

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
К ЛАБОРАТОРНЫМ РАБОТАМ**

Основные цели и задачи выполнения лабораторных работ

Цели:

Знать способы стерилизации помещений, растительного материала, посуды, инструментов и питательных сред; состав питательных сред; методики выделения апикальных меристем растений, протопластов из мезофилла листа, получения суспензионных культур и их выращивание на питательных средах.

Уметь пользоваться методиками приготовления питательных сред; выделять апикальные меристемы растений; выращивать стерильные проростки семян гороха, сои; выделять протопласты из мезофилла листа.

Задачи:

Ознакомиться со способами стерилизации объектов биотехнологии растений, с методиками приготовления питательных сред.

Научиться культивировать стерильные проростки, апикальные меристемы растений картофеля, земляники, табака.

Научиться получать суспензии, выращивать из на твёрдых и жидких питательных средах, вести подсчёт плотности клеток.

Научиться выделять протопласты из мезофилла листа, культивировать их на стерильных питательных средах.

Теоретическое обоснование лабораторных работ

Одно из основных условий успешного культивирования изолированных органов, тканей, клеток и протопластов состоит в соблюдении строгой стерильности. Тщательная стерилизация необходима, так как на искусственных питательных средах, предназначенных для культивирования растительных тканей и клеток хорошо развиваются и микроорганизмы, что создает опасность для культивируемого материала. Стерилизуют бокс, инструменты, посуду, растительный материал, питательные среды, ватные пробки и все другие материалы, необходимые для работы.

Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы, витамины, углеводы, фитогормоны. В качестве источников ауксинов в питательных средах обычно используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д)- 1-10 мг/л, а также индолилуксусную кислоту (ИУК) – 1-30 мг/л, и -нафтилуксусную кислоту (НУК) – 0,1-2 мг/л. ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д.

Стерильные проростки выращивают с целью получения асептических растений и получения эксплантов *in vitro*. В зависимости от задачи опыта семена высевают на воду или агаризованную питательную среду.

Существуют три возможных пути использования стерильных проростков: 1) для получения эксплантов из дифференцированных тканей, которые при переносе на питательную среду, содержащую фитогормоны, дифференцируются и в результате интенсивной пролиферации образуют каллусную ткань; 2) для получения каллуса непосредственно на проростках; 3) для получения протопластов из частей проростка, обычно из листьев, иногда из корней.

Из апикальных меристем в питательной среде получают безвирусные растения картофеля, которые могут быть размножены и высажены в теплицы для получения безвирусных клубней. Для ускоренного размножения материала используются также клубни, полученные *in vitro*.

Размножение черенкованием основано на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем при удалении верхушки побега. Из пазушной почки развивается побег.

При культивировании апикальных меристем земляники на питательной среде с высоким содержанием кинетина (0,5-1 мг/л) под действием этого гормона происходит подавление апикального доминирования верхушечной меристемы и активация пазушных меристем.

Каллусы на искусственных питательных средах, включающих фитогормоны, легко образуются на эксплантах из самых различных органов: из асептически прорастающих семян, отрезков стеблей и корней, изолированных фрагментов паренхимы, тканей клубня, изолированной

сердцевины стебля, из листа, зародышей и др. Сущность метода выращивания изолированных тканей растений и получения каллуса заключается в том, что выделенный кусочек ткани (эксплант) стерилизуют и переносят на искусственную питательную среду, содержащие минеральные соли, органические вещества, фитогормоны. На такой питательной среде клетки начинают делиться.

Регенерацию *in vitro* рассмотрим на примере соматического эмбриогенеза у люцерны. Переход дедифференцированных каллусных клеток к вторичной дифференцировке и образование организованных структур в каллусной ткани зависят от соотношения гормонов в питательной среде. Преобладание цитокининов над ауксинами приводит к индукции стеблевого органогенеза или к соматическому эмбриогенезу. Преобладание ауксинов над цитокининами способствует образованию корней в каллусной ткани-корневному органогенезу.

Суспензия представляет собой одиночные клетки и агрегаты, которые растут в жидкой питательной среде определенного состава в стерильных условиях. Существуют разные способы культивирования суспензии: в колбах на качалках, ферментерах. Необходимое условие роста суспензии состоит в перемешивании или встряхивании среды, что обеспечивает аэрацию культур. Обычно суспензию получают из рыхлой каллусной ткани, помещая ее в жидкую питательную среду того же состава, что и для каллуса, но без агара. Растительные суспензии характеризуют по следующим показателям: количество жизнеспособных клеток, сегрегированность суспензии и плотность клеток в суспензионной культуре.

Одним из основных показателей, характеризующих суспензию, служит плотность клеточной популяции. Число клеток определяют после мацерации (разделения клеток) суспензии. Подсчет клеток ведется в счетной камере под микроскопом.

Для проведения клеточной селекции обычно применяют высев мелкоагрегированной суспензии в агаризованную среду. При этом одиночные клетки и мелкие агрегаты дают начало клеточным клонам. Конечная цель клеточной селекции-получение растений из клеточных клонов.

Клеточные оболочки у растений представлены главным образом целлюлозой, гемицеллюлозой и пектиновыми веществами. Поэтому для разрушения оболочки используют ферментные смеси на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ. Ферментные растворы лучше готовить непосредственно перед опытом. Для ферментации используют молодые листья, предварительно осажденную суспензионную культуру или каллусные ткани, растущие на агаре. Длительность ферментации зависит от типа ткани, состава ферментных растворов, температуры инкубации.

Растительные протопласты, высеянные на питательную среду, через три-четыре дня регенерируют клеточную оболочку и переходят к делению. К 12-14-му дню практически все клетки, начавшие делиться, превращаются в микроколонии. Состоящие из 20-40 клеток микроколонии переносят на среду для подраствивания, где они превращаются в хорошо пролиферирующие каллусные ткани. Из каллусов можно получить растения-регенеранты.

Культивирование небольших количеств клеток в микрообъеме питательной среды оказывается полезным при изучении их жизнедеятельности.

Протопласты и единичные клетки растений хорошо растут при определенной плотности посева. Если плотность менее 10^3 клеток на 1 мл среды, то происходит заметная диффузия в среду промежуточных продуктов их метаболизма, что часто приводит к гибели клеток. Обычно протопласты растений культивируют при плотности 10^4 - 10^5 на 1 мл, а индивидуальное культивирование протопластов проводят в микрокаплях объемом 10-100 нл.

Оборудование и техническое оснащение лабораторных работ

Семена, клубни, побеги и стебли растений, культура каллусной ткани

Стаканы химические, колбы с дистиллированной водой, чашки Петри, предметные стекла, скальпель, пинцет, иглы, пинцеты, стерильные скальпели, марлевые мешочки, стерилизаторы, пробирки, чашки с питательными средами, фильтры Зейца или «Миллипор» для холодной стерилизации, вата, 96%-ный спирт, 0,1%-ный раствор сулемы или диацид, стерильная вода.

Автоклав, сушильный шкаф.

Требования к порядку выполнения лабораторных работ

Лабораторная работа проводится строго в лаборатории, в белых халатах, с соблюдением

техники безопасности.

Лабораторная работа выполняется строго по порядку, определённому методикой ведения работы.

Требования к отчету по лабораторным работам

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, таблиц или в графическом виде (при необходимости зарисовывать результат).

Контрольные вопросы

1. Что такое стерильность?
2. Какими способами стерилизуют посуду, инструменты?
3. Какими способами стерилизуют растительные объекты?
4. Каков состав питательных сред?
5. Какие вещества используют в качестве ауксинов в питательных средах?
6. Что такое маточные растворы и как их готовят?
7. Какова цель выращивания стерильных проростков?
8. Каковы возможные пути использования стерильных проростков?
9. Какие среды используют для выращивания стерильных проростков?
10. Какие части растения используют для ускоренного размножения?
11. С какой целью из растений вычлениают апикальные меристемы?
12. Какими способами пользуются в работе во избежание подсыхания питательных сред?
13. Назовите наиболее распространённый способ размножения картофеля.
14. На чём основывается действие размножения черенкованием?
15. При каком условии в культуре *in vitro* у черенков картофеля можно индуцировать появление клубней?
16. Каким образом высокое содержание кинетина в среде влияет на процесс культивирования земляники?
17. Каким способом можно индуцировать корнеобразование при микроразмножении земляники?
18. В каких растворах и с какой целью промывают марлевые мешочки с почками?
19. Каким способом можно индуцировать корнеобразование при микроразмножении земляники?
20. Что происходит при культивировании апикальных меристем земляники на питательной среде, содержащей цитокинин?
21. При каких условиях проводят корнеобразование проростков при микроклональном размножении земляники?
22. В чём заключается сущность метода выращивания изолированных тканей растений и получения каллуса?
23. Что представляет собой каллус?
24. Из каких органов на искусственных питательных средах могут образоваться каллусы?
25. От чего зависят переход дедифференцированных каллусных клеток к вторичной дифференцировке и образование организованных структур в каллусной ткани?
26. Что происходит с каллусной тканью люцерны при пересадке ее на среду, содержащую 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП)?
27. Что нужно предпринять, если наблюдается нарушение нормального развития растений?
28. Что представляет собой суспензионная культура?
29. Какие вещества можно синтезировать в культуре клеток?
30. Каковы условия роста суспензии?
31. Что служит одним из основных показателей, характеризующих суспензию?
32. Каковы фазы ростового цикла суспензии?
33. Каким образом ведут подсчёт плотности суспензии?

34. Какие суспензии применяют для проведения клеточной селекции?
35. Какова конечная цель клеточной селекции?
36. В чём заключается метод Плейтинга?
37. Какие вещества используют для разрушения клеточной оболочки?
38. От чего зависит длительность ферментации?
39. Объясните технику выделения протопластов из мезофилла листа табака.
40. Когда растительные протопласты можно считать микроколонией?
41. Какова оптимальная плотность посева протопластов?
42. Какие питательные среды используют для культивирования протопластов?
43. В чём заключается индивидуальное культивирование клеток?
44. Какова выживаемость протопластов при культивировании в микрокаплях?
45. Как происходит рассаживание протопластов по каплям?

МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА, ПОСУДЫ, ИНСТРУМЕНТОВ И ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Цель работы. Стерилизация помещений, растительного материала, посуды, инструментов и питательных сред.

Теоретическое обоснование. Одно из основных условий успешного культивирования изолированных органов, тканей, клеток и протопластов состоит в соблюдении строгой стерильности. Тщательная стерилизация необходима, так как на искусственных питательных средах, предназначенных для культивирования растительных тканей и клеток хорошо развиваются и микроорганизмы, что создает опасность для культивируемого материала. В результате жизнедеятельности организмов изменяется состав питательных сред. Кроме того, изолированные от растения ткани, клетки и особенно протопласты легко повреждаются микроорганизмами. Поэтому все опыты с культурой изолированных органов, тканей, клеток и протопластов растений проводят в ламинар-боксах. Стерилизуют бокс, инструменты, посуду, растительный материал, питательные среды, ватные пробки и все другие материалы, необходимые для работы.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Семена, клубни, побеги и стебли растений.

Стаканы химические на 500-700 мл, колба с дистиллированной водой на 1 л, чашки Петри, предметные стекла, скальпель, пинцет, игла, марлевые мешочки, стерилизаторы, пробирки, чашки с питательными средами, фильтры Зейца или «Миллипор» для холодной стерилизации.

Автоклав, сушильный шкаф.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы

Ламинар-бокс. Протирают внутреннюю рабочую поверхность ламинара 70%-ным спиртом. Затем размещают в ламинаре спиртовую горелку, спички, стакан с 96%-ным спиртом, стерильную посуду и инструменты, колбу со стерильной водой. При проведении работ по вычленению меристем в ламинар ставят бинокулярную лупу. Ламинар-бокс облучают бактрицидными ультрафиолетовыми лампами в течение 10-12 ч.

Посуда. Стерилизация проводится в сушильном шкафу или в автоклаве. Перед стерилизацией посуду надо вымыть и высушить. Для мытья посуды используют детергенты, а также раствор двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпик). Перед стерилизацией пробирки, колбы предварительно закрывают ватными пробками, заворачивают в оберточную бумагу. Затем посуду помещают в сушильный шкаф и нагревают при температуре +175°C в течение 2 ч (после того как установится нужная температура). При таком нагревании погибают не только бактерии, но и их споры. Температуру в сушильном шкафу выше 175°C допускать не следует, так как при этом ватные пробки буреют, а бумага, которой закрывают ватную пробку сверху, становится ломкой.

Еще более строгой стерилизации можно добиться под давлением в автоклаве, так как влажный жар эффективнее убивает микроорганизмы и их споры, чем сухой. Автоклавированию подвергают стаканы с крышками, чашки Петри, пипетки, колбы с дистиллированной водой. Посуду заворачивают в фольгу или оберточную бумагу и автоклавируют при 2 атм. В течение 25-30 минут. Верхнюю часть градуированных пипеток закрывают ватной прокладкой, пипетки заворачивают в бумагу по 10 штук.

Инструменты. Предварительную стерилизацию инструментов скальпелей, пинцетов, игл и т.д. проводят нагреванием сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 12 ч при 140°C. Кипячением удобно стерилизовать шприцы. Металлические предметы нельзя стерилизовать автоклавированием, так как под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в процессе посадки инструменты стерилизуют дополнительно, помещая в фарфоровый стакан с 96%-ным этиловым спиртом и обжигая в пламени спиртовки. Обжигать можно ланцеты, пинцеты, микробиологические петли. После стерилизации обжиганием каждый инструмент помещают между листами предварительно простерилизованной плотной бумаги, сложенными в пачку или в специальный штатив. **Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции.** Затем его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь. Очень тонкие инструменты (иглы, кусочки лезвий) могут терять свои свойства при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт.

Материалы. Вату, марлю, ватные пробки, фильтровальную бумагу, халаты, косынки, которые

могут использоваться при посадке тканей, стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм. В течение 25-30 мин.

Растительный материал. Для стерилизации семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют различные стерилизующие растворы: водные растворы сулемы, или двуххлористой ртути (0,1%), брома (1%), пергидроля (20-30%), хлорамина (3-6%), диацида, гипохлорита натрия (10%).

Диацид готовят следующим образом: растворяют отдельно 330 мг этанолртутихлорида и 660 мг цетилпиридинилхлорида в горячей воде (около 300 мл), смешивают полученные растворы, доводят объем жидкости дистиллированной водой до 1 л и добавляют несколько капель детергента Твин-80. Диацид хранят в холодильнике в плотно закрытой колбе в темноте.

Прежде чем приступить к стерилизации растительной ткани, ее предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, снимают кожуру (у корней и клубнеплодов), кору (у побегов), промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд в абсолютный спирт. При этом кроме действия спирта отмечается усиление эффекта основного стерилизующего раствора. После стерилизации растительные объекты следует тщательно отмыть от стерилизующих веществ, многократно последовательно ополаскивая дистиллированной водой.

Диацид рекомендуется использовать при стерилизации семян кукурузы, пшеницы, ржи; пергидроль для фасоли, люпина, подсолнечника (с очищенной кожурой), томатов, редиса и др. Время стерилизации семян диацидом 15-20 мин, пергидролем 10 мин. Некоторые семена (хлопчатник, горох) хорошо стерилизуются концентрированной серной кислотой в течение 3 мин, с последующей пятикратной промывкой автоклавированной дистиллированной водой. Время стерилизации меристем и кусочков тканей из разных частей растения примерно вдвое меньше. Обычно используют диацид, который затем отмывают водой, воду меняют 5-6 раз.

Иногда семена некоторых растений: помидор, яблони, тыквы, бобов и табака, не обрабатывают антисептиком. Ко времени созревания семена оказываются заключенными в мясистые, деревянистые или костянквидные покровы. Здоровые с неповрежденной поверхностью плоды этих культур тщательно промывают мыльной водой, затем несколько раз спиртом. После этого в строго асептических условиях их разламывают. Стерильным инструментом из разлома выбирают семена и помещают их в стерильную посуду.

Питательные среды. Колбы и пробирки с питательными средами закрывают ватными пробками, заворачивают горлышко в целлофан или оберточную бумагу и автоклавируют при температуре 120°C и давлении 1 атм. В течение 20 мин.

Холодная стерилизация. Органические жидкости, которые не выносят нагревания, освобождают от бактерий при пропускании через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

Требования к отчету по лабораторной работе.

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы

1. Что такое стерильность?
2. Какими способами стерилизуют посуду, инструменты?
3. Какими способами стерилизуют растительные объекты?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
3. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.

4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
5. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Лабораторная работа № 2 **ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД**

Цель работы. Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей на примере среды Мурасиге-Скуга

Теоретическое обоснование. Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы, витамины, углеводы, фитогормоны. Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина, определенные аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, повышающие доступность железа для клеток в широких пределах рН.

Углеводы выступают необходимым компонентом питательных сред при культивировании изолированных клеток и тканей, так как они не способны к автотрофному питанию. Обычно в качестве источника углеводов используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 20-40 г/л. Опухолевые ткани, в которых много активных гидролитических ферментов, могут расти на средах с растворенным крахмалом.

Регуляторы роста необходимы для дифференцировки клеток и для индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны входить ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление дедифференцированных клеток. В случае индукции стеблевого морфогенеза можно снизить содержание ауксинов в среде или исключить их из питательной среды. На средах без гормонов растут опухолевые и «привыкшие» к таким условиям ткани. Автономность по отношению к гормонам того и другого типа или к одному из них связана со способностью клеток синтезировать гормоны.

В качестве источников ауксинов в питательных средах обычно используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) - 1-10 мг/л, а также индолилуксусную кислоту (ИУК) – 1-30 мг/л, и -нафтилуксусную кислоту (НУК) – 0,1-2 мг/л. ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д. Для индукции образования каллуса обычно применяют высокие концентрации ауксинов, а при последующих пересадках ткань может расти, если содержание ауксинов в среде уменьшено в несколько раз.

В качестве источника цитокининов в искусственных питательных смесях используют кинетин, 6-бензиламинопури́н (6-БАП), зеатин (0,001-10 мг/л). Зеатин и БАП более активны в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза, чем кинетин. В состав некоторых питательных смесей входит аденин.

Отдельные питательные среды включают кроме ауксинов и цитокининов гибберелловую кислоту (ГК). Иногда к питательной среде добавляют растительные экстракты или соки. 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 содержат бактериальный агар «Difco» и бактериальный агар отечественного производства, их можно применять без предварительной промывки. Обычно для получения твердой питательной смеси к среде добавляют 5-8% агара.

Растворы макросолей, микросолей и витаминов удобно готовить концентрированными. Маточные растворы хранят в холодильнике, витамины при отрицательной температуре. В 10-20 раз более концентрированными, чем нужно, готовят растворы макросолей, в 100-1000 раз более концентрированными-растворы микросолей, в 1000 раз-растворы витаминов.

Для культивирования клеток, тканей и органов тех или иных растений используют питательные среды различного состава. Наиболее широко применяются среда Мурасиге-Скуга (табл.1, 2), среда Уайта (табл.2.3), среда Гамборга, или В-5 (табл.2.4).

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Химреактивы (табл.1).

Колбы или стаканы химические на 1л, банки с притертыми пробками для хранения маточных растворов на 1л и 100мл, баночки на 20-50мл, мерные пипетки на 10 и 1мл, весы технические, весы торзионные, электроплитка.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Приготовить питательную среду Мурасиге и Скуга (табл.1, 2) для культивирования растительных органов и тканей.

Прежде всего необходимо приготовить маточные растворы макро-, микросолей и витаминов. Для среды Мурасиге и Скуга обычно готовят маточные растворы следующего состава: 1) NH_4NO_3 , KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ вливают последним без нагревания, что предотвращает выпадение осадка); 2) раствор CaCl_2 ; 3) раствор хелата железа (раствор FeSO_4 и ЭДТА- Na_2 , необходимый для образования хелата железа, следует нагреть до кипения); 4) раствор микроэлементов.

Количество солей, необходимое для приготовления маточных растворов, а также количество маточного раствора, которое надо взять для приготовления питательной среды, приведены в табл. 2.2.

Полученные растворы сливают в склянки с притертой пробкой, снабжают этикеткой и хранят в холодильнике. Хелат железа хранят в темной склянке.

Концентрированные растворы витаминов (каждого в отдельности) хранят во флакончиках. Для приготовления растворов берут десятикратную по отношению к добавляемой дозе навеску витамина и растворяют в 10 мл воды. В 1 мл этого раствора содержится порция витамина, необходимая для приготовления 1 л раствора по прописи Мурасиге-Скуга.

Теперь, используя маточные растворы, надо приготовить питательные среды для культивирования органов и тканей растений. В химический стакан или колбу емкостью 1л помещают навеску сахарозы 30 г, доливают до половины дистиллированную воду, нагревают, после растворения сахарозы добавляют необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей (см. табл. 2.2.), витаминов и доводят объем до 1л дистиллированной водой.

Растворы фитогормонов готовят следующим образом.

Ауксины (2,4-Д, -НУК, ИУК, индолил-масляная кислота – ИМК): 100 мг вещества растворяют в 0,5-2 мл спирта, подогревают, добавляют дистиллированную воду до 100 мл (концентрация 1 мг/мл).

Цитокинины (кинетин, зеатин, БАП): растворяют в небольшом объеме 0,5 н. HCl , подогревают, добавляют соответствующий объем дистиллированной воды.

Абсцизовая кислота (АБК): навеску растворяют в 70%-ном этаноле, доводя до нужного объема.

Гиббереллиновая кислота (ГК): навеску растворяют в воде.

При введении фитогормонов в среду перед автоклавированием следует обязательно довести рН среды до 5,5-5,6. Однако следует учитывать, что после автоклавирования изменяется первоначальный состав термолабильных компонентов среды. Так, тиамин распадается на пиримидин и тиазол, а кинетин и ИУК теряют часть своей активности. В связи с этим витамины и особенно термолабильные фитогормоны стерилизуют фильтрованием, пропуская через фильтр Зейца или «Миллипор» с диаметром пор 0,4 мкм (НУК, ИУК, зеатин, БАП). В этом случае для регуляции рН среды используют стерильные растворы щелочи.

Агар-агар предварительно замачивают в воде для набухания. Затем его нагревают на электроплитке при помешивании до полного растворения. После этого раствор агара надо слить с раствором солей, витаминов и сахарозы и довести объем среды до 1л. Колбы со средой закрывают ватной пробкой, бумагой или фольгой и стерилизуют в автоклаве.

Питательные среды разливают в пробирки (1/3 объема), которые закрывают ватными пробками или фольгой, стерилизуют в автоклаве.

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Каков состав питательных сред для изолированных клеток и тканей?
2. Какие вещества используют в качестве ауксинов в питательных средах?
3. Что такое маточные растворы и как их готовят?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
6. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.
7. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
8. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Приложение.

Таблица 1. Среда Мурасиге и Скуга, рН 5,6-5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
NH_4NO_3	1650	$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
KNO_3	1900	$\text{Na}_2\text{-ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	Тиамин - HCl	0,1
$\text{MgSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	370	Пиридоксин - HCl	0,5
KH_2PO_4	170	Никотиновая кислота	0,5
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	Мезо-инозит	100
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	Глицерин	2,0
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	ИУК	2,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	Кинетин	0,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	Сахароза	30.000
KI	0,83		

Таблица 2. Состав маточных растворов по Мурасиге и Скугу

Компоненты питательной среды

Примечание

Макросоли, г/л маточного раствора

KNO_3 38

CaCl_2 (безводный) 8,8

NH_4NO_3 33

или $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 13,8

MgSO_4 (безводный) 3,6

или $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7,4

KH_2PO_4 3,4

На 1 л среды брать по 50мл маточного раствора

Микросоли, мг/100 мл маточного раствора

H_3PO_4 620

$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2230

ZnSO_4 860

KI 83

Na ₂ MoCl ₄ · 2H ₂ O	25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,5
На 1 л среды брать по 1 мл маточного раствора	
Fe-хелат, мг/100 мл маточного раствора	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	557
ЭДТА-Na ₂ (трилон Б)	745
На 1 л среды брать по 5 мл маточного раствора	

Лабораторная работа №3 **ВЫРАЩИВАНИЕ СТЕРИЛЬНЫХ ПРОРОСТКОВ**

Цель работы. Выращивание стерильных проростков гороха, сои с целью получения асептических растений и получения эксплантов *in vitro*

Теоретическое обоснование. Стерильные проростки выращивают с целью получения асептических растений и получения эксплантов *in vitro*. В зависимости от задачи опыта семена высевают на воду или агаризованную питательную среду.

Существуют три возможных пути использования стерильных проростков: 1) для получения эксплантов из дифференцированных тканей, которые при переносе на питательную среду, содержащую фитогормоны, дифференцируются и в результате интенсивной пролиферации образуют каллусную ткань; 2) для получения каллуса непосредственно на проростках; 3) для получения протопластов из частей проростка, обычно из листьев, иногда из корней.

Для образования каллуса на проростках необходимы фитогормоны, поэтому в состав питательной среды для выращивания входит 2,4-Д.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Семена (горох, соя). Диацид, 96%-ный спирт, стерильные химические стаканы, стерильная вода.

Стерильные чашки Петри, пробирки, пинцет, стерильные марлевые мешочки.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Отобрать здоровые ровные семена гороха или сои, тщательно промыть их в мыльном растворе, затем водопроводной и дистиллированной водой. Промытые семена в марлевых мешочках погрузить на 2-5 мин в 96%-ный спирт, промыть в стерильной воде и поместить в раствор диацида на 20 мин. Затем пятикратно ополоснуть семена в стерильной воде.

Работу проводят в ламинар-боксе. С помощью стерильного пинцета разложить по 5-10 семян в стерильные чашки Петри или пробирки с питательной средой. Чашки Петри с семенами помещают в термокомнату при температуре +25°C. Асептические проростки можно использовать для получения эксплантов через 8-15 дней.

Для проращивания семян можно использовать среды Уайта (табл.1), Мурасиге и Скуга (МС) (лаб.раб 2) или Гамборга (В-5) (табл. 2), но без добавок фитогормонов.

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками

Контрольные вопросы.

1. С какой целью выращивают стерильные проростки?
2. Каковы возможные пути использования стерильных проростков?
3. Какие среды используют для выращивания стерильных проростков?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток

растений. Алматы, КазГУ, 1983.

9. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжиэ, 1996.

10. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.

11. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Приложение.

Таблица 1. Среда Уайта, pH 5,6-5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
Ca(NO ₃) ₂	200	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,02
MgSO ₄	360	ZnSO ₄	1,5
Na ₂ SO ₄	200	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0025
KNO ₃ 80	KI	0,75	
KCl	65	Пиридоксин-НCl	0,1
NaH ₂ PO ₄	16,5	Тиамин-НCl	0,1
H ₃ BO ₃	1,5	Никотиновая кислота	0,5
MnSO ₄	4,5	Глицин	3,0
Fe(SO ₄) ₃	2,5	Сахароза	20.000

Таблица 2. Среда Гамборга (В-5), pH 5,8

ЭДТА- Na ₂ ·2H ₂ O 37,3 Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
KNO ₃ 150 NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	2500	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	KI	0,75
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	FeSO ₄ ·7H ₂ O	28,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150	Тиамин- НCl	10,0
H ₃ BO ₃	3,0	Пиридоксин- НCl	1,0
MnSO ₄ ·7H ₂ O	10,60	Никотиновая кислота	1,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	Мезо - инозит 100	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	2,4-Д	2,0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,0	Сахароза	20.000

**Лабораторная работа № 4
ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ КАРТОФЕЛЯ**

Цель работы. Выделение апикальных меристем картофеля, их культивирование с целью получения безвирусных растений картофеля.

Теоретическое обоснование. Из апикальных меристем в питательной среде получают безвирусные растения картофеля, которые могут быть размножены и высажены в теплицы для получения безвирусных клубней. Для ускоренного размножения материала используются также клубни, полученные *in vitro*.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Клубни картофеля.

Пробирки со стерильной питательной средой (табл.1).

Биокулярная лупа, скальпели, препаровальные иглы, лезвия, зажатые в держателе.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Клубни картофеля хранят в течение недели при температуре 4-8°C, затем проращивают в темноте при температуре 20-22°C. Работы по вычленению меристем проводят в ламинар-боксе. Инструменты, используемые для вычленения (пинцеты, скальпели, иглы), стерилизуют перед каждым вычленением, погружая в спирт с последующим обжиганием. От тщательно вымытых клубней отделяют отростки и стерилизуют в 0,1%-ном растворе диацета в течение 3-5 минут, с последующей трехкратной промывкой стерильной H₂O. Простерилизованные ростки помещают в стерильную чашку Петри и добавляют несколько капель автоклавированной воды для предупреждения их подсыхания. Перед вычленением с верхушки ростка удаляют покровные листочки, последовательно обнажают боковые и верхушечные меристемы с примордиальными листочками. Эту операцию проводят с помощью препаровальной иглы под бинокулярной лупой. Меристему размерами 100-250 мкм без листовых зачатков (примордиев) вычленяют обычной тонкой иглой, зажатой в держатель. Вычленять можно как верхушечную, так и боковые меристемы. Меристему на острие иглы переносят на поверхность питательной среды в пробирку, закрывают ее пробкой над пламенем горелки и ставят в штатив. После заполнения штатив с пробирками закрывают целлофановым колпаком для предупреждения подсыхания сред и ставят в световую камеру. Через две, три, четыре недели наблюдают за развитием из меристемы побега и зарисовывают этапы этого процесса.

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Какие части растения используют для ускоренного размножения?
2. С какой целью из растений вычленяют апикальные меристемы?
3. Какими способами пользуются в работе во избежание подсыхания питательных сред?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
12. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.
13. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
14. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Приложение.

Таблица 1. Модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга для культивирования апикальных меристем картофеля, рН 5,7-5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
Минеральные элементы	По Мурасиге-Скугу	Гиббереллиновая кислота	1-10
Сахароза	20000	Никотиновая кислота	2
Глюкоза	20000	Фолиевая кислота	0,5
Гидролизат казеина	1000	Кинетин	0,5
Мезо-инозит	100	Пантеонат Са	10
Тиамин	1	Рибофлавин	0,5

Пиридоксин	1	Биотин	1
Аденин	40	Активированный уголь	10000
Витамин В ₁₂	0,015	Агар-агар	7000

Лабораторная работа № 5 МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ КАРТОФЕЛЯ ЧЕРЕНКОВАНИЕМ ПОБЕГОВ

Цель работы. Черенкование растений в пробирочной культуре с целью получения безвирусных побегов картофеля.

Теоретическое обоснование. Полученные из апикальных меристем на искусственной питательной среде безвирусные растения картофеля размножают. Один из наиболее распространенных способов размножения картофеля состоит в черенковании растений в пробирочной культуре. Растения вынимают из пробирок и разрезают так, чтобы в каждой части находился отрезок стебля с листом и пазушной почкой. Черенки пересаживают в пробирки с питательной средой.

Размножение черенкованием основано на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем при удалении верхушки побега. Из пазушной почки развивается побег.

Каждое следующее черенкование проводят через 16-20 дней. Из одного растения получают до восьми черенков. За два-три месяца от одного растения черенкованием можно получить три-пять тысяч растений. В культуре *in vitro* у черенков картофеля можно индуцировать появление клубней, доведя концентрацию сахарозы в среде до 30 мг/л.

Следующий этап размножения оздоровленного посадочного материала проводят в теплице. Растения из пробирок вместе с агаровой питательной средой переносят в горшки с почвой. На третий-седьмой день растения подкармливают раствором Кнопа. Через 10-15 дней растения пересаживают на постоянное место в теплицах для получения клубней.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Стерильные скальпели, пинцеты, чашки Петри. Асептические растения картофеля, пробирки с модифицированной стерильной питательной средой Мурасиге-Скуга (табл.1).

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Асептическое растение картофеля вынимают в ламинар-боксе из пробирки, помещают в чашку Петри, разрезают на части, содержащие отрезок стебля с листом и пазушной почкой. Часть стебля над листом должна быть в два-три раза короче, чем часть ниже листа. В процессе работы необходимо соблюдать строгую стерильность. Черенки высадить в пробирки на модифицированную питательную среду Мурасиге-Скуга. Пробирку с черенком ставят в световую камеру. Наблюдают за развитием побега через 7 и 14 дней.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Назовите наиболее распространённый способ размножения картофеля.
2. На чём основывается действие размножения черенкованием?
3. При каком условии в культуре *in vitro* у черенков картофеля можно индуцировать появление клубней?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
15. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.

16. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.

17. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Приложение.

Таблица 1. Модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга для микроразмножения картофеля черенкованием побегов, рН 5,8

Компоненты	Содержание, мг/л
Минеральные элементы	По Мурасиге-Скугу
Гибберелловая кислота	2,0
Кинетин	0,5
Аденин	40,0
Никотиновая кислота	2,0
Пиридоксин	1,0
Тиамин	1,0
Пантеонат кальция	10,0
Активированный уголь	10000
Сахароза	30000
Агар	7000

Лабораторная работа № 6 ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ АПИКАЛЬНЫХ МЕРИСТЕМ ЗЕМЛЯНИКИ. МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ ЗЕМЛЯНИКИ.

Цель работы. Выделение апикальных меристем земляники, их культивирование на модифицированной питательной среде Мурасиге-Скуга с целью получения стерильных почек.

Теоретическое обоснование. При культивировании апикальных меристем земляники на питательной среде с высоким содержанием кинетина (0,5-1 мг/л) под действием этого гормона происходит подавление апикального доминирования верхушечной меристемы и активация пазушных меристем. В результате примерно через две недели после помещения изолированной верхушки, состоящей из меристематического купола и одного-двух листовых примордиев, на питательную среду, основания разворачивающихся листьев начинают зеленеть, увеличиваются в объеме, и вскоре из пазух показываются пучки листьев. В пазухе новых листьев опять закладываются почки, прорастающие через некоторое время. Через один-два месяца экспланты превращаются в конгломерат множества разновозрастных и разновеликих почек с развернутыми листьями. Образовавшиеся почки легко отделяются одна от другой. После пересадки на свежую питательную среду каждая из них формирует новые пазушные почки, увеличивая тем самым число точек роста, но не образует корней. Для корнеобразования почки должны быть пересажены на среду, содержащую ауксин.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Столоны земляники. Пробирки со стерильной питательной средой (табл.1), 96%-ный спирт, 0,1%-ный водный раствор сулемы или диацида, в колбе на 1 л стерильная вода.

Стерильные чашки Петри, стерильные скальпели, стерильные иглы, бинокулярная лупа, стерильные предметные стекла, спиртовая горелка, спички, марлевые мешочки, стерильные химические стаканы.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Столоны земляники промывают в мыльной воде и ополаскивают чистой водой. Выделяют скальпелем пазушные почки, находящиеся у основания листьев столонов земляники. Эту операцию делают вне ламинар-бокса. Всю дальнейшую работу необходимо проводить в ламинар-боксе. Почки собирают в марлевый мешочек и погружают для стерилизации в раствор диацида на 10 мин. Вынимают

мешочек за нитку из раствора диацита и пять раз промывают в стерильной дистиллированной воде. Необязательно иметь для этого пять-шесть стаканов со стерильной водой, так как они занимают много места в ламинаре. Достаточно двух стаканов, на $\frac{1}{4}$ объема наполненных стерильной водой. Последовательно погружают в стаканы мешочки с почками, прополаскивают в воде в течение нескольких минут. Затем воду из второго стакана сливают в первый, а во второй наливают стерильную воду из колбы и прополаскивают в ней мешочек с почками. Так же поступают и в дальнейшем. Стерильные почки переносят из мешочка в чашку Петри и используют для вычленения меристем. Эту операцию проводят под бинокулярной лупой при десятикратном увеличении. На предметном стекле почку с помощью препаровальной иглы и скальпеля освобождают от многочисленных листовых чешуек; затем, придерживая почку иглой, скальпелем вычленяют меристематический купол с одним-двумя листовыми примордиями.

Вычлененную в ламинар-боксе меристему переносят на скальпеле в пробирку с питательной средой (табл.1). Пробирки закрывают целлофаном и помещают в световую климатическую камеру при температуре +25°C. Через четыре недели отмечают число образовавшихся почек и используют их для выполнения следующей работы.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

- 1.Каким образом высокое содержание кинетина в среде влияет на процесс культивирования земляники?
- 2.Каким способом можно индуцировать корнеобразование при микроразмножении земляники?
- 3.В каких растворах и с какой целью промывают марлевые мешочки с почками?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж.и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
18. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжиэ, 1996.
19. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
20. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Приложение.

Таблица 1. Модифицированная питательная среда Мурасиге и Скуга для культивирования апикальных меристем земляники, рН 5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
Минеральные элементы	По Мурасиге-Скугу	Никотиновая кислота	0,5
Хелат железа	5,0	6-БАП	0,5
Аскорбиновая кислота	1,0	Глюкоза	20.000
Тиамин	0,5	Агар-агар	7000
		Пиридоксин	0,5

**Лабораторная работа №7
ИНДУКЦИЯ КОРНЕОБРАЗОВАНИЯ
ПРИ МИКРОКЛОНАЛЬНОМ РАЗМНОЖЕНИИ
НА ПРИМЕРЕ ЗЕМЛЯНИКИ.**

Цель работы. Укоренение почек земляники, полученных при микрклональном размножении, на питательной среде, содержащей ауксины.

Теоретическое обоснование. При культивировании апикальных меристем земляники на питательной среде, содержащей цитокинин (6-БАП), в результате активации пазушных меристем из одной верхушечной меристемы образуется много стеблевых почек, точки роста вытягиваются, разворачиваются новые листья. Однако укоренения образовавшихся почек на этой среде не происходит. Для укоренения образовавшихся при микрклональном размножении земляники почек их необходимо пересадить на новую питательную среду, содержащую ауксины.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Пробирки с конгломератами почек земляники на питательной среде, пробирки со стерильной питательной средой (табл.1). Стерильный пинцет, стерильный скальпель, стерильная чашка Петри, спиртовая горелка, 96%-ный спирт, спички, стакан со стерильной водой.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Используют культуру апикальных меристем земляники в возрасте трех-четырех недель после начала культивирования. В стерильных условиях из пробирки конгломерат почек земляники. Освобождают основание конгломерата от остатков агаризованной питательной среды, промывают его в стерильной воде и переносят в стерильную чашку Петри. Разъединяют с помощью скальпеля конгломерат на отдельные почки и каждую из них переносят пинцетом в пробирки с питательной средой для укоренения (табл. 2). Обжигают горлышко пробирки и пробку, закрывают пробкой, оборачивают целлофаном и помещают пробирки в световую камеру с освещенностью 10 000 люкс, температурой +26°C и влажностью 60%.

Через месяц после пересадки почек на среду для корнеобразования проростки можно переводить в нестерильные условия. Обычно растения пересаживают в ящики или горшки, наполненные смесью торфа и песка (3:1), первое время накрывают колпаком из полиэтилена.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы

1. Каким способом можно индуцировать корнеобразование при микроразмножении земляники?
2. Что происходит при культивировании апикальных меристем земляники на питательной среде, содержащей цитокинин?
3. При каких условиях проводят корнеобразование проростков при микрклональном размножении земляники?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
21. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.
22. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
23. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Приложение.

Таблица 1. Питательная среда для корнеобразования при микрклональном размножении земляники, рН 5,6-5,8

Компоненты	Содержание, мг/л	Компоненты	Содержание, мг/л
Макросоли	По Уайту	Никотиновая кислота	0,5

Микросоли	По Хеллеру	ИУК	0,5
Цитрат железа	3,5	Сахароза	20000
Аскорбиновая кислота	1,0	Агар-агар	7000
Тиамин	0,5	Пиридоксин	0,5

**Таблица 2. Среда для укоренения
растений картофеля, рН 5,8**

Компоненты	Содержание, мг/л
Минеральные элементы	По Мурасиге-Скугу
Тиамин 1,0	
Пиридоксин	0,5
Сахароза	5000
ИМК	0,1
Агар	7000

Лабораторная работа №8 КАЛЛУСНАЯ КУЛЬТУРА

Цель работы. Получение каллусной ткани из сердцевины стебля взрослого растения табака в условиях *in vitro*.

Теоретическое обоснование. Сущность метода выращивания изолированных тканей растений и получения каллуса заключается в том, что выделенный кусочек ткани (эксплант) стерилизуют и переносят на искусственную питательную среду, содержащую минеральные соли, органические вещества, фитогормоны. На такой питательной среде клетки начинают делиться. Различно дифференцированные клетки претерпевают *in vitro* дедифференциацию и переходят к делению, образуя первичный каллус. Возникший на эксплантах каллус через четыре-шесть недель переносят на свежую питательную среду (субкультивируют). Техника культивирования тканей позволяет получить длительную, пересадочную каллусную культуру из любых живых тканевых клеток интактного растения. Каллус-это неорганизованная масса ткани, состоящая из дедифференцированных клеток. Образование и рост каллуса контролируются фитогормонами группы ауксинов и цитокининов.

Каллусы на искусственных питательных средах, включающих фитогормоны, легко образуются на эксплантах из самых различных органов: из асептически прорастающих семян, отрезков стеблей и корней, изолированных фрагментов паренхимы, тканей клубня, изолированной сердцевины стебля, из листа, зародышей и др.

В качестве примера рассмотрим метод получения каллусной ткани из сердцевины стебля взрослого растения табака.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Взрослые растения табака. Химический стакан с дистиллированной водой, конические колбы на 100 мл со стерильной питательной средой Мурасиге и Скуга. Вата, 96%-ный спирт, 0,1%-ный раствор сулемы или диацид, стаканы со стерильной водой, стерильные марлевые мешочки, стерильный пробкобур, стерильный скальпель, стерильная чашка Петри.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Из стеблей табака в фазе бутонизации или цветения вырезают участки с хорошо развитой, но еще не одревесневевшей сердцевинной (второе-третье междоузлие). Выбранные участки стебля разрезают на части длиной 5 см и моют в мыльном растворе щеткой, затем отмывают от мыла водопроводной водой и ополаскивают дистиллированной водой. Чистые участки стебля помещают в стакан с дистиллированной водой и переносят в ламинар.

Для стерилизации протирают стебли табака 96%-ным спиртом, и погружают в марлевых мешочках в 0,1%-ный водный раствор сулемы на 10-15 мин или в раствор диацида (1:1000) на 25 мин. После стерилизации стебли промывают в пяти порциях дистиллированной воды, оставляя в каждой на 5 мин. Затем из центральной части стебля вырезают стерильным сверлом для пробок (диаметр 5 мм) столбик сердцевинной ткани и помещают в стерильную чашку Петри. Стерильным

скальпелем удаляют участки ткани вблизи прежних срезов (концевые участки). Вырезанная сердцевина не должна содержать элементов флоэмы и камбия. Полученные цилиндрики сердцевины разрезают скальпелем в чашке Петри на кусочки длиной 2-3 мм и помещают на поверхность агаровой среды. Посуду с эксплантами табака помещают в термостат (в темноту) при температуре +25°C для культивирования. Через три недели анализируют результаты по образованию каллуса. Таким же образом получают каллус из корнеплодов картофеля и моркови.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. В чём заключается сущность метода выращивания изолированных тканей растений и получения каллуса?
2. Что представляет собой каллус?
3. Из каких органов на искусственных питательных средах могут образоваться каллусы?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
24. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.
25. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
26. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Лабораторная работа №9 СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ В КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ

Цель работы. Регенерация растения люцерны *in vitro* на примере соматического эмбриогенеза на стерильной питательной среде Гамборга (В-5).

Теоретическое обоснование. Регенерацию *in vitro* рассмотрим на примере соматического эмбриогенеза у люцерны. Переход дедифференцированных каллусных клеток к вторичной дифференцировке и образование организованных структур в каллусной ткани зависят от соотношения гормонов в питательной среде. Преобладание цитокининов над ауксинами приводит к индукции стеблевого органогенеза или к соматическому эмбриогенезу. Преобладание ауксинов над цитокининами способствует образованию корней в каллусной ткани-корневному органогенезу.

В каллусной ткани люцерны при пересадке ее на среду, содержащую 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), индуцируется образование почек и эмбриоидов. Через две-три недели от начала действия индуктора морфогенеза на каллусах развиваются зеленые почки и эмбриоиды длиной 0,5-2,0 мм. Их образованию предшествует возникновение на светлой поверхности каллусов зеленых точек, которые появляются через несколько дней после пересадки. Эмбриоиды в основном образуются у тетраплоидных сортов и у гибридов люцерны, почки чаще формируются у диплоидных форм. Иногда почки и эмбриоиды могут развиваться одновременно на одном каллусе.

Для получения растений-регенерантов возникшие почки и эмбриоиды помещают на среду без гормонов, где через две-три недели формируются растения. Иногда наблюдается нарушение нормального развития растений (образование каллуса, преимущественное развитие корня и побега, утолщение различных органов). В этом случае материал следует пересадить на среду без гормонов, с уменьшенной вдвое концентрацией всех компонентов. Срок, необходимый для прохождения всех стадий регенерации растений из тканевых культур (от листового экспланта до регенеранта), составляет около двух месяцев.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Культура каллусной ткани, полученной из листа люцерны. Колбы на 50 мл со стерильной питательной средой В-5 (табл.2.4). Стерильная чашка Петри, стерильные скальпели.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Соблюдая стерильность, каллус переносят в чашку Петри, разделяют на кусочки размерами 5x5 мм и помещают на новую питательную среду В-5 с добавкой 6-БАП (0,2 мг/л). Эта среда стимулирует развитие в каллусной ткани клеток меристематического и эмбрионального типа, из которых в дальнейшем формируются почки и эмбриониды. Пересаженные каллусы ставят для инкубации в световые камеры (16 ч освещения). Через три недели наблюдают развитие зеленых почек и эмбрионидов. Полученные эмбриониды и почки используют для получения растений-регенерантов. Их переносят с соблюдением строгой стерильности на питательную агаризованную среду В-5 без гормонов и инкубируют в световой камере. В одну колбу на 50 мл с 25 мл среды следует высаживать четыре-шесть почек эмбрионидов. Через три недели отмечают образование побегов из почек и формирование растений-регенерантов. На одном экспланте может появиться до нескольких десятков побегов. Когда побеги достигают высоты 10 мм, их следует разделить и перенести на среду для укоренения: В-5 с добавлением нафтилуксусной кислоты (НУК) концентрацией 0,1 мг/л. Через 5-10 дней отмечают появление корней.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. От чего зависят переход дедифференцированных каллусных клеток к вторичной дифференцировке и образование организованных структур в каллусной ткани?
2. Что происходит с каллусной тканью люцерны при пересадке ее на среду, содержащую 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП)?
3. Что нужно предпринять, если наблюдается нарушение нормального развития растений?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
27. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.
28. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
29. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Лабораторная работа №10 СУСПЕНЗИОННАЯ КУЛЬТУРА. ПОЛУЧЕНИЕ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ИЗ КАЛЛУСА

Цель работы. Получение суспензионной культуры из каллуса в жидкой питательной среде в стерильных условиях.

Теоретическое обоснование. Клеточная суспензия – источник ценных биологически активных веществ, служит исходным материалом для клеточной селекции. Суспензионная культура может быть использована как модельная система для изучения путей вторичного метаболизма, синтеза ферментов, экспрессии генов.

Получение экономически важных веществ растительного происхождения в пробирочной культуре связано со способностью культивируемых клеток многих растений синтезировать различного рода продукты, которые обычно получают из целых растений. При этом появляется возможность создавать принципиально новые продукты, превосходящие традиционные.

Клеточные культуры – продуценты имеют определенные преимущества перед традиционным растительным сырьем, так как продукт можно получать независимо от ареала распространения растения, сезона, погоды, почвенных условий.

Культура клеток позволяет оптимизировать и стандартизировать условия выращивания и, следовательно, автоматизировать технологический процесс. Если к тому же учесть быстрое истощение естественных сырьевых ресурсов, то преимущества использования клеточных технологий становятся очевидными.

В культуре клеток могут синтезироваться специфические для высших растений экономически важные соединения: алкалоиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, терпеноиды и терпены, эфирные масла, стероиды, пряности, инсектициды, натуральные красители и многие другие ценные вещества (6). Так у нас в стране налажено промышленное производство биомассы ценного лекарственного растения женьшеня. Из 0,1 г экспланта женьшеня за 1,5 месяца культивирования *in vitro* получают до 5 г ткани. Средний прирост корня женьшеня в оптимальных условиях на плантациях за год достигает лишь 8 г. Следовательно, культивирование *in vitro*, несомненно, является рентабельным производством. По качеству экстракты, полученные из каллусной ткани, почти не отличаются от экстрактов из натурального корня женьшеня.

Суспензия представляет собой одиночные клетки и агрегаты, которые растут в жидкой питательной среде определенного состава в стерильных условиях. Существуют разные способы культивирования суспензии: в колбах на качалках, ферментерах. Необходимое условие роста суспензии состоит в перемешивании или встряхивании среды, что обеспечивает аэрацию культур. Обычно суспензию получают из рыхлой каллусной ткани, помещая ее в жидкую питательную среду того же состава, что и для каллуса, но без агара. Растительные суспензии характеризуют по следующим показателям: количество жизнеспособных клеток, сегрегированность суспензии и плотность клеток в суспензионной культуре.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Каллусы. Колбы с жидкой питательной средой. Пинцеты, скальпели, стерильные чашки Петри, спиртовка, спички.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Открывают чашку Петри с каллусом, стерильным пинцетом выкладывают кусочки рыхлого каллуса в стерильную чашку Петри, отбирают светлые участки и опускают их в колбочки со стерильной средой для суспензии. Расчет навески каллуса на объем жидкости делается следующим образом: 3-5 г каллуса на 100 мл жидкости. Объем суспензии составляет 10-20% объема колбы. Например, в колбу объемом 500 мл наливают 50-100 мл суспензии. Закрывают колбу ватно-марлевой пробкой с целлофаном или фольгой и ставят на качалку на три-четыре недели (оптимальная длительность одного пассажа).

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Что представляет собой суспензионная культура?
2. Какие вещества можно синтезировать в культуре клеток?
3. Каковы условия роста суспензии?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
30. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.
31. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
32. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Лабораторная работа №11 ПОДСЧЕТ ПЛОТНОСТИ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ

Цель работы. Подсчёт плотности клеток в суспензионной культуре в счётной камере Фукса-Розенталя под микроскопом.

Теоретическое обоснование. Одним из основных показателей, характеризующих суспензию, служит плотность клеточной популяции. Число клеток определяют после мацерации (разделения клеток) суспензии. Подсчет клеток ведется в счетной камере под микроскопом. В качестве мацерирующего вещества применяется 10-20%-ная хромовая кислота, которая гидролизует средние пластинки, соединяющие клетки. После мацерации для лучшего отделения клеток друг от друга их надо несколько раз пропустить через шприц с толстой иглой. Затем клетки считают. После добавления к суспензии хромовой кислоты смесь ставят в термостат при температуре 6⁰С на 10-30 мин. Время нагревания зависит от особенностей суспензии (агрегированности, химического состава клеточных стенок и т.д.). Обычно различают три фазы ростового цикла суспензии: лаг-фазу (2-3 сут), фазу экспоненциального роста (2-10 сут) и стационарную фазу (10-15 сут). Хорошо растущая суспензия имеет S-образную кривую роста. Длительность цикла роста определяется временем до выхода культуры в стационарную фазу. Продолжительность фаз зависит от вида растения и органа, из которого получена, из которого получена культура каллуса, а затем суспензия, от начального количества клеток (первичного инокулята), от условий выращивания. Обычно длительность пассажа (время до пересадки) составляет 14-16 дней. При этом плотность возрастает от 5·10⁴-10⁵ кл/мл до 10⁶-5·10⁶ кл/мл (примерно в 20 раз). Для субкультивирования (пересадки) суспензия берется в конце экспоненциальной фазы. Для каждой культуры надо подбирать условия, при которых рост суспензии оптимален: реализуется S-образная кривая при высокой (70-80%) жизнеспособности.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Колбочка с суспензией. 20-% хромовая кислота. Стерильные пипетки с отрезанным кончиком, резиновая груша, пеницилиновые пузырьки, пипетка с оттянутым носиком, камера Фукса-Розенталя (гемоцитометр), камера для подсчета элементов крови, микроскоп, покровные стекла, шприц с толстой иглой.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Отбирают пипеткой со срезанным кончиком несколько миллилитров суспензии, предварительно взболтав суспензию в колбе. Для построения ростовой кривой используют по 20 мл суспензии из трех колбочек. Их сливают в одну емкость и все операции проделывают из смешанной суспензии. К одному объему исследуемой суспензии добавляют два объема хромовой кислоты и ставят при 60⁰С на 10 мин. Затем пропускают смесь через шприц с большой иглой три раза, при этом клетки хорошо отделяются друг от друга.

Камеру Фукса-Розенталя и покровное стекло тщательно промывают, высушивают. Притирают покровное стекло к камере до появления колец Ньютона. Пипеткой с узким носиком набирают мацерированный раствор и подносят к краю покровного стекла, при этом жидкость заполняет весь объем камеры. Подсчитывают клетки под микроскопом, в четырех больших квадратах по диагонали или по всей камере. При каждом заполнении считают верхнюю и нижнюю сетки. Операцию подсчета выполняют три-четыре раза. Для получения достоверных данных считают до 1000 клеток.

Для построения S-образной кривой показатели снимают через день в процессе культивирования. Плотность суспензии подсчитывают по формуле:

$$x = M \cdot n \cdot 1000 / 3,2,$$

где x – число клеток в 1мл, M – среднее число клеток в камере, n — разведение.

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы

1. Что служит одним из основных показателей, характеризующих суспензию?
2. Каковы фазы ростового цикла суспензии?
3. Каким образом ведут подсчёт плотности суспензии?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
33. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.
34. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
35. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Лабораторная работа №12 ВЫСЕВ СУСПЕНЗИИ НА ТВЕРДУЮ АГАРИЗОВАННУЮ СРЕДУ (МЕТОД ПЛЕЙТИНГА)

Цель работы. Культивирование клеточной суспензии на твёрдой питательной среде с двойным содержанием агара.

Теоретическое обоснование. Для проведения клеточной селекции обычно применяют высев мелкоагрегированной суспензии в агаризованную среду. При этом одиночные клетки и мелкие агрегаты дают начало клеточным клонам. Конечная цель клеточной селекции-получение растений из клеточных клонов.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Суспензия, среда для высева суспензии с двойным содержанием агара (1,2-1,4%). Стерильные чашки Петри, стерильный цилиндр.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Суспензию наливают в стерильный цилиндр и дают ей отстояться в течение 5 мин. Отбирают пипеткой 5 мл верхней фракции суспензии (обогащенной одиночными клетками) и смешивают в чистом стерильном цилиндре с 5 мл теплой питательной среды для роста каллуса. Быстро разливают содержимое цилиндра в чашки Петри, дают застыть и закрывают парафилмом. Через три-пять недель подсчитывают колонии диаметром более 1 мм. Эффективность высева определяется отношением количества образовавшихся колоний к количеству высеянных клеток и выражается в процентах. Обычно плотность высева составляет 105 кл/мл. Она не должна быть очень высокой, чтобы растущие колонии не сливались. Через три недели подсчитывают количество колоний в каждой чашке.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Какие суспензии применяют для проведения клеточной селекции?
2. Какова конечная цель клеточной селекции?
3. В чём заключается метод Плейтинга?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.

36. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.
37. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
38. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Лабораторная работа №13
ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ:
ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ
И ФЕРМЕНТАЦИЯ ТКАНЕЙ

Цель работы. Выделение протопластов из молодых листьев с использованием ферментных смесей на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ.

Теоретическое обоснование. Клеточные оболочки у растений представлены главным образом целлюлозой, гемицеллюлозой и пектиновыми веществами. Поэтому для разрушения оболочки используют ферментные смеси на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ. Ферментные растворы лучше готовить непосредственно перед опытом. Для ферментации используют молодые листья, предварительно осажденную суспензионную культуру или каллусные ткани, растущие на агаре.

Длительность ферментации зависит от типа ткани, состава ферментных растворов, температуры инкубации. Ферментацию следует контролировать визуально, используя инвертированный микроскоп. В связи с этим ферментацию лучше проводить в чашках Петри. Если ферментацию выполняют в течение ночи, то следует использовать менее концентрированные смеси, если в течение рабочего дня-более концентрированные. Рассмотрим технику выделения протопластов из мезофилла листа табака.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Асептические растения. Стерильные среды (табл.1), ферменты. Чашки Петри диаметром 10 см, колбы на 50 мл, пастеровские пипетки, колбочки со стеклянными воронками и нейлоновыми фильтрами с диаметром пор 60 мкм, мерные пипетки на 1 и 10 мл, центрифужные пробирки на 10 мл, шприц с насадкой для фильтров «Миллипор» и фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, пинцеты, скальпели, настольная центрифуга, инвертированный микроскоп.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. За сутки до опыта готовят ферментный раствор для выделения протопластов из мезофилла листа. Ферментная смесь содержит 0,5%-ную целлюлозу, 0,5%-ную мацеразу, 0,2%-ную дреселлазу, которую растворяют в растворе сахарозы (0,5 моль/л) и CaCl_2 (50 ммоль/л), рН 5,5-5,6. Приготовленный раствор центрифугируют для осаждения нерастворимых частиц в течение 10-15 мин при 1,5-2 g. После доведения рН до 5,5-5,6 раствор при помощи шприца с насадкой фильтруют через фильтр «Миллипор» в чашки Петри по 7-10 мл в каждую.

Молодые листья табака от растений, выращенных в асептических условиях, переносят в стерильные чашки Петри и нарезают узкими полосками или елочкой. Затем листья сразу помещают на поверхность ферментного раствора. Чашки переносят в термостат при 28-30°C на 15-18 ч. Для 1 г ткани достаточно 10 мл ферментного раствора. Контроль за ферментацией осуществляют с использованием инвертированного микроскопа. Аналогичным об

разом можно провести ферментацию из растений любых видов, но при этом следует изменить состав раствора. Так, для выделения протопластов из мезофилла картофеля применяют смесь, состоящую из 1%-ного целлюлазина, 0,5%-ной мацеразы и 0,1%-ной дреселлазы. После ферментации содержимое чашки фильтруют через нейлоновый фильтр в пустую стерильную колбу. Затем пипеткой суспензию, содержащую протопласты, переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 3 мин при 1g. Протопласты всплывают на поверхность. Их отбирают пастеровской пипеткой и переносят в центрифужную пробирку, заполненную до половины средой W-5 (табл.2.10). Протопласты центрифугируют в этой среде 2 мин при 700 g, для того чтобы отмыть от остатков ферментной смеси. Отмывку проводят дважды. При центрифугировании в питательной среде W-5 протопласты осаждаются. Это последний этап в процессе их выделения. В некоторых случаях рекомендуют центрифугирование смеси в градиенте сахарозы, тогда протопласты формируют кольцо на поверхности среды. Отбирают их также пастеровской пипеткой.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Какие вещества используют для разрушения клеточной оболочки?
2. От чего зависит длительность ферментации?
3. Объясните технику выделения протопластов из мезофилла листа табака.

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
4. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.
5. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
6. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Приложение.

Таблица 1. Среда для культивирования протопластов табака и картофеля, pH 5,7

Компоненты, мг/л	W-5	K-3	W-S-S	SH-1	SH-2	RMOP
NaCl	9000					
NH ₄ NO ₃		250	1280			1650
KNO ₃		2500		1900	1900	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	18400	900	600	440	440	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O		250	300	370	370	370
KH ₂ PO ₄			170	170	170	170
KCl	800		300			
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O		150				
(NH ₄) ₂ SO ₄		134				
NH ₄ Cl				267	267	
Fe-хелат		250	250	250	250	250
H ₃ BO ₃		3	6	6	6	6
MnCl ₂ · 4H ₂ O			24	24	24	24
ZnSO ₄ · 7H ₂ O		2	10	10	10	10
CuSO ₄ · 5H ₂ O		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CoSO ₄ · 7H ₂ O		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Ki		0,75	0,83	0,83	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O		0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
MnSO ₄ · 7H ₂ O		14				
Мезоинозит		100	100	100	100	100
Глицин				2	2	
Никотиновая кислота		1	1	5	5	
Фолиевая кислота				0,5	0,5	
Биотин				0,05	0,05	

Аденинсульфат				40	80	
Гидролизат казеина			500	300	100	
В ₁		10	10	0,5	0,5	10
В ₆		1	1	0,5	0,5	1
НУК		0,2	2	0,1		
ИУК					0,1	0,1
2,4-Д		1	0,2			
БАП		0,2	0,5	0,5		1
Зеатин					0,5	
Сахароза		10000		2500	2500	10000
Глюкоза	1000		7200			
Ксилоза			250			
Маннитол		72800		54600	34600	

Лабораторная работа №14 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МЕЗОФИЛЛА ЛИСТА

Цель работы. Выделение протопластов из мезофилла листа, их культивирование на стерильных питательных средах.

Теоретическое обоснование. Растительные протопласты, высеянные на питательную среду, через три-четыре дня регенерируют клеточную оболочку и переходят к делению. К 12-14-му дню практически все клетки, начавшие делиться, превращаются в микроколонии. Состоящие из 20-40 клеток микроколонии переносят на среду для подращивания, где они превращаются в хорошо пролиферирующие каллусные ткани. Из каллусов можно получить растения-регенеранты. Сегодня выделение протопластов, их культивирование и регенерацию целых растений успешно осуществляют для видов семейства пасленовых. Если культивирование протопластов проходит успешно независимо от освещения, то для регенерации из них растений обязательно нужен свет.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Суспензия отмытых протопластов. Стерильные среды (табл.2.10). Чашки Петри диаметром 6 см, пастеровские пипетки, мерные пипетки на 1 и 10 мл, инвертированный микроскоп, камера Горяева или Фукса-Розенталя.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. В стерильных условиях пастеровской пипеткой отбирают сверху среду W-5. Осадок протопластов ресуспендируют в 0,5 мл среды К-3 (табл. 2.10). В чашку Петри наливают с помощью мерной пипетки 6-10 мл среды К-3 и туда переносят пипеткой суспензию протопластов. Перед высевом протопластов на среду К-3 для культивирования следует определить их плотность с помощью камеры Фукса-Розенталя. Оптимальная плотность посева составляет 103 клеток в 1 мл.

Культивирование протопластов проводят на рассеянном свете или в термостате при температуре 26-28°C. Каждый день нужно проверять качество протопластов и контролировать их деление с помощью инвертированного микроскопа.

Через 10-20 дней культивирования протопласты образуют колонии клеток. К этому времени их можно различить глазом как светлые агрегаты. На 20-й день добавляют свежую среду. Для этого готовят несколько чашек диаметром 6-10 см со свежей средой К-3, куда пипеткой с широким концом вносят культуру протопластов.

Через три недели колонии переносят на твердую среду для регенерации из них растений. Чашки с культурой помещают на досветку. Для регенерации табака используют среду RМОР (табл.2.10). Для картофеля при культивировании протопластов используют среду W-S-S, а регенерацию осуществляют последовательно на средах SH-1 и SH-3 (табл.2.10).

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе,

основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Когда растительные протопласты можно считать микроколонией?
2. Какова оптимальная плотность посева протопластов?
3. Какие питательные среды используют для культивирования протопластов?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.
3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.
1. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.
3. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Лабораторная работа №15 ИНДИВИДУАЛЬНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ В МИКРОКАПЛЯХ

Цель работы. Культивирование протопластов растений в микрокаплях питательной среды.

Теоретическое обоснование. Методы разработаны в основном для массового культивирования, т.е. выращивания больших количеств клеток в общем объеме питательной среды. Между тем появляется все больше работ, где решающую роль играет индивидуальное культивирование клеток в микрообъеме среды. Такой подход применяется для культивирования гибридных продуктов, инъецированных протопластов. Культивирование небольших количеств клеток в микрообъеме питательной среды оказывается полезным при изучении их жизнедеятельности.

Протопласты и единичные клетки растений хорошо растут при определенной плотности посева. Если плотность менее 10^3 клеток на 1 мл среды, то происходит заметная диффузия в среду промежуточных продуктов их метаболизма, что часто приводит к гибели клеток. Обычно протопласты растений культивируют при плотности 10^4 - 10^5 на 1 мл, а индивидуальное культивирование протопластов проводят в микрокаплях объемом 10-100 нл.

При индивидуальном культивировании протопластов на покровное стекло наносят микрокаплю раствора сахарозы (2 моль/л) объемом 1 мкл. Затем стекло силиконизируют, а сахарозу удаляют, промывая стекло в воде. Потом наносят микрокаплю парафинового масла (1мкл), под которую вносят микрокаплю питательной среды для культивирования протопластов объемом до 100 нл. В микрокаплю питательной среды вносят один протопласт при помощи микропипетки. Обычно «рассаживают» по каплям не менее 30 протопластов в час. Выживаемость протопластов составляет до 60-90%.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Те же, что и для ведения культуры протопластов. Ламинарный бокс (установка обеспыливания УО-БГ или аналогичный; инвертированный микроскоп; манипулятор Фонбрюнна; прибор для вытягивания капилляров ПВК-1; микрокузница МЭ-4; микроапликатор; стеклянные трубки; тефлоновый шланг; держатели капилляров из комплекта КМ-2; парафиновое или вазелиновое масло.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. При подготовке опытов особое внимание следует обратить на чистоту посуды и реактивов. Чтобы не засорить микропипетку, все среды желательно профильтровать и тем самым удалить мелкие частички. Для соблюдения стерильности работы нужно проводить в ламинарном боксе, куда помещается вся установка. Сначала выполняют подготовительные операции.

Выделение протопластов проводится по стандартным методикам.

Изготовление микропипеток: на микрокузнице МЭ-4 тонкостенные капилляры диаметром 1,5 мм вытягивают до диаметра около 100 мкм на приборе ПВК-1. Кончик микропипетки изгибают.

Приготовление масла: парафиновое или вазелиновое масло заливают в делительной воронке деионизированной водой в соотношении 1:1. Воронку встряхивают до получения тонкой эмульсии и оставляют в вертикальном положении для отстаивания. Воду, собравшуюся внизу, сливают. Процедуру выполняют пять раз. Затем масло центрифугируют для удаления мельчайших капелек воды (120 мин при 20 тыс. об/мин на роторе SW-27). Масло отбирают, стерилизуют 2 ч при 120°C. После охлаждения в масло стерильно добавляют 0,1-0,2 объема среды для культивирования протопластов. Сосуд с маслом и средой встряхивают для получения суспензии. После отстаивания можно добавить 1-2% стерильного активированного угля. Приготовленное таким образом масло можно хранить в холодильнике при 4°C в течение месяца.

Подготовка камеры для индивидуального культивирования: чашку Петри перед опытом заполняют приготовленным маслом на 3-4 мм высоты. В чашку вносят каплю среды для культивирования и каплю суспензии протопластов. Объем капель не должен превышать 100 мкл, чтобы они не выступали над поверхностью масла. Камеру закрепляют в препаратодателе инвертированного микроскопа.

Затем переходят к основным операциям. Стерильная пипетка устанавливается в держатель из комплекта КМ-2, закрепленный на головке манипулятора Фонбрюнна. Держатель и примыкающую часть микропипетки протирают 70%-ным этиловым спиртом. Микропипетку вводят в поле зрения микроскопа. Затем заполняют микропипетку маслом из камеры, а попавший при этом в шланги воздух стравливают через краник.

После этого в микропипетку набирают 10-20 мкл среды из капли под маслом и при помощи микроапликатора или шприца на 20 мкл на дно камеры вносят микрокапли. Объем микрокапель определяют по формуле для объема полусферы

$$V = \frac{2}{3} \pi R^3$$

где R – радиус микрокапли, а V – ее объем. Так, для капли объемом 10 нл диаметр равен 342 мкм. Чтобы придать микрокаплям форму полусферы, лишнюю среду отсасывают микропипеткой.

Рассаживание протопластов по каплям выполняют следующим образом. Передвигая масляную камеру при помощи препаратодателя, приподнятую микропипетку вводят в каплю с суспензией протопластов. Микропипетку размещают над выбранным протопластом, обдувают его средой и засасывают, используя микроапликатор или шприц на 20 мкл. Для ускорения работы можно набирать в микропипетку до 10 протопластов. После этого микропипетку приподнимают и выводят из капли с суспензией.

При помощи препаратодателя в поле зрения микроскопа вводят микрокаплю, размещают над ней микропипетку с протопластом и опускают ее до соприкосновения с мениском. С помощью микроапликатора протопласт выпускают в микрокаплю и отбирают из нее избыток среды. Все вышеописанные операции выполняются при 100-кратном увеличении.

Примерно раз в неделю микроколониям нужно менять среду. Для этого микропипетку заполняют маслом, как описано выше; в камеру вносят каплю свежей среды (если ее состав отличается от используемой вначале). Часть старой среды из микрокапель забирают в микропипетку и сливают в каплю со старой средой или в каплю с суспензией. Затем микропипетку заполняют свежей средой и доливают микрокапли.

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. В чём заключается индивидуальное культивирование клеток?
2. Какова выживаемость протопластов при культивировании в микрокаплях?
3. Как происходит рассаживание протопластов по каплям?

Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.
2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и

биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.

3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.

4. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.

5. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.

6. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

Литература

Основная:

1. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.

2. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.

3. Валиханова Г.Ж. и др. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре клеток растений. Алматы, КазГУ, 1983.

4. Валиханова Г.Ж.. Биотехнология растений. Алматы, Ионжие, 1996.

39. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М., ФБК-ПРЕСС, 1999.

40. Шевелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. М., Высшая школа, 1998.

7. Биотехнология растений: культура клеток. М., ВО Агропромиздат, 1989.

8. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.Н., Прокофьев М.И.. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. М., ВО Агропромиздат, 1990.

9. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. М., Наука, 1983.

10. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. Киев, Наукова думка, 1984.

11. Пирузян Э.С. Основы генетической инженерии растений. М., Наука, 1988.

12. Сидоров В.А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев, Наукова думка, 1990.

Дополнительная:

7. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М., Наука, 1991.

8. Культура клеток растений и биотехнология. М., Наука, 1986.

3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка, 1980.

4. Биотехнология сельскохозяйственных растений. М., ВО Агропромиздат, 1987

5. Бутенко Р.Г. Экспериментальный морфогенез: дифференциация в культуре клеток растений. Тимир. чтения, М., Москва, 1975.

6. Валиханова Г.Ж., Есмагулов К.Е. Русско-казахский словарь терминов, используемых в биотехнологии растений. Алматы, Изае университеті, 1997.

7. Рахимбаев И.Р., Колумбаева С.Ж., Джокебаева С.А. Культура клеток и клеточная инженерия растений. Алматы, КазГУ, 1993.

8. Полимбетова Ф.А., Сарсенбаев Б.А. Русско-казахский толковый словарь терминов по физиологии и биотехнологии растений. Алматы, "Сјздік-Словарь", 1999.

9. Сассон А. Биотехнология: свершения и надежды. М., Мир, 1987.

10. Биотехнология. Принципы и применение. М., Мир, 1988.

Лабораторная работа №8 КАЛЛУСНАЯ КУЛЬТУРА

Цель работы. Получение каллусной ткани из сердцевинки стебля взрослого растения табака в условиях *in vitro*.

Теоретическое обоснование. Сущность метода выращивания изолированных тканей растений и получения каллуса заключается в том, что выделенный кусочек ткани (эксплант) стерилизуют и переносят на искусственную питательную среду, содержащие минеральные соли, органические вещества, фитогормоны. На такой питательной среде клетки начинают делиться. Различно дифференцированные клетки претерпевают *in vitro* дедифференциацию и переходят к делению, образуя первичный каллус. Возникший на эксплантах каллус через четыре-шесть недель переносят на свежую питательную среду (субкультивируют). Техника культивирования тканей позволяет получить длительную, пересадочную каллусную культуру из любых живых тканевых клеток интактного растения. Каллус-это неорганизованная масса ткани, состоящая из дедифференцированных клеток. Образование и рост каллуса контролируются фитогормонами группы ауксинов и цитокининов.

Каллусы на искусственных питательных средах, включающих фитогормоны, легко образуются на эксплантах из самых различных органов: из асептически прорастающих семян, отрезков стеблей и корней, изолированных фрагментов паренхимы, тканей клубня, изолированной сердцевинки стебля, из листа, зародышей и др.

В качестве примера рассмотрим метод получения каллусной ткани из сердцевинки стебля взрослого растения табака.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Взрослые растения табака. Химический стакан с дистиллированной водой, конические колбы на 100 мл со стерильной питательной средой Мурасиге и Скуга. Вата, 96%-ный спирт, 0,1%-ный раствор сулемы или диацид, стаканы со стерильной водой, стерильные марлевые мешочки, стерильный пробкобур, стерильный скальпель, стерильная чашка Петри.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Из стеблей табака в фазе бутонизации или цветения вырезают участки с хорошо развитой, но еще не одревесневевшей сердцевинкой (второе-третье междоузлие). Выбранные участки стебля разрезают на части длиной 5 см и моют в мыльном растворе щеткой, затем отмывают от мыла водопроводной водой и ополаскивают дистиллированной водой. Чистые участки стебля помещают в стакан с дистиллированной водой и переносят в ламинар.

Для стерилизации протирают стебли табака 96%-ным спиртом, и погружают в марлевых мешочках в 0,1%-ный водный раствор сулемы на 10-15 мин или в раствор диацида (1:1000) на 25 мин. После стерилизации стебли промывают в пяти порциях дистиллированной воды, оставляя в каждой на 5 мин. Затем из центральной части стебля вырезают стерильным сверлом для пробок (диаметр 5 мм) столбик сердцевинкой ткани и помещают в стерильную чашку Петри. Стерильным скальпелем удаляют участки ткани вблизи прежних срезов (концевые участки). Вырезанная сердцевинка не должна содержать элементов флоэмы и камбия. Полученные цилиндрики сердцевинки разрезают скальпелем в чашке Петри на кусочки длиной 2-3 мм и помещают на поверхность агаровой среды. Посуду с эксплантами табака помещают в термостат (в темноту) при температуре +25°C для культивирования. Через три недели анализируют результаты по образованию каллуса. Таким же образом получают каллус из корнеплодов картофеля и моркови.

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. В чём заключается сущность метода выращивания изолированных тканей растений и получения каллуса?
2. Что представляет собой каллус?

3. Из каких органов на искусственных питательных средах могут образоваться каллусы?

Лабораторная работа №9

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ В КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ

Цель работы. Регенерация растения люцерны *in vitro* на примере соматического эмбриогенеза на стерильной питательной среде Гамборга (В-5).

Теоретическое обоснование. Регенерацию *in vitro* рассмотрим на примере соматического эмбриогенеза у люцерны. Переход дедифференцированных каллусных клеток к вторичной дифференцировке и образование организованных структур в каллусной ткани зависят от соотношения гормонов в питательной среде. Преобладание цитокининов над ауксинами приводит к индукции стеблевого органогенеза или к соматическому эмбриогенезу. Преобладание ауксинов над цитокининами способствует образованию корней в каллусной ткани-корневному органогенезу.

В каллусной ткани люцерны при пересадке ее на среду, содержащую 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП), индуцируется образование почек и эмбриоидов. Через две-три недели от начала действия индуктора морфогенеза на каллусах развиваются зеленые почки и эмбриоиды длиной 0,5-2,0 мм. Их образованию предшествует возникновение на светлой поверхности каллусов зеленых точек, которые появляются через несколько дней после пересадки. Эмбриоиды в основном образуются у тетраплоидных сортов и у гибридов люцерны, почки чаще формируются у диплоидных форм. Иногда почки и эмбриоиды могут развиваться одновременно на одном каллусе.

Для получения растений-регенерантов возникшие почки и эмбриоиды помещают на среду без гормонов, где через две-три недели формируются растения. Иногда наблюдается нарушение нормального развития растений (образование каллуса, преимущественное развитие корня и побега, утолщение различных органов). В этом случае материал следует пересадить на среду без гормонов, с уменьшенной вдвое концентрацией всех компонентов. Срок, необходимый для прохождения всех стадий регенерации растений из тканевых культур (от листового экспланта до регенеранта), составляет около двух месяцев.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Культура каллусной ткани, полученной из листа люцерны. Колбы на 50 мл со стерильной питательной средой В-5 (табл.2.4). Стерильная чашка Петри, стерильные скальпели.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Соблюдая стерильность, каллус переносят в чашку Петри, разделяют на кусочки размерами 5x5 мм и помещают на новую питательную среду В-5 с добавкой 6-БАП (0,2 мг/л). Эта среда стимулирует развитие в каллусной ткани клеток меристематического и эмбрионального типа, из которых в дальнейшем формируются почки и эмбриоиды. Пересаженные каллусы ставят для инкубации в световые камеры (16 ч освещения). Через три недели наблюдают развитие зеленых почек и эмбриоидов. Полученные эмбриоиды и почки используют для получения растений-регенерантов. Их переносят с соблюдением строгой стерильности на питательную агаризованную среду В-5 без гормонов и инкубируют в световой камере. В одну колбу на 50 мл с 25 мл среды следует высаживать четыре-шесть почек эмбриоидов. Через три недели отмечают образование побегов из почек и формирование растений-регенерантов. На одном экспланте может появиться до нескольких десятков побегов. Когда побеги достигают высоты 10 мм, их следует разделить и перенести на среду для укоренения: В-5 с добавлением нафтилуксусной кислоты (НУК) концентрацией 0,1 мг/л. Через 5-10 дней отмечают появление корней.

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. От чего зависят переход дедифференцированных каллусных клеток к вторичной дифференцировке и образование организованных структур в каллусной ткани?
2. Что происходит с каллусной тканью люцерны при пересадке ее на среду, содержащую 0,2 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП)?

3. Что нужно предпринять, если наблюдается нарушение нормального развития растений?

Лабораторная работа №10 СУСПЕНЗИОННАЯ КУЛЬТУРА.

ПОЛУЧЕНИЕ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ИЗ КАЛЛУСА

Цель работы. Получение суспензионной культуры из каллуса в жидкой питательной среде в стерильных условиях.

Теоретическое обоснование. Клеточная суспензия – источник ценных биологически активных веществ, служит исходным материалом для клеточной селекции. Суспензионная культура может быть использована как модельная система для изучения путей вторичного метаболизма, синтеза ферментов, экспрессии генов.

Получение экономически важных веществ растительного происхождения в пробирочной культуре связано со способностью культивируемых клеток многих растений синтезировать различного рода продукты, которые обычно получают из целых растений. При этом появляется возможность создавать принципиально новые продукты, превосходящие традиционные. Клеточные культуры – продуценты имеют определенные преимущества перед традиционным растительным сырьем, так как продукт можно получать независимо от ареала распространения растения, сезона, погоды, почвенных условий.

Культура клеток позволяет оптимизировать и стандартизировать условия выращивания и, следовательно, автоматизировать технологический процесс. Если к тому же учесть быстрое истощение естественных сырьевых ресурсов, то преимущества использования клеточных технологий становятся очевидными.

В культуре клеток могут синтезироваться специфические для высших растений экономически важные соединения: алкалоиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, терпеноиды и терпены, эфирные масла, стероиды, пряности, инсектициды, натуральные красители и многие другие ценные вещества (6). Так у нас в стране налажено промышленное производство биомассы ценного лекарственного растения женьшеня. Из 0,1 г экспланта женьшеня за 1,5 месяца культивирования *in vitro* получают до 5 г ткани. Средний прирост корня женьшеня в оптимальных условиях на плантациях за год достигает лишь 8 г. Следовательно, культивирование *in vitro*, несомненно, является рентабельным производством. По качеству экстракты, полученные из каллусной ткани, почти не отличаются от экстрактов из натурального корня женьшеня.

Суспензия представляет собой одиночные клетки и агрегаты, которые растут в жидкой питательной среде определенного состава в стерильных условиях. Существуют разные способы культивирования суспензии: в колбах на качалках, ферментерах. Необходимое условие роста суспензии состоит в перемешивании или встряхивании среды, что обеспечивает аэрацию культур. Обычно суспензию получают из рыхлой каллусной ткани, помещая ее в жидкую питательную среду того же состава, что и для каллуса, но без агара. Растительные суспензии характеризуют по следующим показателям: количество жизнеспособных клеток, сегрегированность суспензии и плотность клеток в суспензионной культуре.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Каллусы. Колбы с жидкой питательной средой. Пинцеты, скальпели, стерильные чашки Петри, спиртовка, спички.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Открывают чашку Петри с каллусом, стерильным пинцетом выкладывают кусочки рыхлого каллуса в стерильную чашку Петри, отбирают светлые участки и опускают их в колбочки со стерильной средой для суспензии. Расчет навески каллуса на объем жидкости делается следующим образом: 3-5 г каллуса на 100 мл жидкости. Объем суспензии составляет 10-20% объема колбы. Например, в колбу объемом 500 мл наливают 50-100 мл суспензии. Закрывают колбу ватно-марлевой пробкой с целлофаном или фольгой и ставят на качалку на три-четыре недели (оптимальная длительность одного пассажа).

Контрольные вопросы.

1. Что представляет собой суспензионная культура?
2. Какие вещества можно синтезировать в культуре клеток?
3. Каковы условия роста суспензии?

Лабораторная работа №11

ПОДСЧЕТ ПЛОТНОСТИ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ

Цель работы. Подсчёт плотности клеток в суспензионной культуре в счётной камере Фукса-Розенталя под микроскопом.

Теоретическое обоснование. Одним из основных показателей, характеризующих суспензию, служит плотность клеточной популяции. Число клеток определяют после мацерации (разделения клеток) суспензии. Подсчет клеток ведется в счетной камере под микроскопом. В качестве мацерирующего вещества применяется 10-20%-ная хромовая кислота, которая гидролизует средние пластинки, соединяющие клетки. После мацерации для лучшего отделения клеток друг от друга их надо несколько раз пропустить через шприц с толстой иглой. Затем клетки считают. После добавления к суспензии хромовой кислоты смесь ставят в термостат при температуре 6°C на 10-30 мин. Время нагревания зависит от особенностей суспензии (агрегированности, химического состава клеточных стенок и т.д.). Обычно различают три фазы ростового цикла суспензии: лаг-фазу (2-3 сут), фазу экспоненциального роста (2-10 сут) и стационарную фазу (10-15 сут). Хорошо растущая суспензия имеет S-образную кривую роста. Длительность цикла роста определяется временем до выхода культуры в стационарную фазу. Продолжительность фаз зависит от вида растения и органа, из которого получена, из которого получена культура каллуса, а затем суспензия, от начального количества клеток (первичного инокулята), от условий выращивания. Обычно длительность пассажа (время до пересадки) составляет 14-16 дней. При этом плотность возрастает от $5 \cdot 10^4$ - 10^5 кл/мл до 10^6 - $5 \cdot 10^6$ кл/мл (примерно в 20 раз). Для субкультивирования (пересадки) суспензия берется в конце экспоненциальной фазы. Для каждой культуры надо подбирать условия, при которых рост суспензии оптимален: реализуется S-образная кривая при высокой (70-80%) жизнеспособности.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Колбочка с суспензией. 20% хромовая кислота. Стерильные пипетки с отрезанным кончиком, резиновая груша, пеницилиновые пузырьки, пипетка с оттянутым носиком, камера Фукса-Розенталя (гемоцитометр), камера для подсчета элементов крови, микроскоп, покровные стекла, шприц с толстой иглой.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Отбирают пипеткой со срезанным кончиком несколько миллилитров суспензии, предварительно взболтав суспензию в колбе. Для построения ростовой кривой используют по 20 мл суспензии из трех колбочек. Их сливают в одну емкость и все операции проделывают из смешанной суспензии. К одному объему исследуемой суспензии добавляют два объема хромовой кислоты и ставят при 60°C на 10 мин. Затем пропускают смесь через шприц с большой иглой три раза, при этом клетки хорошо отделяются друг от друга.

Камеру Фукса-Розенталя и покровное стекло тщательно промывают, высушивают. Притирают покровное стекло к камере до появления колец Ньютона. Пипеткой с узким носиком набирают мацерированный раствор и подносят к краю покровного стекла, при этом жидкость заполняет весь объем камеры. Подсчитывают клетки под микроскопом, в четырех больших квадратах по диагонали или по всей камере. При каждом заполнении считают верхнюю и нижнюю сетки. Операцию подсчета выполняют три-четыре раза. Для получения достоверных данных считают до 1000 клеток.

Для построения S-образной кривой показатели снимают через день в процессе культивирования. Плотность суспензии подсчитывают по формуле:

$$x = M \cdot n \cdot 1000 / 3,2,$$

где x – число клеток в 1мл, M – среднее число клеток в камере, n — разведение.

Контрольные вопросы

- 1.Что служит одним из основных показателей, характеризующих суспензию?
- 2.Каковы фазы ростового цикла суспензии?
- 3.Каким образом ведут подсчёт плотности суспензии?

Лабораторная работа №12
ВЫСЕВ СУСПЕНЗИИ
НА ТВЕРДУЮ АГАРИЗОВАННУЮ СРЕДУ
(МЕТОД ПЛЕЙТИНГА)

Цель работы. Культивирование клеточной суспензии на твёрдой питательной среде с двойным содержанием агара.

Теоретическое обоснование. Для проведения клеточной селекции обычно применяют высев мелкоагрегированной суспензии в агаризованную среду. При этом одиночные клетки и мелкие агрегаты дают начало клеточным клонам. Конечная цель клеточной селекции-получение растений из клеточных клонов.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Суспензия, среда для высева суспензии с двойным содержанием агара (1,2-1,4%). Стерильные чашки Петри, стерильный цилиндр.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. Суспензию наливают в стерильный цилиндр и дают ей отстояться в течение 5 мин. Отбирают пипеткой 5 мл верхней фракции суспензии (обогащенной одиночными клетками) и смешивают в чистом стерильном цилиндре с 5 мл теплой питательной среды для роста каллуса. Быстро разливают содержимое цилиндра в чашки Петри, дают застыть и закрывают парафилмом. Через три-пять недель подсчитывают колонии диаметром более 1 мм. Эффективность высева определяется отношением количества образовавшихся колоний к количеству высеянных клеток и выражается в процентах. Обычно плотность высева составляет 10⁵ кл/мл. Она не должна быть очень высокой, чтобы растущие колонии не сливались. Через три недели подсчитывают количество колоний в каждой чашке.

Требования к отчету по лабораторной работы

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

- 1.Какие суспензии применяют для проведения клеточной селекции?
- 2.Какова конечная цель клеточной селекции?
- 3.В чём заключается метод Плейтинга?

Лабораторная работа №13
ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ
И ФЕРМЕНТАЦИЯ ТКАНЕЙ

Цель работы. Выделение протопластов из молодых листьев с использованием ферментных смесей на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ.

Теоретическое обоснование. Клеточные оболочки у растений представлены главным образом целлюлозой, гемицеллюлозой и пектиновыми веществами. Поэтому для разрушения оболочки используют ферментные смеси на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ. Ферментные растворы лучше готовить непосредственно перед опытом. Для ферментации используют молодые листья, предварительно осажденную суспензионную культуру или каллусные ткани, растущие на агаре.

Длительность ферментации зависит от типа ткани, состава ферментных растворов, температуры инкубации. Ферментацию следует контролировать визуально, используя инвертированный микроскоп. В связи с этим ферментацию лучше проводить в чашках Петри. Если ферментацию выполняют в течение ночи, то следует использовать менее концентрированные смеси, если в течение рабочего дня-более концентрированные. Рассмотрим технику выделения протопластов из мезофилла листа табака.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Асептические растения. Стерильные среды (табл.1), ферменты. Чашки Петри диаметром 10 см, колбы на 50 мл, пастеровские пипетки, колбочки со стеклянными воронками и нейлоновыми фильтрами с диаметром пор 60 мкм, мерные пипетки на 1 и 10 мл, центрифужные пробирки на 10 мл, шприц с насадкой для фильтров «Миллипор» и фильтры с диаметром пор 0,22 мкм, пинцеты, скальпели, настольная центрифуга, инвертированный микроскоп.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. За сутки до опыта готовят ферментный раствор для выделения протопластов из мезофилла листа. Ферментная смесь содержит 0,5%-ную целлюлозу, 0,5%-ную мацеразу, 0,2%-ную дреселлазу, которую растворяют в растворе сахарозы (0,5 моль/л) и CaCl_2 (50 ммоль/л), pH 5,5-5,6. Приготовленный раствор центрифугируют для осаждения нерастворимых частиц в течение 10-15 мин при 1,5-2 g. После доведения pH до 5,5-5,6 раствор при помощи шприца с насадкой фильтруют через фильтр «Миллипор» в чашки Петри по 7-10 мл в каждую.

Молодые листья табака от растений, выращенных в асептических условиях, переносят в стерильные чашки Петри и нарезают узкими полосками или елочкой. Затем листья сразу помещают на поверхность ферментного раствора. Чашки переносят в термостат при 28-30°C на 15-18 ч. Для 1 г ткани достаточно 10 мл ферментного раствора. Контроль за ферментацией осуществляют с использованием инвертированного микроскопа. Аналогичным об

разом можно провести ферментацию из растений любых видов, но при этом следует изменить состав раствора. Так, для выделения протопластов из мезофилла картофеля применяют смесь, состоящую из 1%-ного целлюлазина, 0,5%-ной мацеразы и 0,1%-ной дреселлазы. После ферментации содержимое чашки фильтруют через нейлоновый фильтр в пустую стерильную колбу. Затем пипеткой суспензию, содержащую протопласты, переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют 3 мин при 1g. Протопласты всплывают на поверхность. Их отбирают пастеровской пипеткой и переносят в центрифужную пробирку, заполненную до половины средой W-5 (табл.2.10). Протопласты центрифугируют в этой среде 2 мин при 700 g, для того чтобы отмыть от остатков ферментной смеси. Отмывку проводят дважды. При центрифугировании в питательной среде W-5 протопласты осаждаются. Это последний этап в процессе их выделения. В некоторых случаях рекомендуют центрифугирование смеси в градиенте сахарозы, тогда протопласты формируют кольцо на поверхности среды. Отбирают их также пастеровской пипеткой.

Контрольные вопросы.

1. Какие вещества используют для разрушения клеточной оболочки?
2. От чего зависит длительность ферментации?
3. Объясните технику выделения протопластов из мезофилла листа табака.

Таблица 1. Среды для культивирования протопластов табака
и картофеля, pH 5,7

Компоненты, мг/л	W-5	K-3	W-S-S	SH-1	SH-2	RMOP
NaCl	9000					
NH ₄ NO ₃		250	1280			1650
KNO ₃		2500		1900	1900	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	18400	900	600	440	440	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O		250	300	370	370	370
KH ₂ PO ₄			170	170	170	170
KCl	800		300			
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O		150				
(NH ₄) ₂ SO ₄		134				
NH ₄ Cl				267	267	
Fe-хелат		250	250	250	250	250
H ₃ BO ₃		3	6	6	6	6
MnCl ₂ · 4H ₂ O			24	24	24	24
ZnSO ₄ · 7H ₂ O		2	10	10	10	10
CuSO ₄ · 5H ₂ O		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CoSO ₄ · 7H ₂ O		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Ki		0,75	0,83	0,83	0,83	0,83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O		0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
MnSO ₄ · 7H ₂ O		14				
Мезоинозит		100	100	100	100	100
Глицин				2	2	
Никотиновая кислота		1	1	5	5	
Фолиевая кислота				0,5	0,5	
Биотин				0,05	0,05	
Аденинсульфат				40	80	
Гидролизат казеина			500	300	100	
B ₁		10	10	0,5	0,5	10
B ₆		1	1	0,5	0,5	1
НУК		0,2	2	0,1		
ИУК					0,1	0,1
2,4-Д		1	0,2			
БАП		0,2	0,5	0,5		1
Зеатин					0,5	
Сахароза		10000		2500	2500	10000
Глюкоза	1000		7200			
Ксилоза			250			
Маннитол		72800		54600	34600	

Лабораторная работа №14 КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ МЕЗОФИЛЛА ЛИСТА

Цель работы. Выделение протопластов из мезофилла листа, их культивирование на стерильных питательных средах.

Теоретическое обоснование. Растительные протопласты, высеянные на питательную среду, через три-четыре дня регенерируют клеточную оболочку и переходят к делению. К 12-14-му дню практически все клетки, начавшие делиться, превращаются в микроколонии. Состоящие из 20-40 клеток микроколонии переносят на среду для подрачивания, где они превращаются в хорошо пролиферирующие каллусные ткани. Из каллусов можно получить растения-регенеранты. Сегодня выделение протопластов, их культивирование и регенерацию целых растений успешно осуществляют для видов семейства пасленовых. Если культивирование протопластов проходит успешно независимо от освещения, то для регенерации из них растений обязательно нужен свет.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Суспензия отмытых протопластов. Стерильные среды (табл.2.10). Чашки Петри диаметром 6 см, пастеровские пипетки, мерные пипетки на 1 и 10 мл, инвертированный микроскоп, камера Горяева или Фукса-Розенталя.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. В стерильных условиях пастеровской пипеткой отбирают сверху среду W-5. Осадок протопластов ресуспендируют в 0,5 мл среды K-3 (табл. 2.10). В чашку Петри наливают с помощью мерной пипетки 6-10 мл среды K-3 и туда переносят пипеткой суспензию протопластов. Перед высевом протопластов на среду K-3 для культивирования следует определить их плотность с помощью камеры Фукса-Розенталя. Оптимальная плотность высева составляет 10³ клеток в 1 мл.

Культивирование протопластов проводят на рассеянном свете или в термостате при температуре 26-28°C. Каждый день нужно проверять качество протопластов и контролировать их деление с помощью инвертированного микроскопа.

Через 10-20 дней культивирования протопласты образуют колонии клеток. К этому времени их можно различить глазом как светлые агрегаты. На 20-й день добавляют свежую среду. Для этого готовят несколько чашек диаметром 6-10 см со свежей средой K-3, куда пипеткой с широким концом вносят культуру протопластов.

Через три недели колонии переносят на твердую среду для регенерации из них растений. Чашки с культурой помещают на досветку. Для регенерации табака используют среду RMOP (табл.2.10). Для картофеля при культивировании протопластов используют среду W-S-S, а регенерацию осуществляют последовательно на средах SH-1 и SH-3 (табл.2.10).

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. Когда растительные протопласты можно считать микроколонией?
2. Какова оптимальная плотность высева протопластов?
3. Какие питательные среды используют для культивирования протопластов?

Лабораторная работа №15
ИНДИВИДУАЛЬНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ
ПРОТОПЛАСТОВ В МИКРОКАПЛЯХ

Цель работы. Культивирование протопластов растений в микрокаплях питательной среды.

Теоретическое обоснование. Методы разработаны в основном для массового культивирования, т.е. выращивания больших количеств клеток в общем объеме питательной среды. Между тем появляется все больше работ, где решающую роль играет индивидуальное культивирование клеток в микрообъеме среды. Такой подход применяется для культивирования гибридных продуктов, инъецированных протопластов. Культивирование небольших количеств клеток в микрообъеме питательной среды оказывается полезным при изучении их жизнедеятельности.

Протопласты и единичные клетки растений хорошо растут при определенной плотности высева. Если плотность менее 10^3 клеток на 1 мл среды, то происходит заметная диффузия в среду промежуточных продуктов их метаболизма, что часто приводит к гибели клеток. Обычно протопласты растений культивируют при плотности 10^4 - 10^5 на 1 мл, а индивидуальное культивирование протопластов проводят в микрокаплях объемом 10-100 нл.

При индивидуальном культивировании протопластов на покровное стекло наносят микрокаплю раствора сахарозы (2 моль/л) объемом 1 мкл. Затем стекло силиконизируют, а сахарозу удаляют, промывая стекло в воде. Потом наносят микрокаплю парафинового масла (1мкл), под которую вносят микрокаплю питательной среды для культивирования протопластов объемом до 100 нл. В микрокаплю питательной среды вносят один протопласт при помощи микропипетки. Обычно «рассаживают» по каплям не менее 30 протопластов в час. Выживаемость протопластов составляет до 60-90%.

Оборудование и техническое оснащение лабораторной работы. Те же, что и для ведения культуры протопластов. Ламинарный бокс (установка обеспыливания УО-БГ или аналогичный; инвертированный микроскоп; манипулятор Фонбрюнна; прибор для вытягивания капилляров ПВК-1; микрокузница МЭ-4; микроапликатор; стеклянные трубки; тефлоновый шланг; держатели капилляров из комплекта КМ-2; парафиновое или вазелиновое масло.

Содержание и порядок выполнения лабораторной работы. При подготовке опытов особое внимание следует обратить на чистоту посуды и реактивов. Чтобы не засорить микропипетку, все среды желательно профильтровать и тем самым удалить мелкие частички. Для соблюдения стерильности работы нужно проводить в ламинарном боксе, куда помещается вся установка. Сначала выполняют подготовительные операции.

Выделение протопластов проводится по стандартным методикам.

Изготовление микропипеток: на микрокузнице МЭ-4 тонкостенные капилляры диаметром 1,5 мм вытягивают до диаметра около 100 мкм на приборе ПВК-1. Кончик микропипетки изгибают.

Приготовление масла: парафиновое или вазелиновое масло заливают в делительной воронке деионизированной водой в соотношении 1:1. Воронку встряхивают до получения тонкой эмульсии и оставляют в вертикальном положении для отстаивания. Воду, собравшуюся внизу, сливают. Процедуру выполняют пять раз. Затем масло центрифугируют для удаления мельчайших капелек воды (120 мин при 20 тыс. об/мин на роторе SW-27). Масло отбирают, стерилизуют 2 ч при 120°C . После охлаждения в масло стерильно добавляют 0,1-0,2 объема среды для культивирования протопластов. Сосуд с маслом и средой встряхивают для получения суспензии. После отстаивания можно добавить 1-2% стерильного активированного угля. Приготовленное таким образом масло можно хранить в холодильнике при 4°C в течение месяца.

Подготовка камеры для индивидуального культивирования: чашку Петри перед опытом заполняют приготовленным маслом на 3-4 мм высоты. В чашку вносят каплю среды для культивирования и каплю суспензии протопластов. Объем капель не должен превышать 100 мкл, чтобы они не выступали над поверхностью масла. Камеру закрепляют в препаратодателе инвертированного микроскопа.

Затем переходят к основным операциям. Стерильная пипетка устанавливается в держатель из комплекта КМ-2, закрепленный на головке манипулятора Фонбрюнна. Держатель и примыкающую часть микропипетки протирают 70%-ным этиловым спиртом. Микропипетку

вводят в поле зрения микроскопа. Затем заполняют микропипетку маслом из камеры, а попавший при этом в шланги воздух стравливают через краник.

После этого в микропипетку набирают 10-20 мкл среды из капли под маслом и при помощи микроапликатора или шприца на 20 мкл на дно камеры вносят микрокапли. Объем микрокапель определяют по формуле для объема полусферы

$$V = \frac{2}{3} \pi R^3$$

где R – радиус микрокапли, а V – ее объем. Так, для капли объемом 10 нл диаметр равен 342 мкм. Чтобы придать микрокаплям форму полусферы, лишнюю среду отсасывают микропипеткой.

Рассаживание протопластов по каплям выполняют следующим образом. Передвигая масляную камеру при помощи препаратоводителя, приподнятую микропипетку вводят в каплю с суспензией протопластов. Микропипетку размещают над выбранным протопластом, обдувают его средой и засасывают, используя микроапликатор или шприц на 20 мкл. Для ускорения работы можно набирать в микропипетку до 10 протопластов. После этого микропипетку приподнимают и выводят из капли с суспензией.

При помощи препаратоводителя в поле зрения микроскопа вводят микрокаплю, размещают над ней микропипетку с протопластом и опускают ее до соприкосновения с мениском. С помощью микроапликатора протопласт выпускают в микрокаплю и отбирают из нее избыток среды. Все вышеописанные операции выполняются при 100-кратном увеличении.

Примерно раз в неделю микроколониям нужно менять среду. Для этого микропипетку заполняют маслом, как описано выше; в камеру вносят каплю свежей среды (если ее состав отличается от используемой вначале). Часть старой среды из микрокапель забирают в микропипетку и сливают в каплю со старой средой или в каплю с суспензией. Затем микропипетку заполняют свежей средой и доливают микрокапли.

Требования к отчету по лабораторной работе

Лабораторные записи необходимо вести аккуратно, поэтапно, в соответствии с порядком выполнения лабораторной работы.

Заносить тему, цель, материалы и оборудование, необходимые в лабораторной работе, основные этапы проведения опытов и результаты в виде тезисов, либо в табличном или графическом виде, а также с необходимыми рисунками.

Контрольные вопросы.

1. В чём заключается индивидуальное культивирование клеток?
2. Какова выживаемость протопластов при культивировании в микрокаплях?
3. Как происходит рассаживание протопластов по каплям?