с высаженными эксплантатами переносят в световую комнату.

2.7. Через 2,3,4 недели описывают побеги, развившиеся из меристем.

2.8. Заполняют таблицу 6.

Таблица 6

Результат культивирования апикальных меристем картофеля

Объект	Количество меристем, %		Регенерация побегов	
	высажено	выжило	шт.	%

3. Клональное микроразмножение картофеля путем черенкования побегов

3.1. Пробирочное растение картофеля вынимают из пробирки, помещают в чашку Петри, разрезают на сегменты (отрезок стебля с листом и пазушной почкой).

3.2. Черенки помещают на питательную среду в пробирки, которые переносят в световую комнату.

3.3. Через 7 и 14 дней проводят наблюдение за развитием побега и зарисовывают последовательные этапы развития растения из черенка.

4. Клональное микроразмножение различных генотипов огурца.

4.1. Растения-регенеранты огурца, полученные из меристем разделяют скальпелем на сегменты.

4.2. Черенки помещают на питательную среду в пробирки, которые переносят в световую комнату.

4.3. Через 7 – 10 дней проводят наблюдение за развитием побега и зарисовывают последовательные этапы развития растения из черенка

5. Индукция образования адвентивных почек непосредственно на гипокотильных сегментах стерильных проростков подсолнечника (*Helianthus annuus* L.)

5.1. Вынимают растения подсолнечника из пробирки

5.2.. Скальпелем вырезают гипокотильную зону проростка, после чего ее делят на сегменты размером 0,4...0,5 см.

5.3. Полученные сегменты переносят на питательную среду.

5.4. Культуральные сосуды с высаженными эксплантами переносят в световую комнату.

5.5. Через 4-6 недель фиксируют образование адвентивных почек и полученные результаты записывают в рабочую тетрадь.

6. Клональное микроразмножение хризантем (*Chrysanthemum* L.)

6.1. Черенки хризантем помещают в марлевый мешочек и стерилизуют в течение 5...8 мин в 0,1%-ном растворе сулемы, после чего промывают в трех порциях стерильной дистиллированной воды.

6.2. Черенки вынимают из марлевого мешочка подрезают базальную часть побега.

6.3 Сохраняя ориентацию побега, его помещают вертикально в пробирки на питательную среду.

6.4. Через 4...5 недель культивирования наблюдается образование пазушных побегов, каждый из которых отделяют от материнского экспланта и после микрочеренкования самостоятельно культивируют на свежей питательной среде.

6.5. Для укоренения сформировавшихся микропобегов применяют ИУК или ИМК в концентрации 2 мг/л.

7. Клональное микроразмножение лилий (*Lilium* L.)

7.1. Чешуйки отделяют от луковицы у самого донца и промывают в растворе детергента в течение 15 мин, после чего ополаскивают проточной водой.

7.2 Чешуйки стерилизуют 0,1%-ным раствором сулемы в течение 10 мин и трижды промывают стерильной дистиллированной водой; места облома чешуек подрезают на расстоянии 1...1,5 мм от края, а тонкие клеточные слои — по бокам чешуек.

7.3. Чешуйки делят на сегменты размером 0,5 x 0,5 см, которые помещают на питательную среду в пробирки.

7.4. Культивирование растительного материала осуществляют в пробирках размером 20x200 мм, содержащих 10 мл питательной среды, а также в стеклянных банках вместимостью 100...200 мл с 20...50 мл питательной среды.

7.5. Экспланты выращивают в световой комнате, где поддерживают влажность воздуха 70%, температуру 25 °С, 24-часовое освещение белыми люминесцентными лампами с интенсивностью света 3...10 тыс. лк.

7.6. Через 4...5 недель после начала культивирования можно наблюдать образование меристематических очагов в виде микролуковиц. Их отделяют от материнского экспланта и самостоятельно культивируют на питательной среде.

7.7. Индукцию корнеобразования осуществляют на питательной среде, содержащей НУК или ИУК в концентрации 0,2...0,4 мг/л.

8. *Клональное микроразмножение сенполий (Saintpaulia ionantha H. Wendl.)*

8.1. С растений срезают листья и стерилизуют их 0,1%-ным раствором сулемы в течение 2 мин, после чего их промывают в трех порциях стерильной дистиллированной воды.

8.2. Листовой эксплант нарезают на сегменты 0,5 x 0,5 см, которые помещают горизонтально на питательную среду.

8.3. Культивирование сегментов осуществляют в чашках Петри в световой комнате при температуре 25 °С, 16-часовом фотопериоде, интенсивности света 3...5 тыс. лк.

8.4. Через 1...1,5 мес. наблюдается дифференциация меристематических очагов, из которых после отделения от материнского экспланта и самостоятельного культивирования на питательной среде формируются микророзетки.

8.5 Дорастивание микророзеток проводят на питательной среде МС, содержащей ИУК в концентрации 1 мг/л.

**Тема: Клональное микроразмножение
плодово-ягодных культур**

Общие сведения. Земляника (*Fragaria ananassa* Duch.). При культивировании апикальных меристем земляники на питательной среде с высоким содержанием БАП (или кинетина) (0,5... 1,0 мг/л) происходят подавление апикального доминирования верхушечной меристемы и активация развития пазушных меристем. Примерно через 2 недели после помещения изолированной верхушки на питательную среду основания разворачивающихся листьев начинают белеть, увеличиваться в размере. Вскоре из пазушных участков появляются пучки листьев, в пазухах которых также индуцируются почки, трогающиеся в рост. Через 1...2 мес. экспланты превращаются в конгломерат множества разновозрастных и разновеликих почек с развернутыми листьями. Они легко отделяются одна от другой, и каждая, будучи пересажена на свежую питательную среду, продолжает формировать новые пазушные почки. Таким образом, число точек роста увеличивается. Для дифференциации корней микрорастения пересаживают на среду, содержащую ауксин.

Виноград (*Vitis vinifera* L.). Одним из эффективных способов размножения сортов винограда является технология клонального микроразмножения.

Цель работы. Ознакомиться с:

- составом питательных сред для культивирования меристем и микроразмножения плодово-ягодных культур
- приемами клонального микроразмножения плодово-ягодных культур

Материалы и оборудование:

- усы земляники;
- пробирки с конгломератом почек земляники;
- интенсивно растущие зеленые побеги винограда;
- бинокулярная лупа;
- пинцеты, скальпели, препаровальные иглы;
- чашки Петри, стаканы;
- два фарфоровых стакана с 96%-ным и 70%-ным спиртом;
- 0,1 %-ный раствор сулемы;
- стерильная дистиллированная вода;
- спиртовка; спички;
- культуральные сосуды со стерильной питательной средой МС для культивирования апикальных меристем земляники (табл.1)

- культуральные сосуды со стерильной питательной средой для корнеобразования земляники (табл.1).
- чашки Петри и пробирки со стерильной питательной средой МС для клонального микроразмножения винограда (табл.1)

Таблица 1

**Состав питательны сред клонального микроразмножения
земляники и винограда**

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л		
		земляника		виноград
		апикальные меристемы	корнеобра- зование	
1.	Минеральные элементы	МС	МС	МС
2.	Витамины	МС	-	МС
3.	Аскорбиновая кислота	1,0	1,0	-
4.	Глюкоза	20000	-	-
3.	Сахароза	-	20000	20000
4.	Мезоинозит	100	100	50
5.	ИУК	-	0,5	-
6.	БАП	0,5	-	0,5
7.	ГК	-	-	1,0
8.	PVP	-	-	1000
8.	Агар-агар	7000	7000	7000
9.	pH	5,7 – 5,8	5,7 – 5,8	6,4 – 6,5

Порядок выполнения работы:

1. Земляника

1.1. Усы земляники промывают в мыльной воде и ополаскивают чистой водой (водопроводной и дистиллированной).

1.2. Скальпелем отделяют пазушные почки, находящиеся у основания листьев (можно вне ламинар-бокса).

1.3. В ламинар-боксе почки помещают в марлевый мешочек и погружают для стерилизации в 0,1%-ный раствор сулемы на 6...8 мин.

1.4. Мешочки вынимают за нитку из раствора и 5...6 раз промывают стерильной дистиллированной водой.

1.5. Стерильные почки переносят из мешочка в чашку Петри.

1.6. Для изолирования меристем почки помещают на предметное стекло или в чашку Петри и рассматривают под лупой при 4...9-кратном увеличении.

1.7. Почку освобождают от многочисленных листовых чешуек с помощью препаровальной иглы и скальпеля, после чего, придерживая ее иглой, изолируют конус нарастания с 1...2 листовыми примордиями.

1.8. Изолированную меристему переносят иглой в пробирку и помещают на питательную среду, горлышко пробирки предварительно обжигают над пламенем спиртовки.

1.9. Перед закрытием пробирки обжигают ее горлышко и ватную пробку.

1.10. Пробирки с меристемами ставят в световую комнату, где поддерживают 16-часовой фотопериод и температурный режим 25 °С.

1.11. Через 4 недели рассматривают и зарисовывают образовавшийся конгломерат. Отмечают число образовавшихся почек, которые используют для выполнения следующей работы.

1.12. Культуру апикальных меристем земляники используют через 3...4 недели после начала культивирования.

1.13. В стерильных условиях (в ламинар-боксе) из пробирки вынимают конгломерат почек и переносят в стерильную чашку Петри, где его разделяют с помощью скальпеля и пинцета на отдельные почки.

1.14. Каждую почку помещают в отдельную пробирку с питательной средой для укоренения.

1.15. Пробирки с растительным материалом переносят в световую комнату, где поддерживают температуру 26 °С, влажность 60 % и освещенность 10 000 лк.

2. Виноград

2.1. Интенсивно растущие зеленые побеги винограда разрезают на одноглазковые экспланты и стерилизуют в 0,1%-ном растворе сулемы в течение 5...8 мин, затем промывают в трех порциях стерильной дистиллированной воды.

2.2. Простерилизованные экспланты помещают в стерильную чашку Петри. С них удаляют покровные чешуи, последовательно обнажая верхушечную меристему с примордиальными листочками. Эту операцию проводят с помощью препаровальной иглы под бинокулярной лупой МБС-10 в ламинар-боксе.

2.3. Изолированные меристемы размером от 300 до 600 мкм помещают на поверхность агаризованной питательной среды.

2.4. Растительный материал выращивают в световой комнате, где поддерживают температуру 27...28°С, относительную влажность воздуха 70 %, освещенность 3...4 тыс. лк.

2.5. Через месяц культивирования меристемы развиваются в кластер-побеги размером 2...2,5 мм, которые повторно пересаживают на свежую питательную среду.

2.6. Через 45...55 дней формируются растения-регенеранты размером 6...10 см, которые размножают микрочеренкованием.

2.7. Укоренение микропобегов осуществляют на среде МС, содержащей ИМК в концентрации 2 мг/л.

Тема: Клональное микроразмножение хвойных культур

Общие сведения. Интерес к работе с хвойными вызван необходимостью сохранения генофонда некоторых пород, их декоративными свойствами и трудностью размножения черенками. Для можжевельника, например, клональное микроразмножение является наиболее перспективным способом, так как семена данной культуры обладают низкой всхожестью, наблюдается дегенерация зародышей, а при черенковании процент укорененных черенков не превышает 5...8 %. Введение в культуру криптомерии и ее последующее размножение необходимы для получения большого количества посадочного материала, который используют главным образом для посадки в садах и парках, где она ценится за декоративные свойства. Хвоя криптомерии очень густая, обладает способностью изменять окраску в зимний период, что делает эту породу еще более привлекательной. Что же касается остальных пород, за исключением некоторых видов семейства Сосновые, то размноженный посадочный материал в основном используют при озеленении городов.

Сосна обыкновенная (Pinus silvestris L.) и ель европейская (Picea abies L.). Для основных сосны обыкновенной и ели европейской в перспективе возможно включение способа культуры изолированных зародышей в систему селекции. В данном случае срок получения посадочного материала сокращается примерно в 3,5...4 раза. Так, в Канаде (пров. Онтарио) ежегодно высаживают на лесокультурную площадь более 60 млн. саженцев ели черной, выращенных из изолированных зародышей в стерильных условиях.

Цель работы. Ознакомиться с:

- составом питательных сред для микроклонирования хвойных культур
- приемами и условиями клонального микроразмножения хвойных культур

Материалы и оборудование:

- семена сосны обыкновенной или ели европейской;
- 0,1%-ный раствор сулемы,
- стерильная дистиллированная вода;
- стерильные стаканы (2 шт.), чашки Петри;
- пробирки со стерильной питательной средой для индукции образования адвентивных почек (табл.1);

- пинцеты, скальпели, препаровальные иглы;
- спиртовка, спирт, спички;

Таблица 1

Состав питательных сред для регенерации растений из изолированных зародышей сосны обыкновенной и ели европейской

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л	
		сосна обыкновенная	ель европейская
1.	Минеральные элементы	по прописи среды Грессхофф и Доу	по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС)
2.	Витамины	по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС)	по прописи среды Мурасиге-Скуга (МС)
3.	Сахароза	20000	10000
4.	Мезоинозит	10	10
5.	ИУК	0,1	0,01
6.	БАП	3,0	-
7.	Зеатин	-	1,0
8.	Агар-агар	7000	7000
9.	pH	6,0 – 6,2	4,7 - 5,0

Порядок выполнения работы:

1. Семена сосны или ели стерилизуют 0,1 %-ным раствором сулемы в течение 20 мин, дважды промывают стерильной дистиллированной водой по 20 мин, после чего оставляют в воде на ночь (15...20 ч) для набухания и облегчения процесса изолирования зародышей.

2. Для изолирования зародышей семя зажимают пинцетом и разрезают скальпелем посередине. После этого из средней части семени изолируют зародыш, который помещают горизонтально на стерильную питательную среду (по 2...3 шт. в одну пробирку).

3. Пробирки с изолированными зародышами помещают в световую комнату с температурой 25...26 °С, 16-часовым фотопериодом, влажностью воздуха 70 % (освещение белыми люминесцентными лампами 3...5 тыс. лк).

4. Пересадку эксплантов на свежую питательную среду осуществляют один раз в месяц.

5. Как правило, образование адвентивных почек происходит в апикальной части зародыша и на семядолях. Процессу образования адвентивных почек предшествует заметное набухание и разрастание семядолей, в результате чего они принимают шарообразную форму.

6. Через 3 недели на семядолях образуются меристематические очаги, из которых индуцируются адвентивные почки. В таких условиях выращи-

вания на одном зародыше образуется до 10... 15 почек *de novo*, которые способны развиваться в микропобеги

7. Для получения микропобегов зародыши вынимают из пробирки, помещают в стерильную чашку Петри и изолируют адвентивные почки от материнского экспланта.

8. Почки помещают на питательные среды, содержащие активированный уголь в концентрации 10 г/л.

9. В течение 5...6 недель культивирования на среде с активированным углем почки развиваются в побеги высотой 10... 15 мм, которые можно использовать либо с целью дальнейшего размножения, либо – укоренения.

10. Для укоренения применяют ИМК в концентрации 2...3 мг/л. Процесс ризогенеза происходит в течение 1...1.5 мес.

11. Сформировавшиеся растения переносят в почвенный субстрат.

Лабораторная работа № 12

Тема: Культура изолированных клеток и тканей в селекции растений

Общие сведения. Одним из основных направлений клеточных технологий является использование биотехнологических приемов при создании новых форм, сортов и гибридов растений, что позволяет облегчить и ускорить традиционный селекционный процесс.

Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей *in vitro* условно можно разделить на две группы: вспомогательные и основные.

Первая группа – это вспомогательные технологии, которые дополняют традиционные селекционные методы. К ним можно отнести:

- оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости);
- культивирование семян и незрелых гибридных зародышей (преодоление постгамной несовместимости);
- получение гаплоидов путем культивирования пыльников и микроспор;
- криосохранение изолированных клеток, тканей и органов;
- клональное микроразмножение отдаленных гибридов.

Методы второй группы используют для получения новых форм и сортов растений. К таким методам относят:

- клеточную селекцию с использованием каллусной ткани;
- соматическую гибридизацию (слияние изолированных протопластов и получение неполных гибридов);
- получение трансгенных растений.

Вспомогательные технологии. *Культура изолированных пыльников. Получение гаплоидных растений.* Культивирование *in vitro* пыльцы и пыльников позволяет получать гаплоидные растения и каллусные ткани. Это представляет большой интерес для генетики и селекции, так как у гаплоидов легче выявить и отобрать ценные мутации, а с помощью колхицина можно получить полностью гомозиготные диплоидные растения.

Гаплоидия – процесс, приводящий к получению растений с уменьшенным вдвое набором хромосом. В системах *in vitro* гаплоиды получают путем культивирования пыльников и микроспор. Поскольку гаплоиды, полученные в культуре пыльников, несут генотип мужской гаметы, этот процесс называется андрогенезом *in vitro*.

В условиях культуры *in vitro* индукция роста микроспор и образования эмбриоидов осуществляется двумя путями: прямым эмбриогенезом или через образование каллуса с последующим индуцированием органогенеза. В обоих случаях это происходит иначе, чем в условиях *in vivo*. Более желателен прямой андрогенез, при котором микроспора ведет себя как зигота и проходит целый ряд этапов эмбриогенеза, вплоть до образования на пыльнике растений. В случае непрямого андрогенеза микроспора дает начало каллусу, в котором на той же среде начинается образование эмбриоидов. При этом не все растения, регенерировавшие из каллуса, являются гаплоидными. Поэтому для массового получения гаплоидов необходимо индуцировать пыльцевой эмбриогенез.

При выделении пыльников из цветочных бутонов и помещении их на питательную среду индуцируется спорофитный путь развития микроспор. Внутри пыльника происходят многочисленные деления микроспор и образуется многоклеточный комплекс, из которого формируются различные

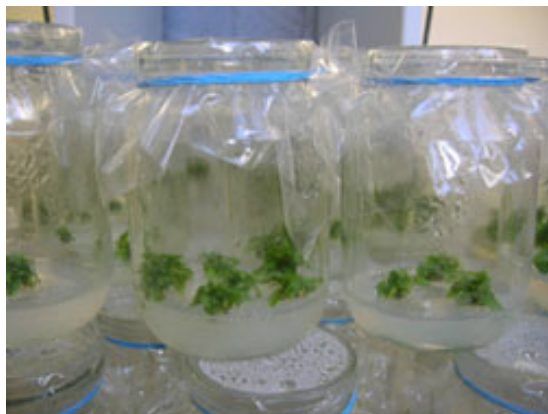


Рис. 1 Микроклонирование хвойных растений

андрогенные структуры (глобулы, эмбриониды), дающие начало гаплоидным растениям.

Индуктирование андрогенеза в значительной степени зависит от комплекса факторов, главными из которых считаются генотип, физиологическое состояние растения-донора и экспланта, стадия развития пыльцы, состав питательных сред, условия культивирования и др.

Пыльники следует брать в момент первого митоза или после его завершения. Для этой цели пригодны нераспустившиеся цветочные бутоны с пыльниками, содержащими одноклеточные микроспоры.

У многих видов лучший выход микроспор обеспечивается при помещении культивируемых пыльников в условия с низкими температурами на определенное время. Например, при культивировании пыльников ячменя в течение 28 дней при 4 °С или в течение 14 дней при 7 °С получают оптимальные результаты.

Для образования эмбрионидов необходимы сахароза и железо. Сахарозу вносят в питательную среду в концентрации 2...4 %, но для пыльников некоторых культур (ячменя, томатов, пшеницы) концентрация должна быть повышена до 6... 12 %. Железо лучше применять в комплексе с хелатами ($\text{Fe}_2\text{ЭДТА}$).

Цель работы. Ознакомиться с:

- цитологическим методом определения стадии развития пыльцы
- составом питательных сред для культивирования пыльников
- приемами выделения и условиями культивирования пыльников

Материалы и оборудование:

- цветочные бутоны растений,
- молодые колосья пшеницы (до выколашивания) (10 шт.);
- бинокулярная лупа;
- стерильные пинцеты, скальпели;
- стерильные чашки Петри;
- стаканы (2 шт.);
- стерильная дистиллированная вода;
- гипохлорит кальция или натрия, либо 0,1%-ный раствор диацита (или сулемы);
- 3%-ный ацетокармин;
- спиртовка; спирт; спички; вата;
- чашки Петри с питательной средой МС для культивирования пыльников (таблица 1);
- чашки Петри с питательной средой МС для индукции эмбриогенеза в культуре пыльников мягкой пшеницы (табл. 1);

Состав питательных сред для культивирования пыльников растений

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л	
		пыльники	
		растений	мягкой пшеницы
1.	Минеральные элементы и витамины	МС	МС
2.	Сахароза	30000	120000
3.	Мезоинозит	-	100
4.	2,4-Д	2,0	1,5
5.	БАП	0,8	-
6.	Агар-агар	-	6500
7.	pH	5,7 – 5,8	5,7 - 5,8

Порядок выполнения работы:***1. Культура изолированных пыльников***

1.1. Микроспоры, выделенные из пыльников, окрашивают 3%-ным ацетокармином и с помощью микроскопа определяют стадию развития пыльцы в пыльниках.

1.2. Отбирают бутоны с пыльниками, содержащими преимущественно одноядерные микроспоры. Важно, чтобы пыльники были отобраны из относительно молодых растений, выросших в нормальных условиях освещения. У старых растений к концу цветения образуются мелкие бутоны, которые содержат пыльники с гетерогенной смесью микроспор и дефектной пыльцой.

Отделяют цветочные почки, помещают по 20 шт. в раствор стерилизующего агента на 5... 10 мин, затем 2...3 раза промывают стерильной водой.

Делают надрез на одной стороне почки и с помощью пинцета с тонкими кончиками собирают тычинки в стерильные чашки Петри.

От тычинок отделяют пыльники и помещают по 5 шт. в культуральный сосуд.

1.6. Изолирование неповрежденных пыльников из очень маленьких цветочных почек следует проводить под бинокулярной лупой. У мелких бутонов удаляют только венчик и помещают целую почку на питательную среду таким образом, чтобы пыльники были в непосредственном контакте со средой. Наличие других частей цветка не влияет на развитие пыльцы.

Поврежденные пыльники обязательно отбраковывают, так как в противном случае это ведет к гибели всех пыльников и, кроме того, каллусная ткань может образовываться не из пыльцы, а из соматических диплоидных клеток.

1.7. Пыльники культивируют на питательной среде при 24...27 °С и экспонируют при освещенности около 2000 лк и 14-часовом фотопериоде.

1.8. Растения, образующиеся из пыльцы, за 3 - 8 недель достигают высоты около 5 см, после чего их вынимают из пробирок и пересаживают в горшки со стерильной почвой. В первое время горшки необходимо накрывать стаканом для создания влажной атмосферы.

2. *Культура пыльников мягкой пшеницы (Triticum aestivum L.)*

2.1. Стадию развития пыльцы в пыльниках определяют цитологическим методом. Для этого пинцетом извлекают пыльники на предметное стекло, дробят на мелкие кусочки, окрашивают ацетокармином, подогревая над пламенем спиртовки, и определяют под микроскопом стадию развития пыльцы.

2.2. Колосья пшеницы помещают для стерилизации в 0,1%-ный раствор сулемы и выдерживают 10...15 мин. Затем сулему сливают, а колосья промывают в 3...5 объемах стерильной дистиллированной воды, переносят в чашки Петри на фильтровальную бумагу.

2.3. Под бинокулярной лупой, придерживая пинцетом колос, отгибают листовые обертки и извлекают пыльники (поврежденные удаляют), которые быстро переносят в чашки Петри с агаризованной средой МС, слегка вдавливая для лучшего контакта со средой.

2.4. Культуры инкубируют при 23...25 °С без доступа света в течение 3...5 недель.

Лабораторная работа № 13

Тема: Культура изолированных зародышей растений

Общие сведения. При отдаленной гибридизации наблюдается так называемая постгамная несовместимость, в результате которой зародыш остается недоразвитым и неспособным к нормальному прорастанию. Нарушения в развитии зародыша проявляются в замедлении темпов роста и отсутствии дифференцировки клеток.

Процесс культивирования незрелых зародышей состоит из двух этапов – эмбрионального роста, во время которого продолжается дифференциация, и его прорастания. Для первого этапа требуется питательная среда более сложного состава.

Незрелые зародыши изолируют обычно через 2 недели после опыления, но этот срок может быть другим в зависимости от комбинаций скрещивания и погодных условий. Целесообразнее начать наблюдение за развитием гибридных зерновок начиная уже с 9... 10-го дня после опыления,

обнаружив замедление или остановку роста, ухудшение внешнего вида зерновок, немедленно приступить к изолированию и высадке зародышей на питательную среду.

Цель работы. Ознакомиться с:

- составами питательных сред для культивирования изолированных зародышей
- приемами изолирования зародышей и условиями их культивирования

Материалы и оборудование:

- зрелые зерновки пшеницы, замоченные в воде за 1 сутки до занятия;
- стерильные пинцеты, скальпели;
- стерильные чашки Петри;
- марлевые мешочки;
- стерильная дистиллированная вода;
- 0,1%-ный раствор диациды (или сулемы);
- спиртовка; спирт, спички;
- культуральные сосуды со стерильной питательной средой МС для культивирования изолированных зародышей пшеницы (табл. 1).

Таблица 1

**Состав питательной среды
для культивирования изолированных зародышей пшеницы**

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л
1.	Минеральные элементы и витамины	МС
2.	Сахароза	15000
3.	Агар-агар	7500
4.	рН	5,8

Порядок выполнения работы:

Предварительно замоченные семена стерилизуют спиртом в течение 2...3 мин, затем помещают по 10...20 шт. в марлевые мешочки и стерилизуют в растворе диациды или сулемы 15 мин.

Семена промывают 3...5 раз стерильной дистиллированной водой в том же стакане, в котором проводили стерилизацию.

Пинцетом переносят зерновки в стерильную чашку Петри.

Зерновку кладут бороздкой вниз и, придерживая пинцетом, остро отточенным скальпелем или иглой рассекают оболочку и выделяют зародыш.

Зародыш, повернутый щитком вниз, переносят в пробирку или чашку Петри со средой МС без гормонов.

Через 2...3 недели зарисовывают проростки, образовавшиеся из зародышей.

Лабораторная работа № 14

Тема: Культура изолированных протопластов

Общие сведения. Методы традиционной селекции позволяют получать новые формы организмов используя процедуру полового скрещивания и последующего отбора желаемых генотипов.

В соответствии с законами биологии половое скрещивание может осуществляться в подавляющем большинстве случаев только в пределах вида, что накладывает определенные ограничения на возможность комбинирования генов и получение гибридов с желаемыми признаками. Преодоление ограничений, свойственных половому процессу, стало возможным благодаря разработке технологии соматической гибридизации путем слияния протопластов и дальнейшей регенерации из гибридных клеток растительных форм.

Создание неполовых гибридов путем слияния изолированных протопластов называют соматической гибридизацией

Слияние изолированных протопластов является одним из методов гибридизации соматических клеток растений и, следовательно, способом создания генетического разнообразия. Главным преимуществом данного метода является возможность переноса генов на отдаленные таксономические расстояния, при этом гибридизация соматических клеток дает возможность не только соединить в одном ядре гены далеких видов растений, но и сочетать в гибридной клетке цитоплазматические гены партнеров.

Благодаря методам соматической гибридизации успешно преодолевается естественная нескрещиваемость филогенетически отдаленных видов растений и, кроме того, создаются дополнительные резервы наследственной изменчивости.

Выделение и культивирование изолированных протопластов. Метод, позволяющий получать изолированные протопласты растительных клеток, начал успешно развиваться после 1960 г., когда И. К. Коккинг впервые осуществил ферментативное разрушение клеточной стенки и выделил «голые» протопласты.

Протопласты выделяют из каллусных, суспензионных клеток, а также из клеток различных органов растения. В последнем случае подготовленный растительный материал, например, сегменты листьев, лишенные эпидермиса, подвергают энзиматической обработке пектиназой и целлюлазой.

Культивирование изолированных протопластов осуществляют на тех же питательных средах, на которых поддерживают культуры изолированных клеток и тканей с дополнительным включением высокой концентрации маннита или CaCl_2 на начальных этапах культивирования для обеспечения повышенного осмотического давления.

Культивируемые протопласты должны обладать способностью к делению и регенерации целостного растительного организма. В процессе культивирования изолированные протопласты регенерируют новую клеточную стенку и превращаются в клетки, способные делиться и формировать каллусную ткань. Следующим этапом является получение из каллусной ткани растений-регенерантов. Наиболее успешно осуществляется регенерация из протопластов пасленовых и ряда других культур, в настоящее время не удалось добиться подобных результатов от большинства злаковых культур.

Слияние изолированных протопластов. Достаточно редко процесс слияния изолированных протопластов может осуществляться спонтанно.

Для индуцированного слияния протопластов используют фьюзогены, т.е. индукторы слияния. Коккинг и сотр. в 1970 г. впервые осуществили индуцированное слияние изолированных протопластов, в качестве индуктора в данных исследованиях использовался нитрат натрия.

Сегодня наиболее эффективными индукторами считаются растворы с высоким рН (9...11) и высокой концентрацией ионов кальция (100...300 мМ). Протопласты предварительно агглютинируют с помощью концентрированных растворов полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500...6000. В качестве индуктора могут быть использованы импульсы электрического тока.

В результате слияния протопластов формируются гибриды или цибриды (рис. 1).

Цибридная клетка содержит цитоплазму обоих партнеров, а ядро – одного. Образование такой клетки возможно в том случае, если после слияния протопластов не происходит соединения ядер, и одно ядро дегенерирует. Цибрид может образоваться и в том случае, если один из протопластов лишен ядра или оно инактивировано путем облучения.

Цибридизация позволяет ввести цитоплазматические гены, несущие признаки ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности) и признаки устойчивости к некоторым гербицидам и патогенам.

При соматической гибридизации используют большие популяции клеток обоих родителей. При обработке смешанной суспензии протопластов фьюзогенами часть из них сливается друг с другом, но в суспензии остаются и неслившиеся протопласты. В дальнейшем как гибридные, так и неслившиеся протопласты регенерируют клеточные стенки и переходят к делениям.

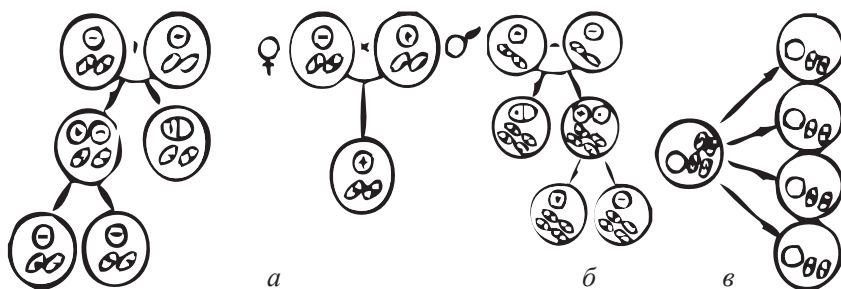


Рис. 1 Схемы наследования (по Г.С. Муромцеву и др., 1984)
 а – родительских ядерных (кружок) и внеядерных (овал) детерминант при парасексуальной (слева) и половой (справа) гибридизациях;
 б – при парасексуальной гибридизации с учетом как минимум двух независимых внеядерных генофоров;
 в – генетическое разнообразие парасексуальных потомков, возникающее дополнительно к цитоплазматическим гетерозиготам вследствие соматической сегрегации внеядерных генофоров

Первый неполовой межвидовой гибрид высших растений был получен в 1972 г. путем слияния изолированных протопластов двух видов табака: *Nicotiana glauca* и *N. langsdorffii*.

В настоящее время методом парасексуальной гибридизации получено большое число межвидовых, межсемейственных и межтрибных гибридов (триба – таксономическая единица между семейством и родом). Однако во многих случаях гибридные растения, полученные таким путем, в той или иной степени аномальны, что является результатом хромосомной несбалансированности.

Особый интерес представляют межцарственные клеточные гибриды, полученные от слияния протопластов растительных и животных клеток.

Отбор гибридных (слившихся) протопластов из общей суспензии проводят либо на клеточном уровне, либо на стадии регенерации.

Для идентификации гибридов могут служить пластиды. Например, при слиянии протопластов табака и моркови в качестве селективных маркеров были использованы зеленые хлоропласты табака и красно-оранжевые хромопласты моркови.

Цель работы. Ознакомиться с:

- составами питательных сред для получения, культивирования и слияния протопластов
- методами получения и условиями культивирования протопластов

Материалы и оборудование:

- листья картофеля (табака);

- каллусная ткань;
- насос Комовского;
- инвертированный микроскоп;
- центрифуга (100...1000 мин⁻¹);
- качалка;
- камера Фукса-Розенталя;
- стеклянные фильтры;
- колбы Эрленмейера;
- стерильные чашки Петри;
- пастеровские пипетки;
- колбочки со стеклянными воронками;
- капроновая сетка N 70 (диаметр пор 93 мкм);
- полуавтоматическая пипетка на 1 мкл;
- наконечники для микропипеток;
- центрифужные пробирки на 10 мл;
- стерильные инструменты (скальпели, пинцеты)
- реактивы: Д-маннит, НУК, 2,4-Д, сахара, агар
- ферментные смеси для выделения протопластов (табл.1);
- стерильная питательная среда для культивирования и слияния протопластов (табл.1)

Таблица 1

**Состав сред и растворов для получения, культивирования
и слияния протопластов (рН 5,6-5,8)**

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л
Питательная среда W-5 (1000 мл)		
1.	CaCl ₂ ·2H ₂ O	18400
2.	NaCl	9000
3.	KCl	400
4.	Глюкоза	1000
Раствор ПЭГ (100 мл)		
1.	Глюкоза	2000
2.	CaCl ₂ ·2H ₂ O	150
3.	KH ₂ PO ₄	100
4.	ПЭГ с молекулярной массой 6000	50000
Буферная смесь (920 мл)		
1.	Натрий-глициновый буфер	10 мл
2.	Глюкоза	1200
3.	ДМСО	2
4.	CaCl ₂ ·2H ₂ O	266

Питательная среда МО-1 (1000 мл)		
1.	Минеральные соли и витамины	МС
2.	Сахароза	10000
3.	Маннитол	62000
4.	Глюкоза	10000
5.	Мезоинозит	100
6.	Биотин	0,5
7.	Пролин	2,0
8.	Гидролизат козеина	300
9.	Дрожжевой экстракт	300
10.	Альбумин яичный	200
11.	НУК	2,0
12.	ИУК	1,0
13.	БАП	1,5
14.	2,4-Д	1,0
15.	Зеатин	0,1

Порядок выполнения работы.

1. Культура изолированных протопластов

1.1. Для опыта используют пробирочные растения картофеля, выращенные на модифицированной питательной среде МС.

1.2. В стерильных условиях листья картофеля (возраст растений 15...20 дней с момента посадки черенка на среду) нарезают узкими полосками (до 1 мм) и помещают в колбы Эрленмейера на 100 мл с ферментативным раствором (0,25 г листовой ткани на 10 мл раствора).

1.3. В качестве фермента наибольший эффект оказывает ксилантаза в концентрации 2 % при pH 6,1 инкубационного раствора.

1.4. Ферментный раствор пропускают через стеклянные фильтры в течение 3...4 мин с помощью вакуум-насоса Комовского.

1.5. Листовую ткань оставляют на поверхности раствора на 5 ч при температуре 25 °С на качалке (80 мин⁻¹).

За это время практически все протопласты мезофилла листа освобождаются от клеточных стенок и суспендируются в инкубационной среде.

1.6. Для удаления остатков эпидермиса и жилок листа суспензию протопластов профильтровывают через капроновую сетку, а затем отмывают от ферментов двухкратным центрифугированием в 13% растворе маннита с добавлением 0,05% $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$.

На отсутствие клеточной стенки указывает тот факт, что в присутствии полиэтилен-гликоля (ПЭГ) с молекулярной массой 2000 и концентрацией 25 % протопласты легко сливаются.

Изолированные протопласты очень чувствительны к осмотическому давлению раствора и роду осмотика.

1.7. Для высева протопласты суспендируют до плотности 130 000 протопластов в 1 мл (плотность определяют в камере Фукса-Розенталя).

1.8. Протопласты культивируют в жидкой модифицированной питательной среде МС. Концентрация маннита составляет 0,35 М, НУК — 3 мг/л, 2,4-Д — 2 мг/л, сахарозы — 20 г/л.

1.9. В чашки Петри в стерильных условиях наливают по 1,5 мл суспензии и оставляют в световой комнате при 25 °С, 16-часовом фотопериоде.

2. Слияние растительных протопластов

2.1. Источником получения каллусных протопластов могут быть как свежееиндуцированные (1...2 пассажа), так и длительно выращиваемые каллусные ткани, предварительно прошедшие 2...3 пассажа на агаризованных или жидких питательных средах в темноте при температуре 25 °С.

2.2. Материалом для получения мезофильных протопластов могут служить листья растений, выращенные в теплице или в поле. Наиболее удобны для работы листья растений, выращиваемых в стерильных условиях в световой комнате.

2.3. Для получения большого количества протопластов из каллусной ткани используют ферментную смесь, приготовленную на основе среды W-5 (табл.1), а мезофильных — на основе 0,45 М раствора маннитола или 0,5 М раствора сахарозы.

2.4. Ферментацию проводят при температуре 20...25°C в течение 10...16 ч в темноте.

2.5. Изолированные протопласты фильтруют через воронку с капроновой сеткой и диаметром пор 60... 100 мкм.

2.6. Фильтрат центрифугируют 3...4 мин при 500...700 мин⁻¹, надосадочную жидкость сливают.

2.7. Протопласты ресуспендируют в 10 мл среды W-5 или в 0,45 М растворе маннитола, процедуру повторяют еще 1...2 раза.

2.8. Индуцированное слияние протопластов проводят обычно по методике «ПЭГ — высокое значение рН — высокое содержание Ca²⁺».

2.9. Каллусные и мезофильные протопласты, отмытые от ферментного раствора, смешивают в соотношении 1:1 или 2:1 в конечном объеме суспензии 1...2 мл.

2.10. Суспензию протопластов пипеткой переносят в чашки Петри диаметром 4 см и оставляют на 10...20 мин для осаждения. Диаметр наносимой капли равен примерно 1 см.

2.11. Через 10...20 мин к смеси протопластов, осевших на дно чашки Петри, осторожно добавляют сверху или сбоку 1...3 капли раствора ПЭГ и выдерживают 5...25 мин.

За это время происходит слипание и агрегация родительских протопластов, сцепленных с дном чашки Петри. Они меняют свою сферическую форму и слегка плазмолизуются. Одновременно происходит превращение 2...3-слойного осадка протопластов в однослойную «сеточку».

2.12. Через 20...25 мин к препарату добавляют 5...6 капель буферного раствора (табл.1). Процедуру повторяют дважды с интервалом 10 мин.

В зависимости от конкретного растительного материала разбавление буферной смесью можно проводить один раз, добавляя при этом 0,5... 1,0 мл буферной смеси на чашку Петри.

2.13. Через 30 мин после обработки препарата буферной смесью раствор ПЭГ-буфер осторожно отбирают пипеткой, не оголяя слоя протопластов.

2.14. Затем протопласты троекратно, с интервалом 5... 10 мин, отмывают питательной средой МО-1 (табл.1) (общий объем 8... 10 мл).

2.15. В дальнейшем смесь гибридных и родительских протопластов культивируют в тонком слое питательной среды МО-1 (1 мл) на рассеянном свете при температуре 25 °С 3...10 сут.

3. *Механическая изоляция и культивирование индивидуальных продуктов слияния.*

После слияния смесь гибридных и родительских протопластов культивируют на питательных средах, богатых органическими компонентами, до наступления первых делений в гибридных клетках. Обычно они активно делятся на питательных средах, индуцирующих деление каллусных протопластов одного из родителей, хотя подбор оптимальной среды почти всегда осуществляют эмпирическим путем.

3.1. За 2...12ч до начала работы по механическому «отлову» единичных продуктов слияния культуру протопластов разбавляют свежей питательной средой (в 5... 10 раз) и переносят в чашки Петри диаметром 6 см.

3.2 Одновременно готовят чашки Купрака: их внешнюю камеру заполняют раствором 0,25М маннитола (для создания необходимой влажности), номерные ячейки внутренней камеры заполняют питательной средой объемом 0,5 мкл.

3.3. Делящиеся гибридные клетки отбирают полуавтоматической микропипеткой на 1 мкл.

3.4. При помощи инвертированного микроскопа идентифицируют продукты слияния, претерпевшие 2...3 деления. Они имеют морфологию каллусных клеток, но содержат вокруг ядра и частично в цитоплазме зеленые хлоропласты, происходящие от мезофильных протопластов второго родителя.

Для «отлова» клеток микроскоп настраивают на 100...200-кратное увеличение.

3.5. Наконечник микропипетки подводят к гибридной клетке и начинают медленно втягивать 1 мкл среды.

3.6. Отобранную клетку осторожно вдавливают в номерную ячейку внутренней камеры чашки Купрака, микропипетку при этом держат вертикально, не касаясь наконечником дна ячейки.

3.7. В чашке Купрака делящиеся гетерокариоциты культивируют 6...8 дней, после чего в каждую ячейку добавляют по 1 мкл свежей среды.

3.8. Через 14...20 дней гибридные колонии помещают в капли (100...200 мкл) свежей питательной среды и постепенно (через 5...6 дней) пересаживают на среду с пониженной концентрацией осмотика (по схеме 0,45 М → 0,3 М → 0,2 М).

3.9. После 7-дневного роста на жидкой питательной среде с 0,2 М осмотиком колонии гибридных клеток делят на две части. Одну часть переносят на агаризованные питательные среды с цитокининами для индукции органогенеза, а другую используют для цитогенетического анализа с целью изучения числа и морфологии хромосом и доказательства гибридности по клеточному ядру.

3.10. В некоторых случаях, в зависимости от использования конкретного растительного материала, удастся довольно четко идентифицировать гибридные клоны на стадии 10 клеток и более. Тогда операцию по механическому изолированию можно упростить, высаживая «отловленные» клоны в капли полужидкой среды для культивирования объемом 30...50 мкл. Подобные среды готовят путем добавления к жидкой питательной среде 0,2%-ного агара. Миникапли (10... 15 шт.) переносят микропипеткой в чашку Петри диаметром 4 см, предварительно заполнив полужидкой средой ее боковое пространство (по периметру) для поддержания необходимой влажности.

3.11. Через 15...20 дней проводят пересадку микроколоний на среды с пониженной концентрацией осмотика по схеме, описанной ранее.

Лабораторная работа № 15

Тема: Клеточная селекция растений

Общие сведения. Клеточная селекция – метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных факторов *in vitro*. Данный метод позволяет на основе соматоклональных вариаций или индуцированных мутаций отбирать в жестких селективных условиях *in vitro* клетки, характеризующиеся желаемыми признаками. Использование клеточной селекции в 2...4 раза ускоряет процесс создания новых форм растений.

Различают следующие виды клеточной селекции:

- прямую (позитивную) селекцию, при которой выживает лишь определенный искомый мутантный тип клеток;
- непрямую (негативную) селекцию, основанную на избирательной гибели неустойчивых делящихся клеток, но требующую дополнительной идентификации у них мутационных изменений;
- тотальную селекцию, при которой индивидуально тестируют все клеточные клоны;
- визуальную селекцию и неселективный отбор, когда вариантная линия может быть идентифицирована среди всей популяции клеток визуально или при использовании биохимических методов (тонкослойная или жидкостная хроматография, радиоиммунный анализ, микроспектрофотометрия и др.).

Прямая клеточная селекция является наиболее распространенным методом, который применяется главным образом для выделения растений-регенерантов, устойчивых к гербицидам, антибиотикам, токсинам, тяжелым металлам, солям и другим антиметаболитам.

Для проведения работ по клеточной селекции растений в условиях *in vitro* в качестве объекта исследования могут быть использованы каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты. Выбор объекта зависит от наличия разработанных технологий применительно к различным видам растений, а также от конечных целей исследования.

Каллусная ткань представляет собой легкодоступный материал, который наиболее часто используют для клеточной селекции. Как правило, работу проводят на первичной или пересадочной каллусной ткани, которая не утрачивает способности к регенерации на протяжении нескольких субкультивирований. Однако при работе с каллусными культурами отмечают определенные недостатки:

- медленный рост ткани,
- неравноценное для всех клеток действие токсических веществ, которые применяются в качестве селективного фактора
- потеря регенерационной способности в процессе культивирования каллусных клеток.

Несомненно, селекцию более целесообразно проводить на уровне одиночных клеток (суспензионная культура, протопласты). Однако для многих видов растений не разработаны эффективные технологии и способы культивирования одиночных клеток. Поэтому, несмотря на перечисленные выше недостатки использования каллусных культур, этот способ селекции остается для некоторых видов растений пока единственным.

Создание стабильно устойчивых клеточных линий является длительным процессом. Обычно отбор начинают с получения достаточного

количества каллусной массы из растительных эксплантов. В дальнейшем каллусную массу используют для определения концентрации селективного фактора (построение дозовой кривой), при которой наблюдается одновременно как рост каллусной ткани, так и гибель части каллусных колоний. Выбранную концентрацию селективного фактора считают оптимальной и используют в дальнейших экспериментах. Так как колонии клеток, первично полученные на средах с селективными факторами, могли возникнуть вследствие физиологической адаптации или определенного состояния дифференцировки клеток и не быть генетически устойчивыми, то в течение последующих 4...6 субкультивирований на селективной среде проверяют стабильность устойчивости полученных клонов. Затем их переносят на среду без селективного фактора и субкультивируют еще 2...3 пассажа. И только после повторного возвращения в селективные условия отбирают стабильные клоны, из которых предполагается получить растения-регенеранты.

Исследования по получению растений, устойчивых к повышенным концентрациям солей, а также к токсинам, выделенным из грибов – возбудителей болезней, выявили в ряде случаев отсутствие прямой корреляции между устойчивостью клетки и устойчивостью целостного растительного организма, полученного от этой клетки, к исследуемому селективному фактору. Вместе с тем, прямая корреляция отмечена между устойчивостью растений и клеток *in vitro* к низким температурам, гербицидам, высоким концентрациям алюминия и другим факторам.

Большое число работ по культивированию каллуса с целью получения нового селекционного материала проведено на пшенице, ячмене, рисе, сорго, а также на картофеле, томатах, люцерне. Достигнуты положительные результаты по созданию растений пшеницы, риса, картофеля, устойчивых к NaCl или Na₂SO₄. Получены растения картофеля, устойчивые к кольцевой гнили. Работы данного направления для древесных культур в основном носят поисковый характер.

Помимо каллусных, суспензионных культур и культуры изолированных протопластов в качестве исходного материала для селекции могут быть использованы культуры соматических или андрогенных эмбриоидов.

Использование селективных сред, содержащих NaCl

Одним из лимитирующих факторов растениеводства является засоление почв. Около 900 млн. га всех земель нашей планеты имеют повышенное содержание солей, и их количество с каждым годом возрастает, в том числе и за счет применения искусственного орошения. С развитием биотехнологии появилась возможность получать солевыносливые генотипы у важных сельскохозяйственных культур путем селекции на уровне соматических клеток, слияния протопластов или переноса генов при использовании техники рекомбинантных молекул ДНК.

Засоление обуславливает нарушение осмотического баланса клетки и оказывает прямое токсическое влияние ионов натрия, хлора на физиологические и биохимические процессы в клетке. В результате данных воздействий наблюдается уменьшение тургора клетки, ингибирование функций мембран и активности ферментов, подавление фотосинтеза, снижение концентрации отдельных ионов из-за нарушения селективного транспорта этих частиц, а также затрачиваться значительное количество энергии для поддержания толерантности. Основные типы реакций растений, возникающие в ответ на повышение концентрации солей во внешней среде, приведены на рисунке 6.

Экспериментальные данные показывают, что клеточные механизмы устойчивости к повышенным концентрациям солей являются сходными для культивируемых *in vitro* клеток и целостного растительного организма. Таким образом, селекция на клеточном уровне представляет реальную перспективу получения устойчивых форм растений.

Большинство селекционных программ направлено на выделение *in vitro* клеточных линий, толерантных к присутствию в среде для культивирования хлорида натрия. Так, при выращивании гаплоидных каллусных клеток табака на среде с постоянно увеличивающейся концентрацией солей, были получены клеточные линии, способные к росту в присутствии 1%-ного NaCl. Отмечено, что устойчивость к засолению среды проявлялась на организменном уровне у полученных растений-регенерантов.

Солевыносливость растений также можно повысить в результате селекции к осмотическому стрессу. Например, клетки томата, адаптированные к водному стрессу, индуцированному полиэтиленгликолем, обладали повышенной устойчивостью к NaCl. Повышенная толерантность к соли обнаружена у клеточных линий моркови, отобранных на среде, содержащей в качестве осмотика маннитол в высокой концентрации (99...870 мМ). Следовательно, адаптация клеток к осмотическому стрессу применима для отбора солевыносливых вариантов, а исследования подобного рода представляют интерес для изучения как во взаимодействии, так и независимо друг от друга.

Получение культурального фильтрата патогенов.

Для увеличения производства продуктов питания экономически важным представляется защита растений от болезней и вредителей. Применение клеточной селекции для получения форм, устойчивых к патогенам, является актуальным и перспективным направлением. Для клеточной селекции в качестве селективных агентов с успехом используют патотоксины, культуральные фильтраты (КФ) и непосредственно патогены.

Одним из главных защитных механизмов, лежащих в основе сверхчувствительности растений к патогенам, является синтез растениями de

ново антимикробных веществ, называемых фитоалексинами. Защитные реакции у растений, например синтез фитоалексинов, образование белков, связанных с патогенезом, лигнификация, могут быть индуцированы целым рядом веществ биотической или абиотической природы, которые называют элиситорами. Абиотическими элиситорами могут быть ионы ртути, полиакриловая и салициловая кислоты. К биотическим элиситорам относятся компоненты клеточных стенок грибов, вещества, присутствующие в культуральных фильтрах.

Наиболее простой подход в селекции *in vitro* на устойчивость к болезням связан с культивированием клеток непосредственно в присутствии патогена. Этот подход может быть особенно полезным, когда о токсических веществах, ответственных за патогенез, мало известно или в случае, если патоген не продуцирует токсины. Однако этот способ селекции имеет некоторые сложности в проведении экспериментов. Для правильной схемы селекции, прежде всего, необходимо знать жизненный цикл патогена. Многие патогены, например грибы, имеют различные стадии жизненного цикла, несколько стадий спороношения, в зависимости от которых могут изменяться выживаемость, рост и эпидемиология. Поэтому следует учитывать стадию спороношения. Также существенными факторами для инфицирования могут служить световой и температурный режимы, относительная влажность, pH, наличие или отсутствие питательных веществ, что сказывается на прорастании спор.

Исследования по культивированию растительных клеток в присутствии патогена были начаты в середине 60-х гг. XX в. и направлены на изучение корреляции устойчивости (чувствительности) к патогену *in vivo* и *in vitro*. Непосредственно эксперименты по клеточной селекции на устойчивость к патогенам не всегда оказывались успешными. Однако следует отметить, что китайскими учеными были получены два новых высокоурожайных сорта риса, устойчивых к пирикулярриозу. Селекцию проводили на культуре изолированных пыльников, а в качестве селективного фактора применяли смесь десяти линий гриба. В настоящее время новые сорта занимают в Китае более 140 тыс. га и обеспечивают среднюю урожайность 7,5 тыс. кг/га.

Один из перспективных методов селекции растений, устойчивых к болезням, основан на использовании в качестве селективного агента патотоксинов, которые обычно синтезируются патогенами. Роль токсинов в болезнях растений не всегда ясна. Известно, что только незначительное количество патотоксинов играет существенную роль в инициации и (или) развитии болезни. По их действию некоторые авторы делят патотоксины на три категории.

К первой категории относят токсины, которые не являются определяющими в заболевании; они отличаются неспецифическим токсическим

действием по отношению к хозяину и токсичны для широкого круга растений. Примером может служить табтоксин, продуцируемый *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, являющийся возбудителем бактериальной рябухи табака.

Токсины второй категории обладают такой же специфичностью по отношению к растениям, как и патоген, но они также не ответственны за развитие болезни. К этой категории относят Т-токсин (или HmT), продуцируемый *Drechslera maydis* (*Helminthosporium maydis*), патогеном, вызывающим гельминтоспориоз кукурузы.

Третья категория включает патотоксины, которые хозяиноспецифичны и вызывают типичные признаки болезни. Например, викторин (HV-токсин) – токсин, продуцируемый возбудителем гельминтоспориоза овса, вызывающий корневую гниль и пятнистость листьев.

Правомерность схем клеточной селекции на устойчивость может непосредственно зависеть от механизмов действия токсинов. Отдельные виды патогенов поражают клетки, а затем выделяют токсины. Другие – сначала выделяют токсины, которые убивают клетки, затем используют продукты их распада для питания. Естественно, в первом случае не будет корреляции между устойчивостью *in vitro* и *in vivo*; проведение селекции на клеточном уровне целесообразно лишь во втором случае.

Возможность отбора *in vitro* растений, устойчивых к болезням, впервые продемонстрировал П. Карлсон (1973), который, проводя селекцию табака на устойчивость к метионинсульфоксиму (аналог табтоксина), получил клеточные линии, а затем растения с повышенной устойчивостью к патогену.

В отношении многих патогенов, для которых патотоксины в чистом виде не выделены или не изучены, для селекции на устойчивость используют культуральные фильтраты (КФ) патогена. Их использование в клеточной селекции объясняется, с одной стороны, желанием исследователя охватить весь спектр фитотоксичных метаболитов, действующих на растение в естественных условиях. Однако в этом случае нельзя установить роль отдельных токсинов в патогенезе, поскольку неизвестен сам селекционирующий агент. С другой стороны, в настоящее время нет доступных, хорошо растворимых в питательной среде для культивирования индивидуальных токсинов. Методы их выделения и очистки весьма трудоемки, связаны с многократным использованием органических растворителей, переосаждением и не исключают артефактов (И. Ф. Шаяхметов, 2001).

Необходимыми предпосылками применения КФ служат определение их роли в заболевании, изучение корреляции устойчивости к патогену у растений и культивируемых *in vitro* клеток.

В связи с этим клеточную и тканевую селекцию необходимо начинать с определения фитотоксической активности культурального фильтрата па-

тогена, так как он может оказывать отрицательное влияние на прорастание семян, развитие изолированных зародышей, рост каллусной и суспензионной культуры.

Цель работы. Ознакомиться с методами выделения мутантных клеток и соматональных линий с помощью селективных факторов *in vitro* (получение форм, устойчивых к заселению и фитопатогенам).

Материалы и оборудование:

- суспензионная культура картофеля;
- чистая культура фитопатогена;
- конические колбы на 100 мл с жидкой питательной средой Чапека (приложение 33);
- среда для роста каллусной ткани;
- 0; 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0%-ный NaCl (всего пять вариантов);
- бактериальный фильтр (фирмы «Millipore») с порами диаметром 0,45 мкм;
- цилиндр, инструменты;
- стерильные чашки Петри;
- фотоколориметр КФК-2;
- фильтровальная бумага;
- спиртовка, спирт, спички.

Таблица 1

Питательная среда Чапека для культивирования фитопатогенных грибов

№ п/п	Компоненты питательной среды	Концентрация, г/л
1.	NaNO ₃	2,0
2.	KH ₂ PO ₄	1,0
3.	MgSO ₄ 7H ₂ O	0,5
4.	KCl	0,5
5.	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01
6.	Сахароза	30
7.	Агар-агар	17

Порядок выполнения работы.

1. Высев суспензии клеток на селективные среды с добавлением NaCl.

1.1. Суспензию клеток наливают в стерильный цилиндр и дают отстояться 5 мин.

1.2. Отбирают 10 мл верхней фракции суспензии (она обогащена одноклеточными клетками) и смешивают в стерильном цилиндре с 10 мл среды

без NaCl (контроль), расплавленной и охлажденной до 40 °С (лаб. работа №8, табл.1).

1.3. Быстро разливают содержимое цилиндра в пять чашек Петри диаметром 6 см, дают среде застыть, затем чашки Петри закрывают крышками и обматывают парафином.

1.4. Эту же операцию проводят со средами, содержащими 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0%-ный NaCl. Плотность посева суспензии 10 000 клеток в 1 мл.

1.5. Через 4 недели в каждой чашке Петри подсчитывают колонии клеток размером более 1 мм.

1.6. Сравнивают количество колоний на селективных средах и в контрольном варианте, принимая при этом контроль за 100 %.

1.7. Эффективность посева, %, определяют при каждой концентрации NaCl по формуле:

$$\text{ЭВ} = \frac{\text{Количество образовавшихся колоний}}{\text{Количество посеянных клеток}} \cdot 100$$

1.8. Колонии клеток, образовавшиеся на среде, содержащей NaCl в концентрации 1,5 и 2,0%, пересаживают на среду для морфогенеза, в которую добавляют хлорид натрия.

1.9. Сформировавшиеся растения проверяют на устойчивость к 1,0%-ному NaCl и сравнивают их с исходными растениями (из которых был получен каллус для суспензии) или с растениями, регенерировавшими из клеточных колоний, полученными в контрольном варианте.

2. *Определение фитотоксичности культурального фильтрата патогенна.*

2.1. Фитопатоген выращивают в жидкой питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Чапека (табл.1), сахарозу (2 %), инозит (100 мг/л).

2.2. Культуральную жидкость получают, выращивая изоляты гриба в колбах на 100 мл, содержащих по 50 мл жидкой питательной среды на качалке при частоте вращения 100 мин⁻¹. Срок выращивания 25...30 дней.

2.3. В каждую колбу вносят по пять кусочков агара, размером 0,5 x 0,5 см, содержащих 10⁵ конидий гриба.

2.4. Через 25...30 дней содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр

2.5. Полученный раствор пропускают через бактериальный фильтр (фирмы «Millipore») с пораи диаметром 0,45 мкм.

2.6. Оптическую плотность культурального фильтрата определяют на фотоколориметре КФК-2.

2.7. Определение фитотоксичности культурального фильтрата патогена проводят на семенах, зрелых зародышах, пробирочных растениях или на каллусной ткани.

2.8. Изучаемые концентрации КФ следующие: 25, 50, 75 и 100 %. В качестве контроля используют дистиллированную воду. В каждом опыте используют 50 эксплантов.

2.9. Семена раскладывают на фильтровальную бумагу, смоченную КФ патогена в различных концентрациях.

2.10. Через 7 дней измеряют биометрические показатели проростков: длину надземной и подземной частей.

2.11 Токсичность КФ и самого патогена, %, рассчитывают по формуле:

$$\dot{O} = 100 - \left(\frac{l_{\#}}{l_e} \cdot 100 \right),$$

где l_{on} — сумма длин проростков, полученных на КФ или агаре; l_k — сумма длин проростков, полученных на воде (контроль).

ЛИТЕРАТУРА

1. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Прокофьев М.И. «Основы сельскохозяйственной биотехнологии» - М., ВО «Агропромиздат», 1990 г., 383 с.
2. «Сельскохозяйственная биотехнология» под редакцией акад. В.С. Шевелухи – М., «Высшая школа», 1998 г., 415 с.
3. «Сельскохозяйственная биотехнология» под редакцией акад. В.С. Шевелухи – М., «Высшая школа», 2003 г., 469 с.
4. Калашникова Е.А., Кочиева Е.З., Миронова О.Ю. «Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии» - М., «Колос», 2006 г., 142 с.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
Лабораторная работа № 1	5
Лабораторная работа № 2	11
Лабораторная работа № 3	16
Лабораторная работа № 4	19
Лабораторная работа № 5	21
Лабораторная работа № 6	27
Лабораторная работа № 7	29
Лабораторная работа № 8	36
Лабораторная работа № 9	42
Лабораторная работа № 10	55
Лабораторная работа № 11	58
Лабораторная работа № 12	60
Лабораторная работа № 13	64
Лабораторная работа № 14	66
Лабораторная работа № 15	73
ЛИТЕРАТУРА	82

ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАНЯТИЯ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методические рекомендации

Составитель: *Т.Н. Звездина*

Рецензенты: *С.И. Филипенко, Н.Н. Трескина*

ИЛ № 06150. Сер. АЮ от 21.02.02.

Подписано в печать 23.11.2011.

Формат 60х90/16. Уч.-изд. л. 5,25. Тираж 15 экз. Заказ № 218.

Изд-во Приднестр. ун-та. 3300, г. Тирасполь, ул. Мира, 18.