

Т. И. Дитченко

# КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

*Рекомендовано  
Учебно-методическим объединением  
по естественно-научному образованию  
в качестве учебно-методического пособия  
для студентов учреждений высшего образования,  
обучающихся по специальности 1-31 01 01 «Биология  
(по направлениям)»*

УДК 581.17(075.8)+602.3:57.086.83(075.8)

ББК 28.57я73+30.16я73

Д49

**Р е ц е н з е н т ы:**

кандидат биологических наук, доцент *О. В. Чижик*;

кандидат биологических наук, доцент *О. В. Фомина*

**Дитченко, Т. И.**

Д49      Культуры растительных клеток : учеб.-метод. пособие / Т. И. Дитченко. – Минск : БГУ, 2018. – 96 с.

ISBN 978-985-566-542-8.

Представлены лабораторные работы по учебным дисциплинам «Культуры эукариотических клеток», «Иммобилизованные клетки и ферменты», «Основы биотехнологии растений»; задания для контроля управляемой самостоятельной работы студентов.

Предназначено для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)».

**УДК 581.17(075.8)+602.3:57.086.83(075.8)**

**ББК 28.57я73+30.16я73**

**ISBN 978-985-566-542-8**

© Дитченко Т. И., 2018

© БГУ, 2018

## ВВЕДЕНИЕ

Культивирование растительных клеток в строго контролируемых условиях *in vitro* первоначально возникло и разрабатывалось как теоретическое направление биологической науки, но уже с 60–70-х гг. XX века прочно вошло в арсенал методов биотехнологии растений. Культуры клеток используют для создания принципиально новых перспективных технологий получения ценных биологически активных веществ растительного происхождения, массового размножения и сохранения уникальных генотипов, оздоровления посадочного материала, создания новых форм сельскохозяйственных растений на основе клеточной и генной инженерии и др.

Возможности работы с культурами изолированных клеток и тканей растений весьма обширны. Данный метод лежит в основе изучения биологии клетки, существующей вне организма. Как экспериментально созданная биологическая система культура растительных клеток находит применение в фундаментальных исследованиях по генетике, молекулярной биологии, физиологии и цитологии растений.

В связи с этим необходимым элементом в системе подготовки высококвалифицированных специалистов-биологов является формирование компетенций, связанных с овладением техникой получения и ведения культур изолированных клеток и тканей.

Предлагаемое учебно-методическое пособие предназначено для освоения студентами биологических специальностей базовых принципов культивирования растительных клеток, таких как создание условий асептики, приготовление питательных сред и др. Описаны методические приемы для оценки физиологических показателей культивируемых клеток (жизнеспособность, ростовая активность и др.). Рассмотрены способы регенерации растений в культуре *in vitro*, а также получения иммобилизованных растительных клеток путем включения в гель.

Издание состоит из 20 лабораторных работ в рамках пяти основных разделов. К каждой лабораторной работе предусмотрены вводные теоретические пояснения, методика выполнения, перечень необходимого оборудования и материалов, контрольные вопросы. В конце книги приведены задания для контроля самостоятельной работы студентов и список литературы. Учебно-методическое пособие также может быть использовано в качестве практического руководства для учебно- и научно-исследовательских работ, связанных с биотехнологией растений.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота  
БАП – 6-бензиламинопурин  
ДМСО – диметилсульфоксид  
ИМК –  $\beta$ -индолил-3-масляная кислота  
ИПА – изопентиладенин  
ИУК –  $\beta$ -индолил-3-уксусная кислота  
НУК –  $\alpha$ -нафтилуксусная кислота  
Среда MS – среда по прописи Мурасиге и Скуга  
Среда WPM – среда для древесных растений  
ТТХ – 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид  
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

## **Раздел 1**

# **ОБЕСПЕЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ПРИ РАБОТЕ С КУЛЬТУРАМИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК**

Главным требованием при культивировании клеток являются создание и поддержание асептических условий. При работе с культурами клеток и тканей стерилизации должны подвергаться операционная комната, в которой производят инициацию и пассирование культур, одежда и руки работающего персонала, культуральная посуда, все необходимые инструменты и материалы, питательные среды, объекты культивирования.

### ***Лабораторная работа № 1***

## **ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ЛАБОРАТОРИИ ПО КУЛЬТИВИРОВАНИЮ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК. ЛАМИНАР-БОКСЫ**

Биотехнологическая лаборатория для работы с культурами растительных клеток должна включать: 1) асептическую (операционную) комнату либо бокс для проведения стерильных работ; 2) культуральную комнату для инкубации культивируемых объектов; 3) место для приготовления питательных сред; 4) стерилизационную (автоклавную); 5) вспомогательное помещение для проведения подготовительных работ (мытьё, сушка посуды и др.). В целях получения и длительного поддержания культур растительных клеток применяют базовое и специализированное лабораторное оборудование. Для приготовления искусственных питательных сред используют высококачественные реактивы.

Стерильные работы с растительными объектами проводят в специальном помещении – асептической комнате (боксе) либо используют *ламинарный шкаф (ламинар-бокс)*, который позволяет в любом помещении создать стерильный рабочий объем. Для удобства дезинфекции полы и стены комнаты, где ведутся стерильные работы, обычно имеют покрытие, не сорбирующее пыль и легко моющееся. Помещение должно быть оснащено бактерицидными лампами.

Ламинар-бокс имеет рабочую камеру, обеспечивающую постоянный обдув места проведения работ стерильным однонаправленным или ламинарным потоком воздуха. Передняя часть рабочего объема закрыта прозрачным стеклянным ограждением, перемещаемым по высоте. Очистка воздуха проводится путем фильтрации на фильтрах грубой и тонкой очистки, встроенных в прибор. К фильтрам тонкой очистки относятся HEPA-фильтры. HEPA (High Efficiency Particulate Air или High Efficiency Particulate Absorbing) означает высокоэффективное удержание частиц. По мере загрязнения грубый фильтр промывается, тонкий сменяется. Ламинар-боксы имеют встроенные источники освещения, УФ-облучения. Они могут размещаться внутри существующих чистых помещений для создания локальных рабочих мест более высокого класса чистоты.

Существуют два типа ламинарных потоков воздуха:

1) горизонтальный, при котором поток дует параллельно рабочей поверхности со стороны, противоположной оператору, и не рециркулирует (рис. 1, а);

2) вертикальный, когда поток направляется сверху вниз на рабочую поверхность (рис. 1, б), затем либо удаляется, либо рециркулирует. В большинстве ламинар-боксов воздух рециркулирует.

В боксах с горизонтальным ламинарным потоком очищенный воздух из рабочей камеры выходит непосредственно в окружающее пространство. Такое оборудование используется при работе с заведомо непатогенным материалом. В боксах с вертикальным ламинарным потоком возможность обдува оператора исключена, перед выходом из рабочей зоны воздух дополнительно фильтруется. При работе в ламинар-боксе с вертикальным потоком воздуха категорически запрещается проносить над открытой поверхностью стерильных культуральных сосудов нестерильные предметы и руки работающему персоналу.

Следует различать ламинарные боксы и боксы биологической безопасности. Существует несколько классов (I, II, III) боксов биологической безопасности, которые характеризуются различными уровнями защиты работающего персонала, окружающей среды и помещаемого в рабочий объем образца (продукта).

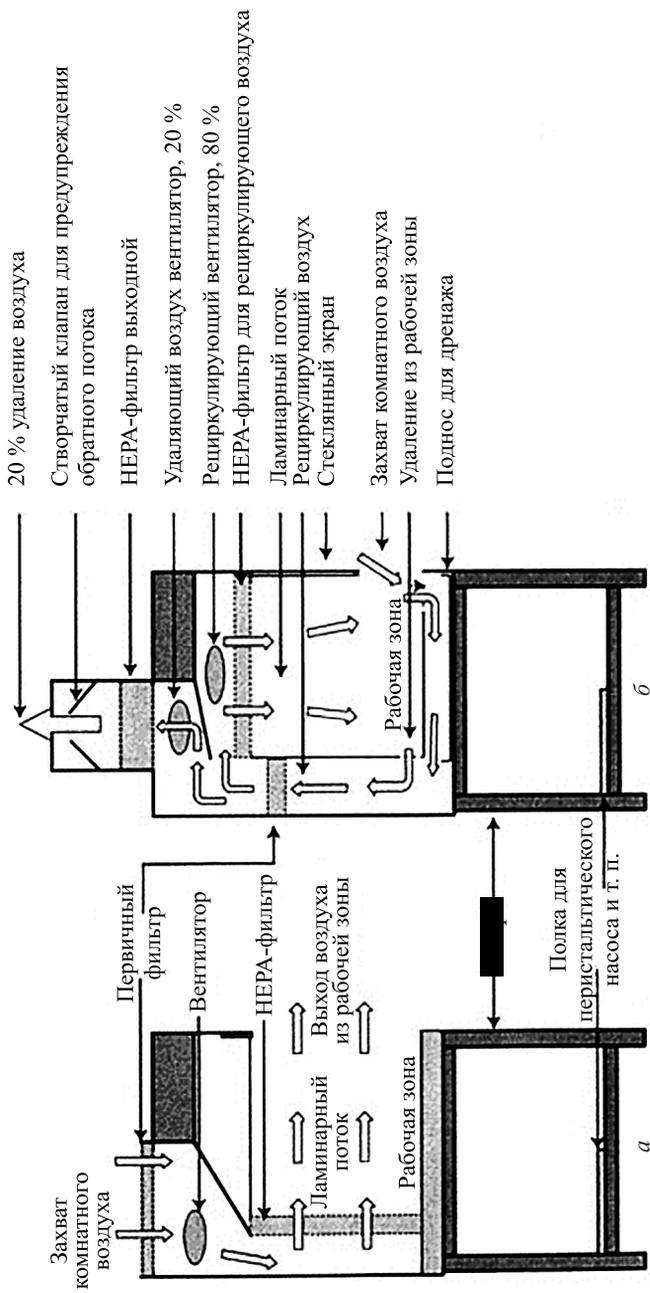


Рис. 1. Схемы потоков воздуха в ламинар-боксах:

а – горизонтальный ламинарный поток; б – вертикальный ламинарный поток

Боксы биологической безопасности класса I обеспечивают защиту оператора и окружающей среды при работе с опасными для здоровья человека образцами. Это достигается с помощью воздушного потока, входящего через окно оператора, и последующей эффективной его фильтрацией на выходе из бокса. Однако боксы класса I не защищают продукт от внешних загрязнений (нестерильная работа).

Боксы биологической безопасности класса II обеспечивают защиту не только оператора, окружающей среды, но и продукта, поскольку воздух подается в рабочее пространство через HEPA-фильтры, которые в зависимости от количества рециркуляционного воздуха внутри рабочей камеры бывают четырех подтипов (A1, A2, B1 и B2). При работе с культурами клеток широко используются боксы подтипа A2. С помощью вентиляторов в приборе обеспечивается рециркуляция воздушного потока, заключающаяся в том, что воздух из рабочего объема попадает на специальный фильтр тонкой очистки, откуда часть его выходит в окружающее пространство (20–35 %), а остальной поток (65–80 %) повторно проходит через HEPA-фильтр и вновь поступает в рабочий объем.

Боксы биологической безопасности класса III (также известные как перчаточные боксы) обеспечивают ультразащиту оператора, продукта и окружающей среды и применяются при работе с особо опасным микробиологическим материалом, вирусами; при работе с радиоизотопами, канцерогенами; при сборке электронных компонентов, а также в фармацевтике, криминалистике, органическом синтезе. Это боксы, в которых рабочая зона полностью изолирована от внешней среды, а оператор может проводить манипуляции в рабочей камере только через перчатки, механически соединенные с боксом.

Инкубацию культур растительных клеток и тканей чаще всего осуществляют в термостатах, способных с высокой точностью поддерживать задаваемый температурный режим. При необходимости культуральная комната может включать световое отделение – помещение либо стеллаж с источниками освещения, кондиционер для регуляции температуры ( $25 \pm 1$  °C) и влажности воздуха (70 %), стеллажи для штативов с культивируемым материалом. Наилучший световой и температурный режимы, а также режим оптимальной влажности можно создать с помощью климатических камер. Для поддержания суспензионных культур необходимы шейкеры ротационного типа с регулируемой скоростью встряхивания платформ. Наиболее удобны в использовании термостатируемые шейкеры-инкубаторы.

Набор материалов и оборудования для приготовления питательных сред включает:

- ❖ химические реактивы надлежащей степени чистоты (ХЧ – химически чистые, ОСЧ – особо чистые) либо реактивы марки Plant Cell Culture Tested (примерные перечни приведены в разд. 2);

- ❖ холодильники, морозильные камеры для хранения маточных растворов компонентов питательных сред;

- ❖ весы;

- ❖ рН-метры;

- ❖ магнитные мешалки;

- ❖ набор химической посуды (колбы, стаканы, мерные цилиндры, мензурки, пробирки и др.);

- ❖ автоматические дозаторы.

Для приготовления питательных сред желательно иметь отдельное место (препаративная зона), которое содержит в чистоте. Используемые приборы (рН-метры, весы, мешалки и др.) также не должны быть загрязнены посторонними реактивами.

Оборудование помещения для термической стерилизации питательных сред, инструментов и материалов (стерилизационная, автоклавная) включает:

- ❖ автоклавы (режимы работы – давление 0,5–2,0 атм и температура 112–134 °С);

- ❖ стеллажи для сосудов с питательными средами, инструментов, материалов;

- ❖ шкафы для хранения стерильных материалов.

Данное помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и иметь канализационный слив для отвода конденсата из автоклава.

В случае отсутствия возможности использования автоклава для стерилизации питательных сред, инструментов и материалов могут применяться некоторые другие стерилизационные аппараты, в том числе бытовые, при условии строгого соблюдения правил техники безопасности.

Перечень базового оборудования для проведения подготовительных работ включает:

- ❖ моечное отделение;

- ❖ дистиллятор, бидистиллятор либо систему очистки воды;

- ❖ сушильные шкафы с режимом работы для сушки (100–130 °С) и стерилизации посуды и инструментов (150–180 °С);

- ❖ шкафы для хранения чистой посуды и инструментов.

При работе в помещении для стерильных культур следует соблюдать следующие правила.

1. Лабораторию необходимо содержать в чистоте.

2. Не рекомендуется в одних и тех же боксах вести работы с микробиологическими объектами и культурами растительных клеток. Микроорганизмы более устойчивы к внешним факторам, и простерилизовать помещение после манипуляций с ними гораздо труднее, особенно это касается грибов.

3. В лаборатории может работать только подготовленный персонал, полностью понимающий смысл применяемых правил.

4. Персонал не должен вносить в чистое помещение загрязняющие предметы и материалы.

5. Люди, не соблюдающие правил личной гигиены, мало подходят для работы в чистых помещениях.

6. Категорически запрещается хранить в лаборатории продукты, принимать пищу и курить.

7. Работающий персонал должен находиться в лаборатории в халатах, сменной обуви (либо бахилах).

8. В целях противопожарной безопасности и соблюдения правил асептики рабочий стол в ламинар-боксе не должен быть заставлен лишним оборудованием и посудой. В случае пролива спирта или падения спиртовки необходимо прекратить доступ воздуха к загоревшемуся участку, накрыв его одеялом, которое должно находиться в каждой лаборатории.

**Цель работы:** ознакомиться с оборудованием лаборатории для культивирования растительных объектов *in vitro* и правилами работы в ней, конструкцией ламинар-боксов.

**Материалы и оборудование:** каллусные и суспензионные культуры растительных клеток, асептически выращиваемые растения, термостат, климатическая камера либо фитостат, орбитальный шейкер, рН-метр, аналитические весы, магнитная мешалка, автоклав, дистиллятор, сушильный шкаф, ламинар-бокс.

## Ход работы

**Задание 1.** Ознакомиться с оборудованием биотехнологической лаборатории для проведения работ по культивированию растительных объектов *in vitro*.

Под руководством преподавателя проводят осмотр оборудования биотехнологической лаборатории, в которой осуществляются работы по получению и поддержанию культур растительных клеток и тканей. Заполняют табл. 1.

Таблица 1

### Оборудование биотехнологической лаборатории для работы с культурами растительных клеток

Зоны либо отдельные помещения	Перечень основного оборудования
Асептическая	
Культуральная	
Препаративная	

Зоны либо отдельные помещения	Перечень основного оборудования
Стерилизационная	
Вспомогательная	

**Задание 2.** Ознакомиться с устройством ламинар-бокса и правилами работы в лаборатории для стерильных культур.

Под руководством преподавателя изучают конструкцию и особенности функционирования ламинар-боксов. На схемах, отражающих устройство ламинар-боксов с горизонтальным и вертикальным потоками воздуха, цифрами отмечают следующие элементы: 1 – фильтр грубой очистки, 2 – НЕРА-фильтр, 3 – выходной фильтр, 4 – рабочая поверхность, 5 – подъемное прозрачное ограждение, 6 – вентилятор. Поясняют обозначенные стрелками потоки воздуха (наружный контаминированный, частично очищенный, стерильный). Формулируют преимущества ламинар-боксов с вертикальным потоком воздуха.

Самостоятельно изучают правила работы в лаборатории для стерильных культур.

### Контрольные вопросы

1. Какое оборудование должна включать биотехнологическая лаборатория по культивированию растительных клеток и тканей?
2. В чем заключаются конструктивные особенности ламинар-боксов с вертикальным и горизонтальным потоками воздуха? В каких случаях они используются?
3. Охарактеризуйте боксы биологической безопасности класса I, II и III.
4. Какие правила необходимо соблюдать при работе в лаборатории для стерильных культур?

## Лабораторная работа № 2

### МЕТОДЫ СТЕРИЛИЗАЦИИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РАБОТ С КУЛЬТУРАМИ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Одним из условий успешного культивирования изолированных клеток, тканей и органов растений является соблюдение строгой стерильности. Все работы с культурами клеток и тканей *in vitro* проводят в асептических усло-

виях в стерильном боксе или ламинар-боксе, стерильными инструментами, в стерильной посуде, на стерильных питательных средах.

**Стерилизация операционной комнаты.** Для работы с культурами клеток необходимо иметь специальные операционные комнаты либо боксы. Стерилизация помещения включает ежедневное тщательное удаление загрязнений и пыли со всех поверхностей с помощью мыльного раствора либо 1–3 % раствора хлорамина.

Непосредственно перед работой проводится облучение УФ-лучами (260 нм) в течение как минимум 30 мин. Запрещается работать при включенных бактерицидных лампах. Работы в облученном помещении начинают через 10–15 мин после отключения бактерицидных ламп, так как под действием УФ-излучения двухатомный кислород воздуха  $O_2$  становится трехатомным озоном  $O_3$  – газом, токсичным для человека.

**Ламинар-бокс.** За 20 мин до начала работы рабочий объем бокса облучают ультрафиолетом. После выключения УФ-лампы включают биофильтры и приступают к работе через 3–5 мин.

**Стерилизация посуды.** Для культивирования растительных клеток и тканей используют стеклянную либо пластиковую посуду. Пластиковая посуда одноразового использования поступает в стерильном виде. Стеклянная культуральная посуда используется многократно, перед работой должна быть тщательно вымыта и простерилизована. Для мытья посуды следует использовать нетоксичные детергенты. В растворе детергентов посуда выдерживается несколько часов, затем тщательно промывается проточной водой, в конце тщательно споласкивается дистиллированной водой. Вымытую посуду высушивают в сушильном шкафу.

Варианты стерилизации посуды:

❖ сухим горячим жаром в сушильном шкафу (продолжительность стерилизации при 160–180 °С – 2 ч);

❖ автоклавирование при 2 атм (134 °С) в течение 25–30 мин.

Чтобы избежать заражения простерилизованных предметов из воздуха, перед стерилизацией их заворачивают в жаростойкую бумагу (у стаканов и колб достаточно обернуть алюминиевой фольгой только горлышко).

**Стерилизация инструментов.** Включает этапы предварительной и непосредственной стерилизации. Предварительная стерилизация заключается в нагревании инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и т. д.) сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при 140 °С. Металлические предметы нежелательно автоклавировать: под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно в процессе работы инструменты еще раз стерилизуют в ламинар-боксе, помещая их в сосуд с 96 % этанолом и обжигая в пламени спиртовки. *Стерильный инструмент используют только*

для одноразовой манипуляции. Перед повторным применением его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь.

**Стерилизация материалов.** Культуральную посуду, вату, бумагу, наколенники для автоматических дозаторов и другое стерилизуют в автоклавах под давлением пара 1–2 атм при температуре 120 °С в течение 20–60 мин.

**Стерилизация питательных сред.** Подразделяется на термическую и фильтрующую.

Главное преимущество *термической стерилизации* – надежность; недостаток – разрушение термолabileльных компонентов питательной среды. Питательные среды, содержащие термостабильные компоненты, стерилизуют автоклавированием при давлении 0,5–0,7 атм. Продолжительность стерилизации зависит от объема среды в сосуде. Культуральные сосуды со средой объемом 25–50 мл стерилизуют в течение 15–20 мин, объемом 2–4 л – в течение 30–40 мин.

Для стерилизации термолabileльных компонентов питательных сред (растительные экстракты, антибиотики, некоторые стимуляторы роста) применяют метод *фильтрующей стерилизации*, основанный на пропускании растворов через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22–0,45 мкм в условиях ламинар-бокса.

**Стерилизация растительного материала.** Процесс получения стерильного растительного материала (свободного от эпифитных и ризосферных микроорганизмов) состоит из нескольких этапов.

*Первый этап* – предварительная стерилизация. Условия обработки материала варьируют в зависимости от объекта. Фрагменты стебля, корня или листа промывают проточной водопроводной водой и помещают в этиловый спирт (70 % раствор) на 1 мин. Предварительная стерилизация семян – более длительная процедура, зависящая от степени их загрязненности. Семена, которые имеют достаточно загрязненную поверхность, промывают в мыльной воде, в растворе  $\text{KMnO}_4$  либо  $\text{CuSO}_4$ , 70 % этаноле; затем предварительно обрабатывают гипохлоритом натрия или кальция с последующей отмывкой стерильной водой.

*Второй этап* – собственно стерилизация. Предварительно простерилизованные объекты погружают в стерилизующий раствор. Все процедуры, связанные с использованием стерилизующих веществ, проводят в асептических условиях (ламинар-боксе). Стерилизующий агент и продолжительность его воздействия подбирают в зависимости от объекта. При этом важно не только обеспечить достаточную степень чистоты растительного материала, но и сохранить его жизнеспособность.

Одним из наиболее безвредных и эффективных агентов считается гипохлорит кальция или натрия (обычно используют растворы, в которых кон-

центрация активного хлора составляет 0,5–1 %). Наряду с ними применяют также 2–10 % растворы хлорамина; 0,1–1 % растворы сулемы; 5 % раствор формалина; 10 % раствор  $\text{CuSO}_4$ ; 5 % раствор фенола; 13–18 % растворы перекиси водорода; 70 % раствор этанола и т. п. Для стерилизации можно также использовать хлорсодержащие бытовые антисептики, например средство «Белизна» (разведение 1 : 2, 1 : 3) или дезинфицирующее средство Domestos. Антибиотики применяют для стерилизации растительного материала, внутренние части которого инфицированы бактериями. Наиболее часто используют стрептомицин и тетрацилин в концентрациях 10–80 мг/л, ампициллин – 200–400 мг/л, левомицитин, канамицин и др.

*Третий этап* – отмывание объекта от стерилизующего раствора (постстерилизация). При этом растительный материал промывают 3–4 порциями стерильной дистиллированной воды.

**Цель работы:** освоить правила поддержания асептики при проведении работ с культурами изолированных клеток и тканей растений.

**Материалы и оборудование:** семена моркови,  $\text{KMnO}_4$ , 3 % раствор гипохлорита натрия, 10 % раствор хлорамина, 25 % раствор дезинфицирующего средства Domestos (разведение 1 : 3), 70 % и 96 % этанол, дистиллированная вода, химические пробирки с питательной средой MS, химические стаканчики на 100 мл, чашки Петри, конические колбы на 500 мл, пинцеты, скальпели, спиртовка, стерильная вата, жаростойкая бумага, алюминиевая фольга, термостат, климатическая камера либо световая культуральная комната, автоклав, дистиллятор, сушильный шкаф, ламинар-бокс.

## Ход работы

**Задание 1.** Простерилизовать инструменты, посуду и питательные среды, необходимые для проведения работ с культурой растительных клеток.

Чашки Петри тщательно отмывают в растворе детергента, при необходимости помещают на несколько часов в хромпик (смесь серной кислоты с бихроматом калия ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  98 % +  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )), несколько раз споласкивают водопроводной водой, затем дважды – дистиллированной водой. Чистую посуду помещают в сушильный шкаф на 1 ч при температуре 100–130 °С. Сухие чашки Петри с дисками из фильтровальной бумаги, металлические инструменты (пинцет, скальпель) заворачивают в жаростойкую бумагу, помещают в сушильный шкаф и проводят стерилизацию сухим жаром при температуре 160 °С в течение 2 ч.

Штативы с пробирками или колбы, заполненные питательной средой, закрытые фольгой, помещают в автоклав. Автоклавируют 20 мин при дав-

лении в стерилизационной камере 0,5 атм. Колбы с дистиллированной водой автоклавируют при 2 атм в течение 30 мин. Проавтоклавированные материалы переносят в комнату для стерильных работ и помещают в шкафы или на стеллажи.

На основании вводных пояснений к лабораторной работе заполняют табл. 2.

Таблица 2

**Способы стерилизации помещения,  
оборудования, инструментов и материалов**

№ п/п	Объекты	Способ обеспечения асептики
1	Операционная комната	
2	Ламинар-бокс	
3	Химическая посуда	
4	Металлические инструменты	
5	Материалы	
6	Питательные среды: а) содержащие термостабильные компоненты; б) растворы термолабильных компонентов	

**Задание 2.** Провести стерилизацию семян для получения асептических проростков.

Работа выполняется после освоения техники работы в ламинар-боксе (см. лабораторную работу № 3).

Семена моркови промывают мыльной водой; воду сливают, а семена помещают в светло-розовый раствор  $KMnO_4$ . Через 20 мин сливают раствор и заливают семена 70 % этанолом на 1 мин.

Все последующие процедуры проводят в ламинар-боксе. Предварительно простерилизованные семена помещают в стаканчики, содержащие по 30 мл растворов различных стерилизующих агентов:

- ❖ 3 % раствор гипохлорита натрия;
- ❖ 10 % раствор хлорамина;
- ❖ 25 % раствор дезинфицирующего средства «Domestos» (разведение 1 : 3).

Продолжительность стерилизации – 15 мин. По истечении указанного времени сливают стерилизующие растворы, наливают в стаканчики по 30–40 мл стерильной воды, аккуратно встряхивают для перемешивания содер-

жимого в течение 1–2 мин, после чего сливают воду и добавляют новую ее порцию. Процедуру повторяют 3–4 раза. Простерилизованные семена используют для получения асептически выращиваемых проростков.

Проращивание семян может осуществляться двумя способами.

1. Семена прорастают на питательной среде. Для этого с помощью простерилизованного пинцета переносят по 1–2 шт. простерилизованного семени в пробирки, содержащие агаризованную среду MS без гормонов. Стерильно закрывают пробирки алюминиевой фольгой и помещают в термостат при температуре 25 °С. Через 5 сут проверяют чистоту посева и энергию прорастания семян. После их прорастания пробирки переносят в световую культуральную комнату либо климатическую камеру с фотопериодом 16 ч.

2. Семена проращивают на фильтровальной бумаге, смоченной водой, затем их переносят на питательную среду. Для этого необходимо смочить стерильной водой фильтровальную бумагу в стерильной чашке Петри, затем прокаленной и остуженной лопаткой перенести семена в чашку, равномерно разместить, закрыть чашку и герметизировать ее парафином. Чашку с семенами помещают в термостат при температуре 25 °С. Через 5 сут проросшие семена переносят стерильным пинцетом в пробирки с агаризованной питательной средой MS без гормонов и инкубируют в световой культуральной комнате либо климатической камере с фотопериодом 16 ч.

Определяют процент инфицирования в результате неудовлетворительной стерилизации и количество проросших семян (%).

Результаты оформляют в виде табл. 3.

Таблица 3

**Определение эффективности стерилизации и проращивания семян**

№ п/п	Стерилизующий агент	Способ проращивания семян	Эффективность стерилизации			Эффективность проращивания		
			общее кол-во семян, шт.	кол-во нестерильных семян, шт.	% инфицирования	кол-во стерильных семян, шт.	кол-во проросших семян, шт.	% прорастания
1								

Формулируют вывод об эффективности использованных в работе стерилизующих агентов и разных способов проращивания семян.

## Контрольные вопросы

1. Каким образом поддерживается асептика в операционном боксе для работы с культурами клеток?
2. Как стерилизуют посуду и инструменты для культивирования растительных объектов в условиях *in vitro*?
3. С помощью каких способов проводят стерилизацию питательных сред, содержащих и не содержащих термолабильные компоненты?
4. Какие стерилизующие агенты используют для введения растительных объектов в культуру *in vitro*?
5. Охарактеризуйте основные этапы проведения стерилизации растительных объектов.

## Лабораторная работа № 3 ТЕХНИКА РАБОТЫ В ЛАМИНАР-БОКСЕ

Все работы по получению и пересадкам культур изолированных клеток, тканей и органов растений проводят в ламинар-боксах. Необходимо обеспечение строгой асептики, так как на искусственных питательных средах, предназначенных для культур растительных клеток, хорошо развиваются и микроорганизмы, что создает опасность для культивируемого материала. В результате жизнедеятельности микроорганизмов изменяется состав питательных сред. Кроме того, изолированные от растения клетки и особенно протопласты легко повреждаются микроорганизмами.

### Правила работы в ламинар-боксе

1. За 20 мин до начала работы внутренний объем ламинар-бокса облучают бактерицидной УФ-лампой. Предварительно в нем размещают спиртовку, цилиндр с 96 % этанолом, флакон с 70 % этанолом, все необходимые инструменты и материалы.
2. Оператор, приступающий к работе, должен быть в чистом халате, желательно сменной обуви (бахилах).
3. Перед началом работы необходимо тщательно вымыть руки с мылом.
4. Непосредственно перед работой в ламинар-боксе необходимо обработать руки 70 % этанолом, антисептический эффект которого обусловлен

денатурацией структурных и ферментных белков бактериальных клеток, грибов и вирусов. В указанной концентрации этиловый спирт проявляет наиболее выраженные дезинфицирующие свойства, т. к. проникает в глубокие слои эпидермиса лучше, чем при концентрации 96 %, обладающей дубящим действием на кожу человека. После этой обработки уже не следует выносить руки за пределы ламинар-бокса. Если же это случилось, то необходима повторная обработка рук для исключения попадания микроорганизмов в стерильную зону.

5. Для соблюдения максимальной стерильности могут быть использованы медицинские перчатки, которые также протирают этанолом. Для избежания их возгорания при работе с горячей спиртовкой, обжиге крышек культуральных сосудов и других манипуляциях, связанных с термической стерилизацией инструментов и материалов, требуется строгое соблюдение техники безопасности.

6. Металлические инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы, микробиологические петли и др.) стерилизуют, помещая в фарфоровый стакан с 96 % этанолом и обжигая в пламени спиртовки. Как было отмечено выше, перед повторным использованием их следует снова обработать этиловым спиртом и обжечь.

7. Колбы и другие сосуды, закрытые крышками из фольги и бумаги, необходимо открывать следующим образом: бумагу снимают до внесения колбы в ламинар-бокс, фольгу обжигают, пронося горло сосуда над пламенем спиртовки, затем осторожно разворачивают края фольги с помощью стерильного пинцета и снимают ее. Закончив работу, закрывают сосуд: обжигают горло сосуда, стерильным пинцетом берут крышку из фольги, обжигают с обеих сторон и закрывают горло колбы. Когда фольга остынет, ее плотно прижимают к горлу сосуда. После этого сосуд можно вынести из ламинар-бокса, сверху покрыть фольгу бумажным чехлом.

8. При работе со стерильными объектами необходимо помнить о том, что *нельзя проносить руки либо нестерильные предметы над открытой стерильной поверхностью культуральных сосудов.*

9. Все операции желательно проводить в непосредственной близости от зажженной спиртовки, чтобы обеспечить максимальную защиту объектов от заражения. Необходимо быть внимательным и не допустить возгорания. В случае пролива спирта или падения спиртовки необходимо прекратить доступ воздуха к загоревшемуся участку.

10. После окончания работы проводят тщательную уборку ламинар-бокса, рабочую поверхность протирают 70 % этанолом. Можно также простерилизовать внутренний объем ламинар-бокса с помощью УФ-лампы.

**Цель работы:** освоить технику работы в ламинар-боксе.

**Материалы и оборудование:** колбы с простерилизованной агаризованной питательной средой, 70 % и 96 % этанол, стерильные чашки Петри, спиртовка, пинцет, стерильная вата, парафилм, ламинар-бокс.

## Ход работы

**Задание.** Освоить технику работы в ламинар-боксе.

Перед началом работы помещают в ламинар-бокс инструменты, посуду и материалы, необходимые для работы. Включают УФ-лампу на 20 мин. После УФ-облучения включают биофильтры. Зажигают спиртовку. Протирают руки и рабочую поверхность ламинар-бокса 70 % этанолом.

Руководствуясь пп. 6–9 изложенных выше правил, проводят стерильную работу, например розлив по чашкам Петри простерилизованной питательной среды.

После окончания работы осуществляют герметизацию культуральных сосудов и уборку рабочей поверхности ламинар-бокса с помощью 70 % этанола.

## Контрольные вопросы

1. Каким образом осуществляется подготовка к работе ламинар-бокса?
2. Какие правила необходимо соблюдать в ламинар-боксе?
3. Почему для стерилизации рук рабочего персонала используется 70 % раствор этанола?
4. Каким образом проводят непосредственную стерилизацию металлических инструментов в процессе работы в ламинар-боксе?
5. Как осуществляется стерильное открывание и закрывание культуральных сосудов?

## Раздел 2

# ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Компоненты питательной среды для выращивания растительных клеток и тканей можно разделить на следующие группы: макроэлементы, микроэлементы, источник углерода, витамины, регуляторы роста.

Минеральная основа питательных сред содержит необходимые для нормальной жизнедеятельности растительных клеток макро- и микроэлементы. Макроэлементы представлены соединениями азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора – в виде фосфатов; серы – в виде сульфатов; растворимыми солями калия, кальция и магния. Набор микроэлементов, присутствующих в составе питательных сред, включает железо, медь, кобальт, цинк, марганец, молибден, йод, бор и др. Железо используется в виде хелатов с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) или ее натриевой солью  $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$  (трилон Б). В такой форме железо наиболее доступно для усвоения растительными клетками.

Выращиваемые в темноте культуры растительных клеток являются гетеротрофами, поэтому нуждаются в источнике углерода и энергии в виде готового органического вещества. С этой целью в питательные среды добавляют углеводы. Обычно это сахароза в концентрации 2–3 % или 20–30 г/л. Реже моносахариды: гексозы (глюкоза и фруктоза), пентозы (ксилоза и др.). Полисахариды в питательных средах практически не используются. Только некоторые типы тканей (опухолевые), содержащие гидролитические ферменты, выращивают на средах с крахмалом или другими полисахаридами. Углеводы добавляют в питательные среды даже в случаях культивирования каллусов на свету и приобретения ими характерной для фотосинтезирующих тканей зеленой окраски, поскольку даже такие культуры, как правило, не способны полностью обеспечивать себя углеводами за счет фотосинтеза.

Для стимуляции биохимических реакций в культивируемых клетках используют витамины группы В (В<sub>1</sub> (тиамин), В<sub>6</sub> (пиридоксин)), С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит (миоинозит), биотин, рибофлавин, пантотеновую кислоту. Большинство витаминов термостабильны, однако аскорбиновая кислота может разрушаться во время автоклавирования, поэтому для ее растворов используют стерильную фильтрацию.

Для индукции каллусогенеза и пролиферации клеток в культуре *in vitro* в состав питательных сред должны обязательно входить ауксины (вызывающие клеточную дедифференцировку) и цитокинины (индуцирующие деление дедифференцированных клеток). На средах без гормонов растут опухолевые и «привыкшие» ткани. Автономность по отношению к обоим классам гормонов или к одному из них связана со способностью этих клеток продуцировать значительные количества ауксинов и цитокининов.

В качестве ауксинов в питательных средах наиболее часто используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д),  $\alpha$ -нафтилуксусную кислоту (НУК),  $\beta$ -индолил-3-уксусную кислоту (ИУК),  $\beta$ -индолил-3-масляную кислоту (ИМК). Для индукции каллусогенеза обычно необходимы высокие концентрации ауксинов (чаще это 2,4-Д), но при последующих пересадках их уменьшают. 2,4-Д и НУК являются синтетическими ауксинами. ИУК быстро окисляется под действием ИУК-оксидазы, присутствующей во всех растительных клетках, поэтому ее редко включают в состав питательных сред в качестве единственного ауксина.

В качестве цитокининов искусственные питательные среды могут содержать N<sup>6</sup>-фурфуриламинопури (кинетин), 6-бензиламинопури (БАП), зеатин (6-(4-окси-3-метилтранс-2-бутенил)-аминопури), N<sup>6</sup>-2-изопентиладенин (2iP, ИПА), N-фенил-N-1,2,3-тиадиазолил-5-мочевину (тиадиазурон). БАП, кинетин, тиадиазурон являются синтетическими цитокининами. Зеатин термолабилен, поэтому его растворы стерилизуют путем фильтрации.

Кроме ауксинов и цитокининов отдельные питательные среды включают гиббереллины, в частности ГК<sub>3</sub> (гибберелловую кислоту). Присутствие их в среде не является обязательным, но в некоторых случаях данные гормоны стимулируют рост изолированной ткани либо суспензионных культур при низкой плотности клеток. Гиббереллины термолабильны.

В качестве органических добавок в основном выступают дополнительные источники азота. В частности, можно использовать отдельные аминокислоты (глицин, аланин, аргинин, пролин, глутаминовую кислоту, аспа-

рагиновую кислоту и др.) либо гидролизат казеина. Другие органические добавки неопределенного состава (жидкий эндосперм кокосового ореха (кокосовое молоко), экстракт эндосперма каштана, солодовый экстракт, томатный сок, дрожжевой экстракт, картофельный отвар и др.) в последнее время используются редко из-за низкой воспроизводимости получаемых результатов. Однако в некоторых случаях их присутствие в питательной среде обеспечивает более высокие скорости прироста биомассы культур либо повышает эффективность морфогенеза.

Для культивирования растительных клеток и тканей *in vitro* применяют жидкие и агаризованные (твердые) среды. Агаризованные среды готовят на основе агар-агара – полисахарида, входящего в состав морских водорослей, который образует с водой гель при pH 5,6–6,0, плавящийся при 100 °С и затвердевающий при 45 °С. Обычно к среде добавляют 0,7–0,8 % агара. Желательно использовать агар высокой степени очистки, специально предназначенный для культивирования растительных клеток. В качестве желирующего агента можно использовать фитогель в концентрации 0,2–0,3 %, преимущество которого по сравнению с агар-агаром заключается в образовании полностью прозрачного плотного слоя питательной среды.

Кислотность питательных сред является важным фактором, определяющим эффективность культивирования. Обычно pH приготовленной среды составляет 5,6–5,8. Уменьшение pH ниже критического уровня приводит к тому, что после автоклавирования агаризованная среда плохо застывает.

Разработано много питательных сред, но большинство из них представляют модификации основных: Мурасиге – Скуга (MS), Уайта, Гамборга и Эвелеге (B5), Ничей, Као и Михайлюка, Линсмайера – Скуга, Хеллера, Чапека и др.

Среда MS дает хорошие результаты при каллусообразовании у большинства растений, эффективно поддерживает неорганизованный каллусный рост и вызывает индукцию морфогенеза у большинства двудольных.

Среда Уайта служит для укоренения побегов и нормального роста стеблевой части после регенерации.

Среда Гамборга и Эвелеге (B5) используется при культивировании клеток и тканей бобовых растений и злаков.

Среда Ничей рекомендуется для индукции андрогенеза в культуре пыльников, а также морфогенеза у злаков.

Среда Као и Михайлюка применяется для культивирования единичных (или с малой плотностью посева) изолированных протопластов и клеток.

## Лабораторная работа № 4

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ПО ПРОПИСИ МУРАСИГЕ И СКУГА

Среда MS – наиболее универсальная и многоцелевая среда, пригодная для культивирования клеток и тканей многих видов растений. Была предложена Тошио Мурасиге и Фольке Скугом в 1962 г. для каллусной ткани табака сорта «Висконсин». Отличительной особенностью питательной среды MS является высокое содержание аммонийного и нитратного азота.

Состав питательной среды MS приведен в табл. 4.

*Таблица 4*

**Состав питательной среды MS\***

№ п/п	Компонент	Концентрация, мг/л
1	$KNO_3$	1900
2	$NH_4NO_3$	1650
3	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440
4	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370
5	$KH_2PO_4$	170
6	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8
7	$Na_2ЭДТА \cdot 2H_2O$	37,3
8	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3
9	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6
10	$H_3BO_3$	6,2
11	KJ	0,83
12	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25
13	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025
14	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025
15	Пиридоксин-HCl	0,5
16	Никотиновая кислота	0,5
17	Тиамин-HCl	0,1

№ п/п	Компонент	Концентрация, мг/л
18	Мезоинозит	100
19	Глицин	2

\* *Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. Vol. 15. P. 473–497.

Содержит минеральную основу, витамины и органические добавки, тогда как фитогормоны (оптимум концентраций ауксинов и цитокининов) подбираются индивидуально для каждой конкретной культуры. Варьироваться может и концентрация сахарозы в зависимости от целей эксперимента.

Для искусственных питательных сред растворы макро- и микросолей готовят заранее и используют многократно. Это маточные (концентрированные) растворы. Маточные растворы макросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 10 раз (их обозначают М×10), микросолей – в 100–1000 раз (М×100 и М×1000), витаминов – в 1000 раз (×1000). Их хранят в специальных условиях: в холодильнике в плотно закрытых сосудах при 0... +4 °С либо в морозильной камере при –20 °С, некоторые витамины, фитогормоны – в небольших по 5–10 мл сосудах с пробками.

Для приготовления маточных растворов макро- и микросолей каждую соль растворяют в отдельном стаканчике, затем сливают в мерную посуду и доводят дистиллированной водой до нужного объема. В смесь макросолей последним добавляют раствор солей магния, а в микросоли – раствор солей молибдена (для предотвращения выпадения осадка).

Маточный раствор хелата железа готовят и хранят отдельно от других солей. Компоненты растворяют по отдельности, затем сливают их и подогревают раствор, не доводя до кипения, до появления темно-желтого цвета. Неправильное приготовление хелатного железа может привести к выпадению в осадок после автоклавирования фосфатов кальция и магния.

Концентрированные растворы витаминов готовят каждый отдельно путем растворения соответствующих навесок в дистиллированной воде.

Фитогормоны, как правило, плохо растворяются в воде. Поэтому предварительно 10 мг вещества растворяют в небольших количествах (0,5–1 мл) 96 % этанола (ауксины, гиббереллины), 1 н HCl (цитокинины), затем подогревают до полного растворения и доводят до 10 мл объема (1 мл раствора содержит 1 мг гормона). В холодильнике их можно

хранить при температуре +4 °С не более 1 мес. Поскольку при хранении в холодильнике концентрированных растворов некоторых ауксинов, в частности НУК, происходит кристаллизация, рекомендуется делать их маточные растворы более разбавленными (например, 0,1 мг/мл). Растворы зеатина и гиббереллина следует хранить в морозильной камере при –20 °С.

В настоящее время выпускаются готовые смеси компонентов питательных сред для культивирования растительных клеток и тканей, использование которых позволяет ускорить и облегчить процесс приготовления питательных сред.

## Протокол приготовления питательной среды

1. В мерный стакан помещают навеску сахарозы, растворяют в небольшом количестве воды.

2. Добавляют необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей, витаминов и органических добавок, фитогормонов.

3. Дистиллированной водой доводят объем до необходимого значения.

4. Измеряют рН раствора. С помощью 0,1 н раствора КОН либо 0,1 н раствора HCl доводят его до уровня 5,8.

Разливают среду порциями в чистые конические колбы. Количество питательной среды в колбе не должно превышать 1/2 либо 2/3 ее объема. Например, в колбу объемом 500 мл добавляют не более 300 мл питательной среды.

5. Добавляют агар-агар из расчета 8 г/л, колбы закрывают сверху алюминиевой фольгой, чехлом из бумаги.

**Цель работы:** ознакомиться с составом питательной среды MS и порядком ее приготовления.

**Материалы и оборудование:**  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , КJ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , мезоинозит, глицин, никотиновая кислота, пиридоксин-HCl, тиамин-HCl, сахароза, 2,4-Д, ИУК, кинетин, дистиллированная вода, 0,1 н раствор HCl, 0,1 н раствор КОН, лотки для взвешивания, шпатели, химические стаканчики, мензурки, склянки для хранения растворов, автоматические дозаторы на 1–10 мл, 100–1000 мкл, 1–20 мкл, наконечники для автоматических дозаторов, аналитические весы, рН-метр.

## Ход работы

**Задание 1.** Ознакомиться с составом питательной среды MS.

Записывают в тетрадах состав питательной среды MS, выделяя следующие группы компонентов: макроэлементы, микроэлементы, витамины и органические добавки.

Производят расчет молярных концентраций компонентов питательной среды MS. Результаты заносят в табл. 5.

Таблица 5

Молярные концентрации компонентов питательной среды MS

№ п/п	Компонент	Молярная масса	Концентрация, ммоль/л
1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	80	
2	$\text{KNO}_3$	101	
3	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147	
4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246	
5	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	136	
6	Мезоинозит	180	
7	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	278	
8	$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	373	
9	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223	
10	$\text{H}_3\text{BO}_3$	62	
11	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287	
12	Глицин	75	
13	KJ	166	
14	Никотиновая кислота	123	
15	Пиридоксин-HCl	206	
16	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	242	
17	Тиамин-HCl	337	
18	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	250	
19	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	238	

Поясняют, по какому принципу в табл. 5 приведена последовательность компонентов питательной среды MS.

**Задание 2.** Приготовить маточные растворы и питательную среду MS, содержащую 30 г/л сахарозы и фитогормоны.

Рассчитывают навески солей для приготовления маточных растворов в соответствии с объемами, указанными в табл. 6. Результаты расчетов заносят в соответствующий столбец табл. 6.

Таблица 6

**Маточные растворы компонентов питательной среды MS**

№ п/п	Компонент	Концентрация маточного раствора, мг/л	Объем маточного раствора, мл	Навеска для приготовления маточного раствора, г	Объем маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды, мл
Маточный раствор № 1 (×10)					
1	KNO <sub>3</sub>		500		
2	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>				
3	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				
4	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O				
Маточный раствор № 2 (×20)					
5	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O		500		
Маточный раствор № 3 (×100)					
6	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		200		
7	Na <sub>2</sub> ЭДТА · 2H <sub>2</sub> O				
Маточный раствор № 4 (×100)					
8	MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O		200		
9	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O				
10	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>				
11	KJ				
12	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O				
Маточный раствор № 5 (×1000)					
13	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O		100		
14	CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O				
Маточный раствор № 6 (×1000)					
15	Пиридин-НСl		10		
Маточный раствор № 7 (×1000)					
16	Никотиновая кислота		10		

№ п/п	Компонент	Концентрация маточного раствора, мг/л	Объем маточного раствора, мл	Навеска для приготовления маточного раствора, г	Объем маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды, мл
Маточный раствор № 8 (×1000)					
17	Тиамин-НСl		10		
Маточный раствор № 9 (×100)					
18	Мезоинозит		200		
Маточный раствор № 10 (×1000)					
19	Глицин		100		

Готовят маточные растворы компонентов питательной среды MS. В процессе приготовления маточных растворов макро- и микроэлементов важно соблюдать приведенный в прописи порядок добавления солей.

Рассчитывают объемы маточных растворов, необходимые для приготовления 1 л питательной среды MS. Результаты вносят в соответствующий столбец табл. 6.

Готовят маточные растворы фитогормонов 2,4-Д, ИУК и кинетина в концентрации 1 мг/мл. Объем каждого маточного раствора составляет 20 мл. Навеску 20 мг 2,4-Д сначала растворяют в небольшом количестве 96 % этанола (1–2 мл), затем доводят до конечного объема дистиллированной водой. Аналогично готовят маточный раствор ИУК. Навеску 20 мг кинетина растворяют в 1–2 мл 1 н HCl при нагревании, добавляют дистиллированную воду до конечного объема 20 мл.

Рассчитывают объемы маточных растворов фитогормонов для приготовления питательной среды в соответствии с данными табл. 7. Результаты расчетов заносят в табл. 7.

Таблица 7

#### Маточные растворы фитогормонов

№	Компонент	Концентрация маточного раствора, мг/мл	Концентрация в питательной среде, мг/л	Объем маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды, мл
1	2,4-Д	1	0,2	
2	ИУК	1	1,0	
3	Кинетин	1	0,5	

Используя данные табл. 6 и 7, согласно протоколу приготовления питательной среды, готовят 1 л питательной среды MS с добавлением 30 г/л сахарозы и фитогормонов: 0,2 мг/л 2,4-Д, 1 мг/л ИУК и 0,5 мг/л кинетина. Колбы с приготовленной средой передают на автоклавирование.

## Контрольные вопросы

1. Какие компоненты включают питательные среды для клеток и тканей растений? Какова их роль?
2. Что такое маточные растворы и каковы преимущества их использования в процессе приготовления питательных сред?
3. В чем особенности приготовления маточных растворов макро- и микроэлементов, витаминов и фитогормонов?
4. В каких условиях хранят маточные растворы?
5. Почему основная питательная среда MS не содержит фитогормонов?

## Лабораторная работа № 5 ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ WPM

Питательные среды для выращивания растений в асептической культуре можно условно разделить на две большие группы: среды для культивирования травянистых растений и для культивирования древесных растений. Композиция компонентов питательной среды MS является наиболее универсальной для культивирования представителей многих семейств травянистых растений. Для культивирования древесных растений применяют другой тип сред. Наибольшее распространение получила среда под аббревиатурой WPM (woody plant medium), которую разработали В. McCown и G. Lloyd в 1980 г. Состав минеральной основы питательной среды WPM приведен в табл. 8.

Таблица 8

Состав минеральной основы питательной среды WPM\*

№ п/п	Компонент	Концентрация, мг/л
1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	400
2	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	96
3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	556
4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370

№ п/п	Компонент	Концентрация, мг/л
5	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170
6	$\text{K}_2\text{SO}_4$	990
7	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
8	$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
9	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
10	$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8,6
11	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2
12	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
13	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25

\*Lloyd G. and McCown. (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. B., Int. Plant Prop. Soc. Proc. 30, 421–427.

Помимо минеральной основы среда WPM может включать витамины ( $\text{B}_1$ ,  $\text{B}_6$ , PP, мезоинозит) и органические добавки (глицин) в концентрациях по прописи среды MS.

**Цель работы:** ознакомиться с составом минеральной основы питательной среды WPM и приготовить маточные растворы макро- и микроэлементов.

**Материалы и оборудование:**  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , мезоинозит, глицин, никотиновая кислота, пиридоксин-HCl, тиамин-HCl, сахароза, дистиллированная вода, 0,1 н раствор HCl, 0,1 н раствор KOH, лотки для взвешивания, шпатели, химические стаканчики, мензурки, склянки для хранения растворов, автоматические дозаторы на 1–10 мл, 100–1000 мкл, 1–20 мкл, наконечники на 1–10 мл, 100–1000 мкл, 1–20 мкл, аналитические весы, рН-метр.

## Ход работы

**Задание 1.** Ознакомиться с составом минеральной основы питательной среды WPM.

Записывают в тетрадах состав минеральной основы питательной среды WPM, выделяя макро- и микроэлементы. Отмечают отличия минеральной основы среды WPM от среды MS.

**Задание 2.** Приготовить маточные растворы макро- и микросолей для питательной среды WPM.

Расчитывают навески солей для приготовления маточных растворов в соответствии с объемами, указанными в табл. 9. Результаты расчетов заносят в соответствующий столбец табл. 9.

Таблица 9

**Маточные растворы компонентов питательной среды WPM**

№ п/п	Компонент	Концентрация маточного раствора, мг/л	Объем маточного раствора, мл	Навеска для приготовления маточного раствора, г	Объем маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды, мл
Маточный раствор № 1 (×10)					
1	$\text{NH}_4\text{NO}_3$		500		
2	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$				
3	$\text{KH}_2\text{PO}_4$				
4	$\text{K}_2\text{SO}_4$				
Маточный раствор № 2 (×10)					
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		500		
6	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$				
Маточный раствор № 3 (×100)					
7	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		200		
8	$\text{Na}_2\text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$				
Маточный раствор № 4 (×100)					
9	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		200		
10	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$				
11	$\text{H}_3\text{BO}_3$				
12	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$				
13	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$				

Готовят маточные растворы компонентов питательной среды WPM.

Согласно протоколу готовят 1 л питательной среды WPM с добавлением 20 г/л сахарозы, витаминов и глицина по прописи среды MS. Колбы с приготовленной средой передают на автоклавирование.

## Контрольные вопросы

1. Для каких объектов предназначена питательная среда WPM?
2. В чем заключаются основные отличия состава минеральной основы среды WPM и среды MS?
3. Во сколько раз ниже содержание аммонийного и нитратного азота в питательной среде WPM по сравнению со средой MS?
4. Содержание каких макроэлементов выше в питательной среде WPM по сравнению со средой MS?
5. Приведите примеры других питательных сред для культивирования растительных объектов *in vitro*. Для каких целей они предназначены?

## Раздел 3

# КАЛУСНЫЕ И СУСПЕНЗИОННЫЕ КУЛЬТУРЫ

Самым распространенным типом изолированной растительной ткани является каллусная. Образование каллуса происходит на изолированных фрагментах растений – эксплантах. В основе каллусогенеза лежит процесс дедифференциации растительных клеток. Пролиферация дедифференцированных клеток стимулируется фитогормонами ауксиновой и цитокининовой природы. В искусственных условиях каллусные ткани можно выращивать неограниченно долго, периодически пересаживая их на свежую питательную среду.

В биотехнологии каллусные культуры используются для получения суспензионных культур и протопластов; регенерации растений и получения соматональных вариантов; сохранения в растущем состоянии коллекций разных штаммов, линий либо криосохранения генетического материала; в клеточной селекции для отбора клеток, устойчивых к тяжелым металлам, засолению, гербицидам и др.

Суспензионные культуры растительных клеток имеют определенные преимущества по сравнению с культурами каллусных тканей, поскольку отличаются простотой процессов субкультивирования, более быстрым приростом биомассы, возможностью масштабирования процесса культивирования вплоть до промышленных условий. При глубинном культивировании открываются более широкие возможности для изучения влияния экзогенных факторов на рост и метаболизм клеток, что делает суспензионные культуры удобными моделями в физиолого-биохимических и молекулярно-генетических исследованиях.

Суспензионные культуры выступают в качестве источников получения ценных вторичных метаболитов, могут применяться для массового размножения растений путем индукции соматического эмбриогенеза и создания «искусственных» семян.

## **Лабораторная работа № 6**

# **ПОЛУЧЕНИЕ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ И ЕЕ СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ**

Каллусную культуру можно инициировать из эксплантов, изолированных от разных частей растения: листьев, стеблей, корней, тканей клубня, зародышей и др. Выбор экспланта определяется целями исследования. Необходимо убедиться, что выбранный эксплант находится в подходящем физиологическом состоянии. Лучшими эксплантами являются молодые ткани и ткани, ответственные за пролиферацию. Для индукции каллусогенеза нежелательно использовать одревесневшие ткани, ткани с низким уровнем метаболизма, плохо пролиферирующие ткани (мякоть плодов и др.) и т. п. Проращивание простерилизованных семян в асептических условиях часто дает наиболее пригодный материал для получения каллуса.

Достаточно важным фактором для индукции каллусогенеза является механическое повреждение ткани экспланта. В связи с этим при получении первичного каллуса рекомендуется производить дополнительное повреждение эксплантов. Образование каллуса зависит от размеров экспланта. Для каждого вида растений существует минимальный критический размер экспланта – минимальная масса экспланта, при которой идет каллусогенез. При его уменьшении невозможно индуцировать образование каллуса. Он сильно варьирует у разных видов, что, очевидно, зависит от размеров и, следовательно, числа клеток у эксплантов разных видов растений.

Для образования каллусной ткани клетки экспланта должны дедифференцироваться, т. е. утратить специфические характеристики исходной ткани. Перестройка специализированных клеток эксплантов, предшествующая каллусогенезу, происходит сходным образом. В них снижается содержание запасных веществ, фотосинтезирующие клетки теряют хлорофилл и липиды хлоропластов. Разрушается аппарат Гольджи, перестраивается эндоплазматический ретикулум и элементы цитоскелета, увеличивается число полисом. Запускается экспрессия генов, присущих каллусным клеткам. Исчезают тканеспецифичные белки-антигены и появляются белки, специфичные для делящихся клеток. Таким образом, в основе дедифференцировки клеток лежат процессы изменения активности генов и белкового аппарата, что сопровождается глубокой биохимической и структурной перестройкой.

Добавление в среду экзогенных гормонов приводит к активной пролиферации дедифференцированных клеток. Обязательным условием дедифференцировки клетки и ее превращения в каллусную клетку является

присутствие в питательной среде представителей двух групп регуляторов роста – ауксинов и цитокининов, поскольку в растительной клетке существует двойной гормональный контроль деления. Ауксин необходим для перехода специализированной клетки из фазы  $G_1$  в S-фазу клеточного цикла, цитокинин – для завершения этой фазы и прохождения последующих фаз  $G_2$ , М и цитокинеза. Ауксины являются индукторами главной протеинкиназы клеточного деления, а цитокинины – циклинов. Отсутствие цитокининов в питательной среде блокирует клеточный цикл в пресинтетическом периоде, поэтому, если в питательной среде присутствует только ауксин, клетки не делятся и после латентной фазы переходят к росту растяжением. Одни цитокинины без ауксинов приводят к такому же старению тканей, как и на среде без гормонов. Оптимальные комбинации ауксинов и цитокининов при получении первичного каллуса подбираются индивидуально для каждого конкретного объекта, поскольку ткани разных видов растений и даже разных частей требуют для дедифференцировки и каллусогенеза разного количества и соотношения гормонов.

Каллусные культуры различаются по таким морфологическим признакам, как цвет, консистенция, степень гетерогенности. Способность к образованию каллуса определенного типа зависит от возраста экспланта, генотипа, условий и продолжительности культивирования.

В соответствии с условиями культивирования каллусные ткани имеют различную окраску, при культивировании на свету могут быть полностью или частично пигментированными хлорофиллами или антоцианами. При выращивании в темноте чаще всего имеют молочно-белую, желтоватую окраску и т. п. Темно-коричневая окраска обычно возникает при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов, которые окисляются в хиноны. Для предотвращения этого процесса в питательные среды вносят антиоксиданты.

В зависимости от источника получения различают гомогенные (содержат один тип клеток) и гетерогенные (содержат несколько типов клеток) каллусы. По консистенции каллусные ткани бывают рыхлыми, среднетрещотными и плотными. Консистенция каллуса в значительной степени зависит от состава среды.

Процесс получения первичного каллуса в количестве, достаточном для пересадки, обычно занимает 3–8 нед. Для того чтобы сохранить способность к делению и дальнейшему росту, первичный каллус разделяют на части, которые переносят на свежую питательную среду (транспланты) и в дальнейшем они культивируются отдельно. Этот прием носит название *пассирование* или *субкультивирование*. В редких случаях применяется способ субкультивирования без деления полученного каллуса на отдельные транспланты,

при котором после пересадки на свежую среду каллус продолжает расти всем объемом. Следует обратить внимание на размеры трансплантов, переносимых на свежую питательную среду: если они слишком малы, то дальнейший рост каллуса может быть угнетен. Начальный вес каллусов должен быть примерно одинаковым и составлять 0,5–0,7 г сырой массы. Обычно каллусные культуры подвергаются регулярной пересадке каждые 4 нед.

Пассировать ткань можно неограниченное число раз. Однако при многократном его повторении возможно «привыкание», которое выражается в приобретении автономности по отношению к гормонам и сопровождается значительным ослаблением способности каллусных клеток к регенерации целого растения.

**Цель работы:** освоить технику получения первичной каллусной культуры и субкультивирования длительно пассируемой каллусной ткани.

**Материалы и оборудование:** асептически выращенные растения, длительно пассируемая каллусная культура, чашки Петри со стерильной питательной средой MS, содержащей 2,4-Д и кинетин либо ИУК и кинетин, стерильная вода, 70 % и 96 % этанол, стерильные чашки Петри, скальпель, пинцет, ножницы, спиртовка, парафилм, стерильная вата, ламинар-бокс.

## Ход работы

**Задание 1.** Инициировать каллусную культуру из листовых эксплантов.

В условиях ламинар-бокса с помощью стерильных ножниц отделяют листья асептически выращиваемых растений и помещают их в стерильную чашку Петри. Для предотвращения подвядания листьев при последующей изоляции эксплантов рекомендуется добавить в чашку Петри небольшое количество стерильной воды.

Простерилизованным скальпелем нарезают фрагменты листьев, прилегающие к средней жилке, длиной 1,5–2,0 см и шириной 1 см. Для лучшего каллусообразования делают надсечки (поранения) по всей поверхности эксплантов.

Переносят подготовленные листовые экспланты в чашки Петри с питательными средами, содержащими 2,4-Д либо ИУК в качестве ауксина. Экспланты симметрично располагают на поверхности питательной среды по 6–7 шт. на каждую чашку Петри.

Чашки Петри запечатывают парафилмом, помещают в термостат при температуре 25 °С.

Через 2–3 нед. отмечают признаки каллусогенеза. Через 4–5 нед. сравнивают размеры первичного каллуса, полученного на средах с 2,4-Д и ИУК.

Делают заключение об эффективности каллусогенеза в зависимости от типа использованного ауксина.

**Задание 2.** Произвести субкультивирование длительно пассируемой каллусной ткани.

В условиях ламинар-бокса с помощью простерилизованного скальпеля отделяют кусочки каллуса для пересадки (транспланты) и переносят их в чашки Петри со свежей питательной средой, соблюдая строгую стерильность. Следует отбирать наиболее молодые светлые участки каллусных тканей, отбрасывая побуревшие старые фрагменты. В каждую чашку помещают 6–7 трансплантов. Чашки Петри запечатывают парафилмом и помещают в термостат при температуре 25 °С на 4 нед. В конце этого срока проводят визуальную оценку увеличения размеров каллусов.

### **Контрольные вопросы**

1. Что такое дедифференциация?
2. Перечислите факторы, индуцирующие каллусогенез. Какую роль играют ауксины и цитокинины в данном процессе?
3. С какой периодичностью осуществляется субкультивирование каллусов?
4. Какие правила необходимо соблюдать при пересадке каллусной ткани на свежую питательную среду?
5. Перечислите основные направления использования каллусных культур.

## **Лабораторная работа № 7**

### **ПОЛУЧЕНИЕ СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ЕЕ СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ**

Для получения суспензионной культуры наиболее пригодна каллусная ткань рыхлого типа, которая легко фрагментируется на отдельные клетки и небольшие агрегаты при помещении ее в перемешиваемую жидкую среду. С этой целью при культивировании каллуса из среды исключают цитокинины или снижают их содержание, а концентрацию ауксинов увеличивают. Первичный каллус использовать нежелательно, т. к. он обычно содержит более плотные агрегаты клеток, рекомендуется гомогенная интенсивно пролиферирующая каллусная культура. Для получения первичной суспензии, как правило, берут 2–3 г сырой массы каллусной ткани на 60–100 мл жидкой питательной среды.

Реже суспензионную культуру инициируют непосредственно из эксплантов, помещенных в постоянно перемешиваемую жидкую питательную среду. Возникающие на поверхности экспланта каллусные клетки могут отрываться и переходить в среду, давая начало суспензии. Но это длительный и малоэффективный процесс. Для некоторых исследований суспензионную культуру клеток получают путем механической либо ферментативной мацерации растительных тканей, например из мезофилла листа.

Для избавления от крупных плотных остатков каллуса, больших клеточных агрегатов суспензионную культуру фильтруют через сито с определенным диаметром пор или отбирают одиночные клетки и мелкие агрегаты после осаждения крупных агрегатов в результате отстаивания суспензии. Колбы помещают на шейкер. Скорость кругового вращения платформы обычно составляет 110–120 об/мин. Для обеспечения оптимального перемешивания степень заполнения колб суспензионной культурой не должна превышать 10–20 % от общего объема колбы.

Клеточные суспензии требуют более частого субкультивирования, чем каллусные культуры. Часть суспензионной культуры, используемая для пересадки на свежую среду, называется *инокулом*. Для каждой линии клеток существует минимальный размер инокулюма, при уменьшении объема которого культура не растет.

Длительность первого цикла выращивания суспензии обычно равна 15–20 сут в зависимости от вида растения, из которого она была получена, состава среды, скорости перемешивания. В течение этого времени происходит дезагрегация каллуса и интенсивное деление клеток. Последующие циклы сокращаются до 10–14 сут. Для пересадки используют культуру в конце фазы замедления роста.

Важно оптимизировать объем инокулюма и начальную плотность культуры. Объем инокулюма обычно составляет 10–20 % от общего объема суспензии в начале культивирования. При этом начальная плотность культуры находится в пределах 1–2 г/л по сухой биомассе и подбирается таким образом, чтобы лаг-фаза составляла 1–3 сут. Повышенные количества инокулюма приводят к угнетению роста клеточной популяции вследствие недостатка кислорода и накопления в среде токсических продуктов метаболизма.

**Цель работы:** освоить технику инициирования суспензионной культуры из каллусной ткани рыхлого типа и произвести субкультивирование клеточной суспензии на свежую питательную среду.

**Материалы и оборудование:** рыхлая каллусная ткань, суспензионная культура в фазе замедления роста, стерильные колбы с жидкой средой MS,

содержащей 3 % сахарозы и фитогормоны, 70 % и 96 % этанол, скальпель, пинцет, спиртовка, сито с диаметром пор 1 мм, стерильные стаканы на 50–100 мл, воронка, стерильная вата, ламинар-бокс, орбитальный шейкер.

## Ход работы

**Задание 1.** Инициировать суспензионную культуру из каллусной ткани рыхлого типа.

Работу проводят в асептических условиях. Для получения первичной суспензии с помощью простерилизованного скальпеля либо пинцета переносят фрагменты каллуса в колбу с жидкой средой MS, содержащей 3 г/л сахарозы и фитогормоны, из расчета 3 г ткани на 100 мл среды. Необходимо использовать только молодой, активно растущий, светлый каллус, отбрасывая побуревшие старые участки.

После переноса каллуса горло колбы обжигают в пламени спиртовки, закрывают предварительно обожженной крышечкой из фольги, а сверху чехлом из бумаги, подписывают и помещают на шейкер с круговым вращением и скоростью перемешивания 120 об/мин в термостат. Инкубируют культуру в темноте при температуре 25 °С.

Через 1–3 сут проводят контроль контаминации суспензионной культуры. Если среда становится мутной (признак бактериального заражения во время инокуляции), колбу выбраковывают. При отсутствии признаков контаминации продолжают культивирование до следующей пересадки.

**Задание 2.** Провести субкультивирование длительно пассируемой суспензионной культуры.

Для субкультивирования берут суспензионную культуру в фазе замедления роста либо в начале стационарной фазы. Работу проводят в ламинар-боксе. Если суспензионная культура содержит крупные агрегаты клеток, то перед субкультивированием ее необходимо профильтровать с помощью простерилизованного металлического сита.

Пересадку суспензионной культуры на свежую питательную среду можно осуществлять разными способами. В первом случае колбу с суспензией клеток встряхивают и сливают 3/4 культуры, к оставшейся части добавляют порцию свежей питательной среды. При добавлении среды необходимо учитывать оптимальный уровень степени заполнения колбы полученной культурой.

Другой способ субкультивирования заключается в том, что стерильной пипеткой отбирают определенный объем суспензионной культуры и переносят его в колбу со свежей средой. Объем инокулюма должен составлять примерно 20 % от объема получаемой суспензионной культуры (например, к 80 мл стерильной питательной среды добавляют 20 мл инокулюма). Для активно пролиферирующей суспензионной культуры объем инокулю-

ма может быть уменьшен до 10–15 %. В любом случае количество клеток в инокулюме не должно быть ниже критического уровня, который обеспечивает начальную плотность культуры в пределах 1–2 г/л по сухой массе.

Пересадив суспензию одним из рассмотренных способов, обжигают в пламени спиртовки крышку из фольги, горло колбы и с помощью стерильного пинцета производят ее закрывание. Переносят колбу в термостат на шейкер с круговым вращением платформы и скоростью перемешивания 120 об/мин. Инкубируют культуру в темноте при температуре 25 °С. Через 1–3 сут проводят контроль контаминации суспензионной культуры. При отсутствии признаков контаминации продолжают культивирование до следующей пересадки.

### **Контрольные вопросы**

1. Преимущества суспензионных культур растительных клеток по сравнению с культурами каллусных тканей.
2. Охарактеризуйте основные способы получения суспензионных культур.
3. Какие требования предъявляются к каллусным тканям, используемым для инициирования суспензионных культур растительных клеток?
4. Укажите среднюю продолжительность ростового цикла суспензионных культур.
5. Каким образом осуществляется субкультивирование клеточных суспензий?
6. Назовите направления практического использования суспензионных культур.

### **Лабораторная работа № 8**

#### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОДЫ И СУХОГО ВЕЩЕСТВА В КАЛЛУСНЫХ КУЛЬТУРАХ**

Для нормальной жизнедеятельности клетки растений должны быть постоянно насыщены водой. Формы воды в разных частях растительной клетки различны. В вакуолярном клеточном соке преобладает вода, удерживаемая низкомолекулярными соединениями (осмотически связанная), и свободная вода. В клеточной стенке вода связана главным образом высокомолекулярными полимерными веществами (целлюлозой, гемицеллюлозой, пектиновыми веществами) – это коллоидно-связанная вода. В цитоплазме имеется вода свободная, коллоидно- и осмотически связанная.

Физиологическое значение свободной и связанной воды различно. Интенсивность физиологических процессов, в том числе и темпов роста, зависит в первую очередь от содержания свободной воды. От содержания связанной воды может зависеть устойчивость растительных клеток к неблагоприятным условиям.

Содержание воды в культивируемых *in vitro* растительных клетках зависит от вида растения, состава питательной среды и условий культивирования. Степень вакуолизации клеток изменяется в течение ростового цикла: в ходе лаг- и лог-фазы она минимальна, а затем значительно возрастает при переходе в стационарную фазу.

Количество воды и сухого вещества в растительном материале определяют весовым методом путем его высушивания до постоянного веса при 60 °С.

**Цель работы:** провести определение содержания воды и сухого вещества в каллусных культурах.

**Материалы и оборудование:** каллусные культуры разных растений, различающиеся по консистенции (рыхлые и плотные), по физиологическому состоянию (в лог-фазе и стационарной фазе ростового цикла), бюксы, пинцеты, аналитические весы, сушильный шкаф.

## Ход работы

**Задание.** Определить содержание воды и сухого вещества в каллусных культурах в зависимости от их консистенции, физиологического состояния.

На аналитических весах определяют вес абсолютно сухого стеклянного либо металлического бюкса. Переносят в него определенную навеску каллусной ткани (1 г), отмечают массу бюкса с сырым материалом. Открытый бюкс с навеской ставят в сушильный шкаф, прогретый до 60 °С, на 18–24 ч. После высушивания бюкс с каллусной тканью охлаждают при комнатной температуре, затем взвешивают на аналитических весах и после вычитания веса бюкса получают значение сухой массы каллусной ткани.

Для контроля полноты высушивания каллусной культуры процедуру повторяют несколько раз до тех пор, пока сухая масса каллуса будет изменяться не более чем на 5 %. Для этого бюкс снова переносят в термостат на 2–3 ч, повторно взвешивают.

Рассчитывают содержание сухого вещества в процентах:

$$A = (m_{\text{сухая}}/m_{\text{сырая}}) \cdot 100.$$

Находят содержание воды в процентах:

$$B = 100 - A.$$

Результаты измерений и расчетов заносят в табл. 10.

Таблица 10

### Содержание сухого вещества и воды в каллусных культурах

Вариант	Масса бюкса, г	Масса бюкса с сырым материалом, г	Масса бюкса с сухим материалом, г	Сырая масса, г	Сухая масса, г	Содержание сухого вещества (А), %	Содержание воды (В), %

Формулируют вывод о степени оводненности разных каллусных культур в зависимости от их консистенции, физиологического состояния.

### Контрольные вопросы

1. В каких формах содержится вода в растительных клетках?
2. Укажите факторы, оказывающие влияние на содержание воды в культивируемых *in vitro* растительных клетках.
3. Каким образом изменяется степень оводненности клеток в течение ростового цикла?

## Лабораторная работа № 9

### ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИИ КЛЕТОК КАЛЛУСНЫХ И СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР

Характерной особенностью популяций культивируемых *in vitro* растительных клеток является их морфологическая гетерогенность. Каллусные и суспензионные культуры обычно содержат клетки, которые сильно варьируются по форме и размерам.

Каллусные ткани в зависимости от степени гетерогенности делятся на гомогенные и гетерогенные. В гомогенных каллусных культурах преобладают клетки паренхимного типа. Такие каллусы могут включать случайно расположенные меристематические очаги, разделенные паренхимными клетками. Как правило, они формируются в результате длительного субкультивирования, относятся к рыхлому типу и не способны к морфогенезу.

Гетерогенные каллусные культуры могут включать гигантские удлиненные клетки, округлые либо вытянутые паренхимные клетки, мелкие изодиаметрические меристематические клетки, проводящие элементы, например трахеиды, глобулярные структуры, способные развиваться в соматические эмбриониды. Гетерогенные каллусы, как правило, характеризуются гораздо более высокой регенерационной способностью по сравнению с гомогенными. Тем не менее для различных видов хвойных, злаков и других описаны эмбриогенные каллусы рыхлой консистенции, которая обусловлена присутствием соматических зародышей, находящихся на разных стадиях развития.

Суспензионные культуры состоят из клеток и клеточных агрегатов и также характеризуются морфологической гетерогенностью. Наряду с мелкими (диаметром 15–50 мкм) сферическими клетками включают более крупные, часто удлиненные (длиной 200–1000 мкм), изогнутые клетки, а также множество переходных типов клеток. Как правило, первичные суспензионные культуры являются более гетерогенными и содержат значительное количество клеток неправильной формы. При увеличении продолжительности культивирования в постоянных условиях суспензионная культура становится более гомогенной и представлена в основном клетками сферической формы.

Признаками «хороших» линий является высокая степень дезагрегации (5–10 клеток в группе), морфологическая выравненность клеток (небольшие размеры, сферическая или слегка овальная форма, плотная цитоплазма), отсутствие трахеидоподобных элементов.

**Цель работы:** проанализировать степень морфологического разнообразия клеток каллусных и суспензионных культур.

**Материалы и методы:** рыхлая и глобулярная каллусные культуры, первичная и длительно пассируемая суспензионные культуры, 3 % раствор сахарозы, предметные и покровные стекла, пипетки, пробирки, штатив, скальпель, микроскоп.

## Ход работы

**Задание 1.** Охарактеризовать степень морфологической гетерогенности каллусных культур разных растений.

С помощью скальпеля разделяют каллус на две равные части. Берут небольшие количества ткани из центральной зоны, переносят в пробирку с 5 мл 3 % раствора сахарозы. Содержимое пробирки интенсивно встряхивают, с помощью пипетки переносят каплю на предметное стекло, накрывают покровным стеклом. Приготовленный препарат помещают на столик микроскопа под малое увеличение объектива. Отмечают основные типы клеток, зарисовывают их. Аналогичным образом проводят микроскопиче-

ский анализ каллусных тканей, отличающихся по консистенции. Формулируют вывод о степени гетерогенности рассмотренных каллусных культур.

**Задание 2.** Охарактеризовать степень морфологической гетерогенности первичной и длительно пассируемой суспензионных культур.

На предметное стекло с помощью пипетки наносят каплю первичной суспензионной культуры. Накрывают покровным стеклом и помещают на столик микроскопа под малое увеличение объектива. Отмечают разнообразие форм клеток, зарисовывают основные их типы (не менее 5–7 разных вариантов).

Аналогичным образом готовят препарат длительно культивируемой суспензионной культуры и рассматривают под микроскопом. Делают рисунок, отражающий форму и размеры клеток.

Формулируют вывод о влиянии продолжительности культивирования на степень морфологической гетерогенности клеток суспензионных культур.

## Контрольные вопросы

1. В чем проявляется морфологическая гетерогенность каллусных и суспензионных культур?
2. Как взаимосвязаны степень гетерогенности каллусных тканей и их способность к регенерации растений?
3. Какие факторы оказывают влияние на степень гетерогенности каллусных культур?
4. Перечислите признаки «хорошей» линии суспензионной культуры.
5. Как изменяется степень морфологической гетерогенности суспензионной культуры при длительном культивировании в постоянных условиях?

## Лабораторная работа № 10 ОПРЕДЕЛЕНИЕ РОСТОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КАЛЛУСНЫХ И СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР

Методы оценки роста каллусных и суспензионных культур представлены согласно [Носов, 2011].

Индекс роста ( $I$ ) является простейшим показателем ростовых процессов культур клеток и тканей, который определяют по формуле

$$I = (x_t - x_0) / x_0,$$

где  $x_0$  – начальное значение параметра роста культуры (масса, количество клеток);  $x_t$  – значение параметра роста в конце цикла выращивания.

Величины индекса роста культур растительных клеток обычно лежат в пределах 5–15. Для одной и той же культуры значение индекса роста может различаться в зависимости от выбранного критерия (сырая/сухая масса).

Основным недостатком использования индекса роста для характеристики ростовых процессов является его зависимость от уровня начальной биомассы инокулюма/транспланта. Известно, что максимальный уровень накопления биомассы определяется в основном количеством углеводного субстрата в среде, но не начальной плотностью культуры, которая главным образом влияет на длительность лаг-фазы ростового цикла. Таким образом, при высокой начальной плотности клеток можно получить очень низкий индекс роста, несмотря на то, что другие ростовые характеристики (например, удельная скорость роста) будут весьма высокими. Следовательно, индекс роста является объективным критерием роста только при выровненной начальной плотности культур.

Удельная скорость роста ( $\mu$ ) – основной параметр, характеризующий рост культуры в ходе фазы экспоненциального или логарифмического роста, в течение которой рост культуры подчиняется следующему закону:

$$x = x_0 e^{\mu t}.$$

Кривые роста культур часто изображают в обычной системе координат, когда по оси  $OX$  откладывают время культивирования, по оси ординат – параметр роста (сырая либо сухая биомасса, число клеток, упакованный объем). Однако для детального анализа роста культур более целесообразно построение графика ростовой кривой в полулогарифмической системе координат, т. е. по оси  $OY$  необходимо откладывать не фактическое значение критерия роста, а его натуральный логарифм ( $\ln x$ ) (рис. 2). Преимущество построения ростовой кривой в полулогарифмических координатах состоит в том, что в этом случае экспоненциальная фаза роста будет выражена в виде прямой линии, тангенс угла наклона которой к оси  $t$  равен максимальной удельной скорости роста  $\mu_{\max}$ .

При использовании нормированного значения ростового критерия, т. е. значения  $\ln(x/x_0)$ , кривые роста для любого параметра будут идти из начала координат, что значительно облегчает их сопоставление.

Для расчета удельной скорости роста можно использовать два способа – графический и аналитический. Графический способ позволяет определить  $\mu_{\max}$  в экспоненциальной фазе роста. Аналитическим способом можно определять удельную скорость роста в любой фазе роста по формуле

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1),$$

где  $x_1$  и  $x_2$  – значения критерия роста (сырая и сухая масса, концентрация клеток) в моменты времени  $t_1$  и  $t_2$  соответственно.

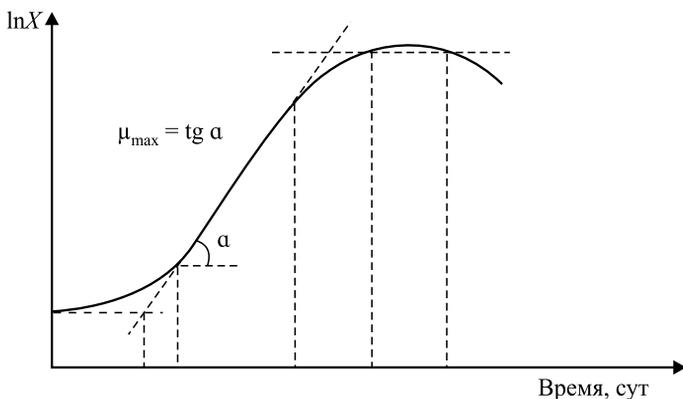


Рис. 2. Кривая роста в полулогарифмической системе координат (по Носову, 2011)

При этом во всех фазах роста  $\mu_x$  будет меньше  $\mu_{\max}$ , в стационарной фазе  $\mu_x$  будет равно нулю, а в фазе деградации – иметь отрицательное значение. Удельная скорость роста измеряется в единицах, обратных времени ( $1/t$ ). Этот параметр аналогичен сложным процентам. Например, удельная скорость роста  $0,1 \text{ сут}^{-1}$  означает прирост биомассы на 10 % за сутки. Для большинства культур значение  $\mu_{\max}$  находится в пределах  $0,1-0,4 \text{ сут}^{-1}$ . Если  $\mu_{\max}$  меньше  $0,1 \text{ сут}^{-1}$ , то необходимо проводить работу по оптимизации роста культуры клеток, до этого использовать данную культуру для проведения экспериментов вряд ли целесообразно. При удельной скорости роста выше  $0,4 \text{ сут}^{-1}$  (максимальное значение, известное по данным литературы, находится в пределах  $0,5-0,6 \text{ сут}^{-1}$ ) культуру можно считать очень хорошо растущей. Следует учесть, что  $\mu_{\max}$  обычно бывает различной для разных ростовых критериев.

Время удвоения биомассы ( $\tau$ ) рассчитывают по формуле

$$\tau = \ln 2 / \mu \approx 0,692 / \mu.$$

Время удвоения биомассы однозначно определяется удельной скоростью роста культуры. Например, при удельной скорости роста, равной  $0,1 \text{ сут}^{-1}$ , время удвоения биомассы составляет около 7 сут.

Экономический коэффициент или выход биомассы ( $Y$ ) определяется из уравнения

$$Y = \Delta m / \Delta s,$$

где  $\Delta m$  – увеличение биомассы, соответствующее потреблению субстрата в количестве  $\Delta s$ .

Физиологический смысл экономического коэффициента состоит в том, что он выражает соотношение энергетического и пластического метаболизма клеток либо эффективность использования углеводного субстрата среды для построения биомассы клеток. Когда концентрация биомассы достигает своего максимума, обычно субстрат среды (сахароза или другой источник углерода) поглощается клетками полностью; в этом случае экономический коэффициент можно с достаточной точностью определить как

$$Y = (m_{\max} - m_0) / s_0.$$

Например, при начальной концентрации сахарозы в среде 3 % (30 г/л среды) и начальной биомассе культуры 1 г/л (по сухой биомассе) в конце выращивания получили 11 г сухой биомассы, тогда экономический коэффициент  $Y$  составляет  $(11 - 1) / 30 = 1/3 = 0,33$ . Это означает, что треть субстрата клетки используют на построение биомассы (пластический метаболизм), а две трети – на энергетический метаболизм (дыхание).

Экономический коэффициент  $Y$  обычно находится в пределах от 0,2 до 0,5. Более низкие значения экономического коэффициента свидетельствуют о менее эффективном использовании культурой субстрата, а при значении  $Y$  менее 0,15–0,20 необходимо оптимизировать условия выращивания культуры.

Для проведения биотехнологических исследований целесообразно определение такого параметра, как продуктивность по биомассе ( $P$ ), имеющего размерность г/л за сутки.

$$P = (x_1 - x_0) / (t_1 - t_0),$$

где  $x_0$  и  $x_1$  – количество сухой биомассы в начале культивирования и момент времени  $t_1$ , для которого отмечается максимальное накопление биомассы культуры.

Для суспензионных культур в качестве параметра роста иногда используют осажденный объем клеток или упакованный объем клеток, который представляет собой отношение объема суспензии после отстаивания либо центрифугирования к общему объему пробы. Достоинством этого критерия является простота определения. Недостатком – низкая точность метода и, как следствие, невысокая воспроизводимость. Критерий можно использовать лишь для ориентировочного исследования или мониторинга.

Наиболее полное и достаточно точное определение ростовых характеристик возможно для суспензионной культуры клеток. Для этого в процессе культивирования ежедневно в одно и то же время (особенно это важно в начальных фазах роста) либо через день отбирают из колб пробы для анализа. Характеристика роста каллусных культур представляет собой более сложную и трудоемкую задачу, так как отбор проб для анализа роста невозможен. В качестве основной характеристики роста каллусов обычно применяют индекс роста по сырой/сухой биомассе. Для построения кривой роста

начальный вес каллусов должен быть одинаковым (0,5–0,7 г с точностью  $\pm 5\%$ ). Для анализа на каждую точку роста ростовой кривой используют не менее трех каллусов. Поскольку цикл выращивания каллусных культур составляет не менее 30 сут, с учетом аналитических повторностей для анализа необходимо одновременно культивировать 50–60 каллусов.

Длительность фаз ростового цикла существенно зависит от типа культуры и условий эксперимента. Лаг-фазу можно регулировать количеством инокулюма (начальной плотностью клеток). Считается оптимальным, если лаг-фаза составляет 1–3 сут. Более длительная лаг-фаза увеличивает продолжительность цикла выращивания. Отсутствие лаг-фазы (использование высокой начальной плотности культуры) при длительном выращивании культуры может привести к снижению ее ростового потенциала. В то же время выращивание клеток без лаг-фазы может быть эффективным способом повышения продуктивности культуры для биотехнологических целей (наработки биомассы клеток в биореакторах). Длительность экспоненциальной фазы обычно составляет 4–9 сут, а стационарной – сильно зависит от конкретной культуры клеток: для некоторых культур клеток она может практически отсутствовать, в отдельных случаях ее продолжительность может составлять 10–12 сут.

При анализе ростовых кривых следует обращать внимание на отличия реальных кривых роста от теоретических, что может давать ценную информацию об используемой культуре клеток. Например, достаточно часто на кривой роста отмечается «ступенька» в середине экспоненциальной фазы роста. Это может быть вызвано двумя причинами – сменой используемого субстрата (например, для некоторых культур гидролиз сахарозы происходит вне клеток за счет ферментов, выделяемых культурой в среду, затем клетки поглощают фруктозу, а лишь потом – глюкозу) либо наличием в культуре клеток двух стабильных субпопуляций.

**Цель работы:** охарактеризовать культуры клеток по показателям роста.

**Материалы и оборудование:** суспензионные культуры, данные по динамике изменения сухой биомассы клеток суспензионных культур в течение ростового цикла.

## Ход работы

**Задание.** Рассчитать показатели роста суспензионных культур.

На основании данных по динамике изменения сухой биомассы клеток разных суспензионных культур в течение ростового цикла и кривых роста в полулогарифмическом масштабе производят расчет показателей роста: ин-

декс роста, удельная скорость роста в экспоненциальную фазу, время удвоения биомассы, экономический коэффициент, продуктивность по биомассе.

Примерный вариант задания приведен в табл. 11.

Таблица 11

**Динамика изменения сухой массы клеток  
суспензионной культуры в течение ростового цикла**

Время, сут	0	2	4	6	8	10	12	14
Сухая масса ( $m$ ), г	1,80	2,14	3,54	6,98	12,48	16,81	18,00	17,10
$\ln m$ , г	0,59	0,76	1,26	1,94	2,52	2,82	2,89	2,84

Результаты расчетов заносят в табл. 12.

Таблица 12

**Показатели роста суспензионной культуры**

Вариант	$I$	$\mu$ , сут <sup>-1</sup>	$\tau$ , сут	$Y$	$P$ , г/л · сут

Анализируют полученные результаты и определяют, существует ли необходимость оптимизации условий культивирования данных культур.

## Контрольные вопросы

1. В каких единицах измеряются индекс роста, удельная скорость роста, время удвоения биомассы, экономический коэффициент, продуктивность по биомассе?

2. Укажите условие, при котором индекс роста можно использовать для сравнения ростового потенциала разных культур клеток.

3. С помощью какого уравнения описывается рост культуры клеток в фазу экспоненциального роста? Что такое удельная скорость роста культуры?

4. Укажите преимущество, которое дает построение кривой роста в полулогарифмической системе координат, а также использование нормированного значения ростового критерия.

5. Опишите способы определения удельной скорости роста культуры.

6. В каких пределах обычно варьирует удельная скорость роста культур клеток? Каковы ее максимальные значения? В каком случае требуется оптимизация роста культуры?

7. Как определяется время удвоения биомассы?

8. В чем заключается физиологический смысл такого показателя, как экономический коэффициент?

9. Укажите пределы обычного варьирования экономического коэффициента. В каком случае требуется оптимизация роста культуры?

10. Каким образом рассчитывается продуктивность по биомассе культуры?

11. В чем отличие величины осажденного объема клеток от упакованного объема клеток? Каковы достоинства и недостатки использования данных параметров для характеристики роста суспензионных культур?

12. Каковы особенности получения данных для построения кривых роста суспензионных и каллусных культур?

13. Какова продолжительность отдельных фаз ростового цикла культур клеток?

14. Как можно объяснить наличие «ступеньки» в экспоненциальную фазу роста для отдельных культур клеток?

## **Лабораторная работа № 11**

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР**

При работе с культурами растительных клеток необходимо контролировать их жизнеспособность, особенно при изменении параметров культивирования. Доля жизнеспособных клеток в культуре должна быть не менее 60 %, для хорошо растущих культур – 80–90 %. Жизнеспособность клеток обычно изменяется в цикле выращивания, существенно снижаясь при переходе в фазу деградации. При жизнеспособности клеток в популяции менее 50 % использовать культуру для экспериментов нецелесообразно. В этом случае необходимо проводить работы по оптимизации условий ее выращивания.

Известен ряд методов, позволяющих определить жизнеспособность клеток растений. Цитологические методы базируются главным образом на оценке нативности и проницаемости плазматической мембраны. Существует группа методов, которые основаны на определении активности ферментов как показателя метаболической активности и, следовательно, жизнеспособности клеток.

Для определения жизнеспособности клеток широко используются прижизненные красители. По оптическим свойствам различают витальные красители для видимого света и флуоресцентные красители – флуорохромы. По химическим свойствам выделяют основные, кислотные и электронейтральные витальные красители.

В качестве агента, избирательно прокрашивающего живые клетки, выступает нейтральный красный – липофильный феназиновый краситель (рис. 3). Это кислотно-основный индикатор, который в кислой среде имеет интенсивно красный цвет, а в щелочной – бледно-желтый. Интервал pH перехода 6,8–8,0 (изменение окраски раствора: красная → желтая).

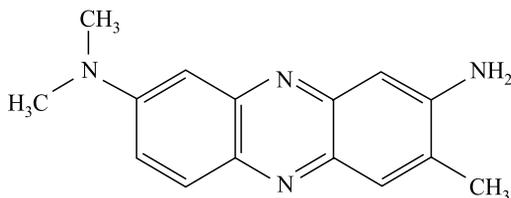


Рис. 3. Химическая структура нейтрального красного

В слабощелочной среде нейтральный красный находится в форме недиссоциированных молекул, хорошо растворимых в липидах мембран, тогда как в кислой среде ( $\text{pH} < 6$ ) это вещество образует ионы, трансмембранный перенос которых затруднен.

Жизнеспособные растительные клетки характеризуются наличием градиента pH между вакуолю и цитоплазмой. Содержимое вакуоли имеет кислую реакцию (pH 5,5 или ниже). В жизнеспособных клетках растений, помещенных в слабощелочной раствор, нейтральный красный легко проходит через мембраны в непротонированной форме, присоединяет протон в кислой среде и накапливается в вакуолях, приобретая красную окраску. В клетках, сохраняющих интактность тонопласта и плазмалеммы, нейтральный красный в ионизированной форме не способен свободно диффундировать обратно в наружный раствор. При непродолжительном пребывании клеток в растворе нейтрального красного цитоплазма не отмирает, в чем можно убедиться, вызвав плазмолиз окрашенных клеток (плазмолизироваться могут только живые клетки). В мертвых клетках из-за нарушения барьерных свойств плазмалеммы и тонопласта краситель не может накапливаться в вакуоли, поэтому поврежденные клетки имеют бледно-оранжевую окраску аналогично фону среды. Жизнеспособность культуры с помощью нейтрального красного определяют как отношение количества окрашенных клеток к общему их количеству в определенном объеме суспензии.

Для выявления мертвых или поврежденных клеток чаще всего используется диазокраситель Эванса синий (рис. 4). Плазматическая мембрана живых клеток не пропускает крупные анионы красителя, и клетки остаются неокрашенными. Следовательно, в этом случае в отличие от метода, основанного на использовании нейтрального красного, неокрашенные клетки

жизнеспособны и по их отношению к общему числу клеток можно судить о жизнеспособности суспензионной культуры. Суспензия считается жизнеспособной, если более 70 % клеток не окрашиваются в синий цвет; агрегат жизнеспособен, если более 50 % его клеток не окрасились. Подобным образом такие прижизненные красители, как метиленовый синий, индигокармин, кислый фуксин, эозин, через оболочки живых клеток в цитоплазму не проникают, тогда как легко прокрашивают цитоплазму мертвых клеток.

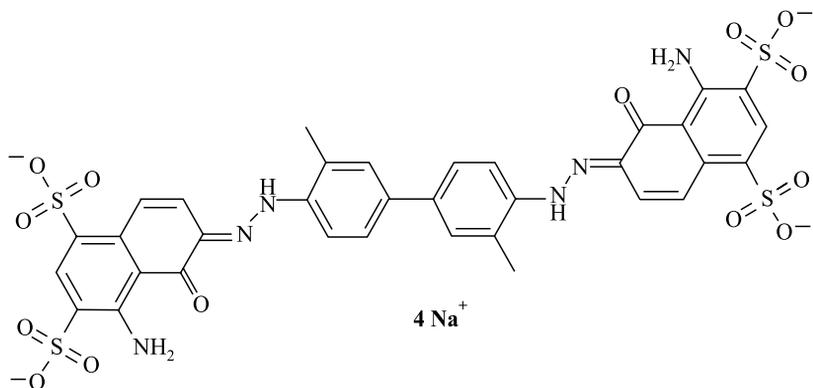


Рис. 4. Химическая структура Эванса синего

Для количественного определения жизнеспособности можно использовать вещества, участвующие в метаболизме клеток. Метод определения жизнеспособности клеточных культур с помощью флуоресцеиндиацетата (рис. 5) основан на том, что его молекулы легко проходят через плазматическую мембрану, но только в живых клетках расщепляются эстеразами. Расщепление приводит к образованию флуоресцеина, который задерживается в клетках с интактными мембранами. При освещении УФ-светом живые клетки можно визуально различить с помощью флуоресцентного микроскопа по зеленому свечению.

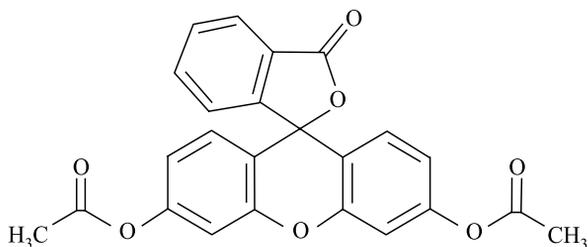


Рис. 5. Химическая структура флуоресцеиндиацетата



## Ход работы

**Задание 1.** Провести сравнительный анализ методов определения жизнеспособности растительных клеток.

На основании вводных пояснений к лабораторной работе заполняют табл. 13.

Таблица 13

### Методы определения жизнеспособности растительных клеток

Используемый агент	Жизнеспособные клетки		Мертвые клетки	
	Накопление*	Окрашивание**	Накопление*	Окрашивание**
Нейтральный красный				
Эванса синий				
Флуоресцеин-диацетат				
ТТХ				

\* – знаком «+» отмечают способность используемого агента либо продукта реакции аккумулироваться в клетках, «-» – отсутствие способности проникать и накапливаться в клетках.

\*\* – знаком «+» отмечают изменение окраски, указывают цвет, а также название продукта реакции, который обуславливает окрашивание, «-» – отсутствие окрашивания.

**Задание 2.** Провести определение жизнеспособности клеток суспензионных культур с помощью нейтрального красного.

Сравнивают характеристики (окраска, ионизация) нейтрального красного в кислой и щелочной среде и заполняют табл. 14.

Таблица 14

### Характеристики нейтрального красного

Индикатор	Интервал перехода окраски	Окраска		Состояние молекул (ионизация)	
		Кислая среда	Щелочная среда	Кислая среда	Щелочная среда
Нейтральный красный					

С помощью автоматического дозатора, снабженного наконечником с обрезанным «носиком», стерильно отбирают 2 мл суспензионной культуры (это необходимо для попадания в пробу всех клеточных агрегатов) и переносят в химическую пробирку. Добавляют 0,4 мл 0,1 % раствора нейтрального красного. *Работать с нейтральным красным необходимо очень аккуратно, т. к. краситель оставляет стойкие пятна на коже рук, одежде.* Через 3 мин добавляют по каплям 0,01 М раствор NaOH до появления оранжевой окраски. Оставляют на 20 мин. Затем встряхивают содержимое пробирки.

На предметное стекло с помощью пипетки наносят каплю окрашенной суспензии клеток. Накрывают покровным стеклом. Помещают препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива. Находят поле зрения, в котором преимущественно представлены одиночные клетки и клеточные группы. Подсчитывают количество окрашенных в красный цвет и неокрашенных клеток и клеточных групп. Аналогичную процедуру повторяют еще для 2–5 полей зрения микроскопа. Результаты суммируют. Общее количество подсчитанных объектов должно быть не менее 100. Определяют отношение окрашенных клеток к общему количеству клеток в процентах.

Сравнивают результаты, полученные для суспензионных культур, находящихся на разных стадиях ростового цикла, формулируют вывод о различиях в степени жизнеспособности суспензий клеток в зависимости от продолжительности культивирования.

**Задание 3.** Провести определение жизнеспособности клеток суспензионных культур с помощью Эванса синего.

Пипеткой с обрезанным «носиком» стерильно отбирают небольшое количество суспензии. Помещают каплю отобранной суспензионной культуры на предметное стекло, рядом с помощью капилляра наносят краситель (объем красителя должен быть в 8–10 раз меньше объема суспензии). Капли смешивают, накрывают покровным стеклом, излишки жидкости убирают фильтровальной бумагой. Помещают препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива. Через минуту подсчитывают неокрашенные и окрашенные клетки и агрегаты в трех полях зрения (просматривают не менее трех препаратов). Общее количество подсчитанных объектов должно быть не менее 100. Определяют отношение неокрашенных клеток к общему количеству клеток в процентах.

Сравнивают результаты, полученные для суспензионных культур, находящихся на разных стадиях ростового цикла, формулируют вывод о различиях в степени жизнеспособности суспензий клеток в зависимости от продолжительности культивирования.

**Задание 4.** Провести определение жизнеспособности клеток суспензионных культур с помощью тетразолиевого теста.

С помощью автоматического дозатора, снабженного наконечником с обрезанным «носиком», стерильно отбирают 5 мл суспензионной культуры. Клетки отделяют от питательной среды с помощью бумажного фильтра. Помещают в эппендорф 0,5 г сырого веса клеток. Добавляют 1 мл 0,5 % раствора ТТХ в 0,5 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , помещают в термостат на 1–2 ч. После окончания инкубации проводят извлечение из клеток образовавшегося трифенилформазана, окрашенного в красный цвет. Для этого суспензию центрифугируют при 15 000 об/мин, надосадочную жидкость сливают. Добавляют к клеткам 1 мл этанола, содержимое эппендорфов интенсивно встряхивают. Переносят на водяную баню, нагревают в течение 20 мин. Проводят повторное центрифугирование. Надосадочную жидкость переливают в пробирку, добавляют 3 мл этанола. Проводят измерение оптической плотности полученного раствора на спектрофотометре при длине волны 485 нм. В качестве контроля используют этанол. Полученные результаты вносят в табл. 15.

Таблица 15

**Дегидрогеназная активность клеток суспензионных культур**

Объект	Масса клеток, г	Продолжительность инкубации, ч	Оптическая плотность ( $D_{485}$ )	$\Delta D_{485}/\text{г сырого веса} \cdot \text{ч}$

Рассчитывают величину  $\Delta D_{485}/\text{г сырого веса} \cdot \text{ч}$  (восстановление ТТХ).

Сравнивают данные, полученные для разных объектов либо для суспензионных культур, находящихся на разных стадиях ростового цикла, формулируют выводы.

**Контрольные вопросы**

1. Какие подходы используют для определения жизнеспособности растительных клеток?
2. Перечислите типы прижизненных красителей, приведите примеры.
3. Какими свойствами характеризуется нейтральный красный в кислой и щелочной средах?
4. На чем основан метод определения жизнеспособности клеток с помощью нейтрального красного?
5. В чем заключается принцип метода определения жизнеспособности клеток с помощью Эванса синего?

6. Опишите принцип метода определения жизнеспособности клеток на основе использования флуоресцеиндиацетата.

7. На чем основан тетразолиевый тест определения жизнеспособности клеток?

8. Почему для корректной оценки жизнеспособности клеток целесообразно использование нескольких методов?

9. Каким образом определение электропроводности инкубационной среды может свидетельствовать о жизнеспособности клеток?

## **Лабораторная работа № 12**

### **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕПЕНИ АГРЕГИРОВАННОСТИ И ПЛОТНОСТИ СУСПЕНЗИОННЫХ КУЛЬТУР**

Суспензионные культуры состоят из одиночных клеток, клеточных групп (2–10 клеток) и многоклеточных агрегатов. Качество суспензии зависит от соотношения одиночных клеток и агрегатов. В зависимости от степени агрегированности суспензионные культуры делятся:

❖ на *слабоагрегированные* (состоят из одиночных клеток – 40 % и клеточных групп – 60 %);

❖ *среднеагрегированные* (состоят из одиночных клеток – 40 %, клеточных групп – 40 % и крупных агрегатов – 20 %);

❖ *высокоагрегированные* (состоят из клеточных групп – 40 % и крупных агрегатов – 60 %).

Для биотехнологического использования наиболее пригодны однородные суспензионные культуры, состоящие из морфологически выравненных клеток, агрегированных в мелкие группы, включающие не более 10 клеток.

В попытке получить суспензионные культуры, проявляющие высокий уровень клеточной диссоциации, чаще всего прибегают к контролю составу питательной среды. На клеточное разделение значительное влияние оказывают уровень стимуляторов роста в питательной среде и соотношение ауксинов и цитокининов. Ауксины, как правило, оказывают положительное влияние на процессы дезагрегации клеток, а цитокинины, напротив, тормозят их. Следовательно, повышая концентрацию ауксинов и снижая уровень цитокининов можно регулировать процентное содержание мелких и крупных агрегатов в суспензионной культуре. Степень агрегированности суспензии зависит от концентрации и природы источника углеводов в питательной среде. Повышение содержания сахарозы, в частности, способствует формированию клеточных агрегатов. Для снижения степени агрегирован-

ности суспензионной культуры можно использовать низкие концентрации пектолитических и целлюлолитических ферментов. Еще одним фактором, оказывающим влияние на степень агрегированности суспензионных культур, является скорость перемешивания.

Уровень клеточной агрегации изменяется в течение ростового цикла культуры. В период наиболее быстрого деления клеток (экспоненциальная фаза) повышается доля клеточных агрегатов вследствие минимального разделения пролиферирующих клеток. При переходе в стационарную фазу по мере снижения скорости клеточных делений и активизации роста клеток растяжением степень агрегированности уменьшается. В связи с этим использование инокулюма из суспензионной культуры, переходящей в стационарную фазу роста, дает более диссоциированную суспензию. Напротив, частые субкультивирования, связанные с возобновлением клеточных делений, приводят к увеличению уровня агрегированности клеток.

Степень агрегированности суспензионной культуры определяют как соотношение числа разных типов агрегатов, выраженное в процентах. Для этого подсчитывают одиночные клетки, клеточные группы и агрегаты в нескольких полях зрения на временных препаратах под малым увеличением микроскопа (не менее 100 культивируемых единиц на один препарат в трех повторностях).

Плотность суспензионной культуры – это количество клеток в 1 мл питательной среды. По плотности суспензии можно охарактеризовать состояние клеточной популяции. Оптимальная плотность клеток в суспензии, обеспечивающая хороший рост, составляет  $10^5$ – $10^6$  в 1 мл среды.

Рост суспензии в значительной степени зависит от исходной клеточной плотности инокулюма. Для каждой культуры существует минимальный инокулюм (минимальная эффективная плотность культуры), при снижении которого значительно удлиняется лаг-фаза либо вовсе не наблюдается роста. По плотности суспензионной культуры можно определить время для субкультивирования. Плотность суспензии за 2–3 нед. культивирования может возрастать в 20 раз.

Определение плотности суспензии проводят путем подсчета клеток. Объем выборки должен составлять не менее 1000 клеток. Для этого используют счетную камеру Фукса – Розенталя (гемоцитомер). Поскольку растительные клетки имеют крупные размеры, то использование камеры Горяева, предназначенной для подсчета эритроцитов, не представляется возможным.

Перед подсчетом числа клеток необходимо провести дезинтеграцию клеточных агрегатов с помощью раствора хромовой кислоты либо ферментов (пектиназа и целлюлаза). Использование хромовой кислоты позволяет обеспечить более быструю дезинтеграцию (мацерацию) агрегатов, однако требует подбора оптимального времени обработки суспензии.

**Цель работы:** определить степень агрегированности и плотность суспензионных культур.

**Материалы и оборудование:** суспензионные культуры, различающиеся по физиологическому состоянию (в лог-фазе ростового цикла, стационарной фазе), 20 % раствор хромовой кислоты (20 г хромового ангидрида  $\text{CrO}_3$  растворяют в 80 мл дистиллированной воды), 10 % раствор целлюлазы, 5 % раствор пектиназы, камера Фукса – Розенталя, предметные и покровные стекла, пробирки, пипетки, термостат, эппендорфы, химические пробирки, штатив, воронки, бумажные фильтры, автоматический дозатор на 100–1000 мкл, наконечники на 100–1000 мкл, микроскоп.

## Ход работы

**Задание 1.** Провести определение степени агрегированности суспензионной культуры.

Отбирают пробу суспензионной культуры, используя автоматический дозатор с наконечником с обрезанным «носиком» (это необходимо для попадания в пробу всех клеточных агрегатов, размер которых для сильно-агрегированных суспензий может достигать 2–3 мм). При отборе пробы необходимо вращать колбу, чтобы не происходило осаждение клеток, поскольку от этого в значительной степени зависят точность и воспроизводимость результатов.

На предметное стекло с помощью пипетки наносят каплю суспензии клеток. Накрывают покровным стеклом. Помещают препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива. Подсчитывают количество одиночных клеток, клеточных групп и крупных агрегатов. Общее количество подсчитанных культивируемых единиц должно быть не менее 20 для одного поля зрения микроскопа. Аналогичную процедуру повторяют еще 4 раза.

Результаты заносят в табл. 16.

Таблица 16

**Анализ степени агрегированности суспензионной культуры**

Культивируемые единицы	Поле зрения микроскопа					Количество, ед.	Доля, %
	1	2	3	4	5		
Одиночные клетки						$X_1$	
Клеточные группы (2–10 клеток)						$X_2$	
Крупные агрегаты						$X_3$	
Всего						$X_4$	

На основании полученных данных рассчитывают процентное соотношение отдельных фракций (одиночные клетки, клеточные группы, крупные агрегаты). Например, долю одиночных клеток (%) рассчитывают по формуле

$$OK = (X_1/X_4) \cdot 100.$$

Определяют тип суспензионной культуры в зависимости от степени агрегированности.

**Задание 2.** Провести определение плотности суспензионной культуры.

Используя автоматический дозатор с наконечником и обрезанным «носиком», отбирают пробу суспензионной культуры объемом 1 мл, переносят в флакон на 10 мл и добавляют 4 мл 20 % раствора хромовой кислоты либо 0,5 мл 10 % целлюлазы и 0,5 мл 5 % пектиназы. Флакон закрывают пробкой и помещают в термостат с температурой 60 °С на время от 5 до 30 мин в зависимости от типа суспензии. После окончания инкубации суспензию интенсивно встряхивают либо шприцуют (набирают и выпускают из шприца объемом 5 мл с иглой большого диаметра) 3–4 раза.

Заполняют камеру Фукса – Розенталя мацерированной суспензией с помощью стеклянного капилляра диаметром не менее 1 мм. Производят подсчет числа клеток в пяти больших квадратах (каждый большой квадрат состоит из четырех маленьких квадратов). Получают количество клеток, обозначаемое  $N$ . Подсчет проводят не менее чем в 6 камерах.

Производят определение плотности культуры по формуле

$$C = 1000 \cdot k \cdot N_{\text{ср}},$$

где  $k$  – степень разведения исходной суспензии (для данного варианта  $k = 5$ );  $N_{\text{ср}}$  – среднее значение  $N$  (при подсчете 6 камер  $N_{\text{ср}} = \Sigma N/6$ ).

Сравнивают данные, полученные для суспензионных культур, находящихся на разных стадиях ростового цикла.

## Контрольные вопросы

1. Охарактеризуйте типы суспензионных культур растительных клеток в зависимости от степени агрегированности.
2. Какие факторы оказывают влияние на степень агрегированности суспензионной культуры?
3. Что такое «плотность» суспензионной культуры?
4. Как начальная плотность суспензионной культуры оказывает влияние на ее ростовые характеристики?
5. Перечислите подходы, используемые для мацерации суспензионной культуры при определении ее плотности.

## **Лабораторная работа № 13**

# **ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВТОРИЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ ФЕНОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ В КУЛЬТУРАХ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК**

Фенольные соединения – вещества ароматической природы, которые содержат одну или несколько гидроксильных групп, связанных с атомами углерода ароматического ядра. Среди продуктов вторичного метаболизма фенольные соединения наиболее распространены и свойственны каждому растению и практически каждой растительной клетке. Характеризуются разнообразием видов биологической активности. В медицине препараты на основе фенольных соединений используют в качестве антимикробных, противовоспалительных, желчегонных, диуретических, гипотензивных, тонизирующих средств и др.

В качестве альтернативы традиционно используемому лекарственному фенолсодержащему сырью могут выступать культуры растительных клеток. К факторам, способным вызвать повышение синтеза вторичных метаболитов в культивируемых *in vitro* клетках и тканях растений, относятся гормональные эффекторы (ауксины, цитокинины и др.), элементы питания (источники углерода, азота, фосфора и др.), физические факторы (свет, температура и др.), добавление предшественников, обработка элиситорами, индуцированный мутагенез и т. д. Благодаря правильно разработанной стратегии получения высокопродуктивных линий к настоящему времени созданы культуры клеток и тканей, которые по уровню содержания вторичных метаболитов не уступают природному лекарственному сырью.

Оптимизация питательной среды выступает ключевым моментом в повышении выхода целевого продукта. Продукционные питательные среды, на которых культивируемые клетки синтезируют значительное количество вторичных метаболитов, как правило, существенно отличаются по своему составу и содержанию отдельных компонентов от стандартных сред, оптимальных для накопления биомассы. В связи с этим широкое распространение получило двухстадийное культивирование. На первом этапе создают оптимальные условия для накопления биомассы культуры, на втором – пересаживают культуру на продукционную питательную среду, что приводит к замедлению роста и усилению синтеза вторичных метаболитов.

Один из методов количественного определения содержания фенольных соединений основан на использовании реакции их комплексообразования с реактивом Фолина – Дениса. Реактив состоит из солей фосфорно-вольфрамовой и фосфорно-молибденовой кислот. В щелочной среде эти соли при

взаимодействии с фенолами и полифенолами восстанавливаются с образованием окрашенных в синий цвет комплексов, содержание которых оценивается спектрофотометрически.

Работа включает ряд этапов: 1) получение экстракта; 2) проведение качественной реакции на фенольные соединения и спектрофотометрический анализ проб; 3) построение калибровочной кривой для расчета содержания фенольных соединений; 4) расчет содержания фенольных соединений на единицу сухого веса культуры.

**Цель работы:** провести количественное определение содержания суммы фенольных соединений в культурах растительных клеток при варьировании параметров культивирования.

**Материалы и оборудование:** каллусные культуры, суспензионные культуры клеток, реактив Фолина – Дениса, 20 % раствор  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , феруловая кислота, 70 % этанол, дистиллированная вода, ступки, пестики, химические пробирки, штатив, воронки, бумажные фильтры, автоматический дозатор на 1–10 мл, наконечники на 1–10 мл, весы, водяная баня, обратный холодильник, шейкер ротационного типа, спектрофотометр.

## Ход работы

**Задание.** Провести количественное определение содержания фенольных соединений в культурах клеток и тканей лекарственных растений.

Для получения экстракта берут навеску 0,2 г сухой массы клеток каллусной либо суспензионной культуры, переносят в фарфоровую ступку, тщательно растирают. Добавляют 10 мл 70 % этанола и снова растирают, гомогенат переносят в коническую колбу со шлифом для экстракции. В ступку добавляют еще 10 мл этанола, споласкивают стенки и количественно переносят в колбу. Присоединяют колбу к обратному холодильнику. С помощью водяной бани производят нагревание содержимого колбы. Отмечают время начала экстракции с момента закипания экстрагента. Через 45 мин отсоединяют колбу от обратного холодильника. Фильтруют полученный экстракт через бумажный фильтр, измеряют его объем и используют для количественного определения содержания фенольных соединений.

На следующем этапе проводят качественную реакцию на фенольные соединения. В химическую пробирку последовательно вносят:

1 мл экстракта;

1 мл реактива Фолина – Дениса;

7 мл воды;

1 мл 20 % раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (добавляют через 3 мин после внесения предыдущего реагента).

В качестве контроля используется реакционная смесь, которая включает:

- 1 мл 70 % этанола;
- 1 мл реактива Фолина – Дениса;
- 7 мл воды;
- 1 мл 20 % раствора  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (добавляют через 3 мин после внесения предыдущего реагента).

Все пробирки оставляют на 1 ч (помещают в темное место). Затем проводят измерение оптической плотности на спектрофотометре в кювете толщиной слоя 10 мм при длине волны 720 нм.

Для построения калибровочной кривой на основе маточного раствора феруловой кислоты (0,1 мг/мл) готовят серию растворов разной концентрации по 5 мл в соответствии с табл. 17.

Таблица 17

**Приготовление рабочих концентраций феруловой кислоты**

Объем, мл	Концентрация, мг/мл					
	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07
Феруловая кислота, 0,1 мг/мл	1	1,5	2	2,5	3	3,5
70 % этанол	4	3,5	3	2,5	2	1,5

Для каждого варианта проводят качественную реакцию, как описано выше. Все пробирки оставляют на 1 ч (помещают в темное место). Проводят измерение оптической плотности при длине волны 720 нм. По полученным данным строят график зависимости оптической плотности от концентрации феруловой кислоты, добавляют линию тренда, отображают на диаграмме уравнение (рис. 7) и определяют калибровочный коэффициент.

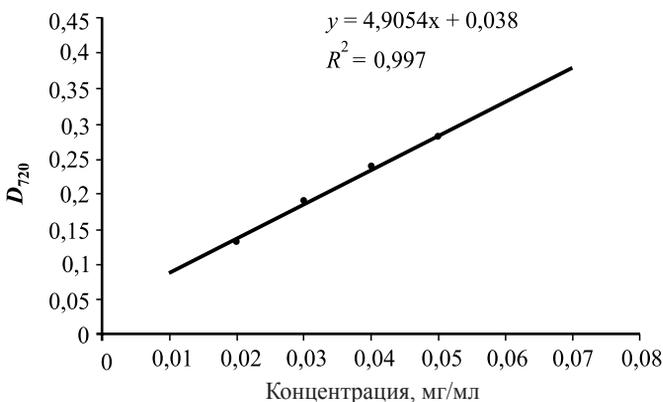


Рис. 7. Примерный вариант построения калибровочной прямой

Проводят расчет содержания фенольных соединений по формуле

$$C = (D_{720} \cdot V) / (a \cdot m),$$

где  $C$  – содержание фенольных соединений в пересчете на феруловую кислоту, мг/г<sub>сухого</sub>;  $D_{720}$  – оптическая плотность пробы при длине волны 720 нм;  $V$  – общий объем экстракта, мл;  $a$  – калибровочный коэффициент, полученный из графика концентрационной зависимости оптической плотности комплекса феруловой кислоты с реактивом Фолина – Дениса при 720 нм;  $m$  – масса навески, г.

По результатам работы формулируют вывод о влиянии условий культивирования на уровни накопления фенольных соединений в исследуемых культурах.

## Контрольные вопросы

1. Какими видами биологической активности характеризуются фенольные соединения?
2. На чем основан принцип метода определения суммы растворимых фенольных соединений с реактивом Фолина – Дениса?
3. Какие факторы оказывают влияние на уровни накопления вторичных метаболитов в культурах растительных клеток и тканей?
4. По каким параметрам может осуществляться оптимизация питательной среды для повышения продукции вторичных метаболитов культурами растительных клеток?
5. В чем суть двустадийного культивирования при использовании культур растительных клеток в качестве продуцентов вторичных метаболитов?

## Раздел 4

# РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

В основе метода культуры клеток и тканей растений лежит уникальное свойство растительной клетки – тотипотентность. К настоящему времени практически любой вид растений может быть регенерирован из культуры клеток с помощью специальных методических подходов. Термин «регенерант» используется для обозначения стерильных растений с развитой системой корней и побегов, сформированных *in vitro*.

Знания в области регенерации растений крайне важны для реализации большого числа фитобиотехнологий: генетической трансформации растений, соматической гибридизации, экспериментальной гаплоидии, промышленного клонирования с целью быстрого размножения трудноразмножаемых видов растений, получения безвирусного посадочного материала с помощью культуры меристем и др.

Под морфогенезом понимают образование и дифференциацию органов многоклеточного организма. Морфогенетический потенциал растительной клетки в системе *in vitro* проявляется в более широком диапазоне, чем в природных условиях. Типы морфогенеза могут быть классифицированы следующим образом:

- ❖ эмбриогенез – формирование растений-регенерантов в стерильной культуре зиготических зародышей, изолированных из семян либо семяпочек;

- ❖ соматический эмбриогенез (эмбриоидогенез) – процесс развития эмбриоидов (биполярных структур) из соматических клеток;

- ❖ органогенез – процесс формирования органов (монополярных структур), например побега, корня. Органогенез подразделяется на *геммогенез* – образование почек и *ризогенез* – образование корней. При вегетативном

геммогенезе развиваются вегетативные почки, при репродуктивном (генеративном, флоральном) – цветочные почки. Укоренение полученных побегов за счет образования адвентивных корней представляет собой процесс *гемморизогенеза*. Образование побегов из корней – достаточно редкое явление.

Кроме того, различают прямой и непрямой пути морфогенеза *in vitro*. Прямой морфогенез – путь, при котором развитие корней, стеблевых и цветочных почек происходит непосредственно из клеток экспланта без образования каллуса. Непрямой морфогенез – путь формирования морфологических структур, приводящий к образованию корней, стеблевых и цветочных почек в каллусной культуре. Рассмотренные варианты морфогенеза представлены на рис. 8.

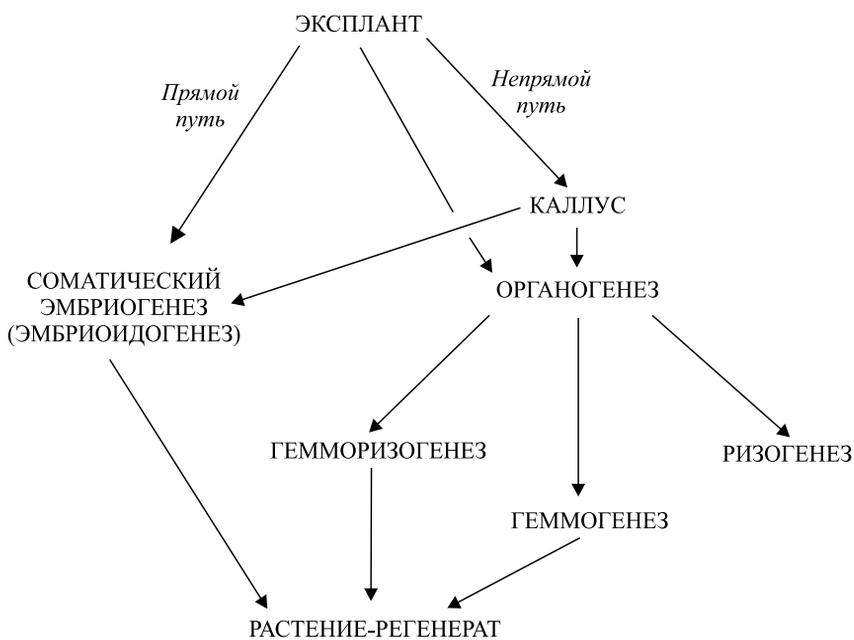


Рис. 8. Пути морфогенеза *in vitro*

Получение растений-регенерантов может осуществляться за счет эмбриогенеза, эмбриоидогенеза и гемморизогенеза. Реализация конкретного пути регенерации растений в культуре *in vitro* детерминирована, т. е. в значительной степени определяется генетическими и физиологическими факторами, а также условиями выращивания. Например, у одних растений обнаруживаются все три пути регенерации, у других – только один путь.

## **Лабораторная работа № 14**

### **ВЛИЯНИЕ ФИТОГОРМОНОВ НА ТИП МОРФОГЕНЕЗА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ**

Индуктировать морфогенез можно с помощью различных факторов, и в первую очередь – за счет изменения соотношения в питательной среде фитогормонов ауксиновой и цитокининовой природы. В 1955 г. Ф. Скуг и К. Миллер предложили гипотезу гормональной регуляции в культуре клеток и тканей, которая сейчас известна как *правило Скуга – Миллера*: если концентрация ауксинов в питательной среде значительно превосходит концентрацию цитокининов, то отмечается формирование корней (ризогенез); если концентрация ауксинов намного меньше концентрации цитокининов, то образуются побеги (геммогенез); если концентрации ауксинов и цитокининов в питательной среде равны или концентрация ауксинов незначительно превосходит концентрацию цитокининов, то наблюдается каллусогенез.

Гормональную регуляцию морфогенеза можно наблюдать в культуре эксплантов (прямой морфогенез) либо в каллусной культуре (непрямой морфогенез). Каллусы с высоким морфогенетическим потенциалом обычно матовые, компактные, структурированные, имеют участки, которые представляют собой зоны морфогенеза. Впоследствии из них формируются адвентивные побеги или растения-регенеранты. Рыхлые каллусы либо совсем не способны к органогенезу, либо формируют только корни. Появление корней свидетельствует о сдвиге гормонального баланса в сторону ауксинов, что препятствует образованию побегов.

**Цель работы:** изучить влияние разных соотношений ауксинов и цитокининов в питательной среде на направление морфогенеза в культуре асептических эксплантов и каллусов.

**Материалы и оборудование:** асептически выращенные растения, первичная и длительно пассируемая каллусная культура, стерильные чашки Петри с питательной средой MS, содержащей 3 % сахарозы, 0,05 мг/л ИУК и 3 мг/л БАП, стерильные чашки Петри с питательной средой MS, содержащей 3 % сахарозы, 3 мг/л ИУК и 0,05 мг/л БАП, 96 % и 70 % этанол, пинцет, скальпель, спиртовка, стерильная вата, парафилм, ламинар-бокс.

#### **Ход работы**

**Задание.** Индуцировать различные пути морфогенеза *in vitro*.

Работа проводится в асептических условиях. Производят изоляцию эксплантов из листьев асептически выращиваемых растений и переносят их на

чашки Петри с агаризованными средами MS, различающимися по содержанию ауксинов и цитокининов. Аналогичные варианты питательных сред используют для субкультивирования первичной и длительно пассируемой каллусных тканей. Чашки Петри запечатывают, подписывают и помещают в термостат, в котором поддерживается температура 25 °С, инкубируют в течение 4–5 нед. По истечении указанного времени проводят анализ морфогенетических реакций, обусловленных разным соотношением гормонов с ауксиновой и цитокининовой активностью в питательной среде.

Результаты оформляют в виде табл. 18.

Таблица 18

**Влияние ауксинов и цитокининов на тип морфогенеза *in vitro***

Концентрация фитогормонов, мг/л		Тип морфогенеза
ИУК	БАП	
0,05	3,0	
3,0	0,05	

Формулируют выводы о влиянии фитогормонов на дифференциацию органов растений в культуре *in vitro*, а также влиянии продолжительности культивирования каллусных тканей на их способность к морфогенезу.

**Контрольные вопросы**

1. Назовите основные типы морфогенеза в культуре клеток растений.
2. Какие факторы оказывают влияние на направление морфогенеза в культуре клеток и тканей растений?
3. Перечислите пути регенерации растений в культуре *in vitro*.
4. Каково значение процессов стеблевого органогенеза и ризогенеза для регенерации растений *in vitro*?

**Лабораторная работа № 15**  
**МИКРОЧЕРЕНКОВАНИЕ ПОБЕГОВ**  
**И ИНДУКЦИЯ ИХ УКОРЕНЕНИЯ**

Микрочлониальное размножение – это использование техники *in vitro* для быстрого получения неполовым путем растений, идентичных исходному. В основе технологии лежит высокая способность растительных объек-

тов к регенерации. По своей сути микроклональное размножение идентично вегетативному размножению растений. Его основные отличия заключаются в том, что клонирование протекает в стерильных условиях, а для размножения могут быть использованы экспланты предельно малых размеров (менее 1 см).

Процесс микроклонального размножения включает 4 этапа: 1 – выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры; 2 – собственно размножение, приводящее к получению максимального количества микропобегов; 3 – укоренение размноженных побегов; 4 – адаптация регенерантов к почвенным условиям произрастания и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Выделяют несколько способов микроклонального размножения растений:

- ❖ индукция развития уже существующих в растении меристем;
- ❖ индукция развития адвентивных почек непосредственно из ткани экспланта;
- ❖ индукция развития адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной культурах;
- ❖ индукция соматического эмбриогенеза.

Первый способ микроклонального размножения основан на подавлении апикального доминирования, что приводит к активации развития пазушных почек. Из пазушных почек на питательных средах образуются побеги, которые в дальнейшем подвергаются черенкованию. Микрочеренкование является одним из наиболее простых и эффективных способов микроклонального размножения растений. Побеги, сформировавшие 5–6 листочков, в стерильных условиях извлекают из культуральных сосудов и разрезают на черенки (отрезок стебля с листом и пазушной почкой) длиной 1,0–1,5 см. Черенки высаживают на безгормональные питательные среды либо среды с высоким содержанием цитокининов. В первом случае из каждой пазушной почки формируется новый побег, во втором – образуется конгломерат побегов. Полученные побеги легко отделяются друг от друга, их можно либо укоренить, либо использовать для дальнейшего микрочеренкования.

Обычно черенки культивируют при температуре 24–25 °С, освещенности 5000–6000 лк и продолжительности фотопериода 16 ч. Субкультивирование побегов осуществляется в среднем с интервалом в 14–21 сут.

Для укоренения побегов, образовавшихся при микрочеренковании, их необходимо пересадить на питательную среду с обедненным составом минеральных солей (среда Уайта, среда MS, разбавленная в 2–4 раза), уменьшенной до 0,5–1,0 % концентрацией сахарозы. При этом полностью исключают цитокинины, оставляя один лишь ауксин (ИМК, ИУК, НУК).

Существуют два основных варианта использования ауксинов для укоренения побегов:

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

❖ культивирование микропобегов в течение 3–4 нед. на питательной среде, содержащей ауксин в невысокой концентрации (1–5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта).

Укоренение черенков можно проводить в условиях гидропоники.

На заключительном этапе растения с 2–5 листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно извлекают из культуральных сосудов. При необходимости корни отмывают от остатков агара и высаживают в предварительно простерилизованный почвенный субстрат.

**Цель работы:** освоить технику микрочеренкования побегов и индуцировать их укоренение *in vitro*.

**Материалы и оборудование:** асептически выращиваемые растения, ламинар-бокс, пробирки с безгормональной агаризованной питательной средой MS, содержащей 3 % сахарозы, пробирки с агаризованной питательной средой MS, содержащей 3 % сахарозы и 3 мг/л БАП, культуральные сосуды с агаризованной средой MS, содержащей 1 мг/л ауксина (ИМК, НУК либо ИУК), 70 % и 96 % этанол, скальпели, пинцеты, спиртовка, стерильные чашки Петри, стерильная вата, алюминиевая фольга, ламинар-бокс, световая культуральная комната.

## Ход работы

**Задание 1.** Провести микрочеренкование побегов асептически выращиваемых растений.

Проводят подготовку ламинар-бокса и инструментов к работе. В условиях ламинар-бокса стерильно извлекают проростки из культуральных сосудов и помещают в чашки Петри. С помощью простерилизованного скальпеля разделяют побеги на микрочеренки длиной 1,0–1,5 см. Часть стебля над листом должна быть в 2–3 раза меньше, чем часть ниже листа. Стерильным пинцетом переносят каждый черенок в отдельный культуральный сосуд, заглубив нижнюю часть стебля в среду примерно на 0,3–0,5 см. Используют два варианта сред: 1 – безгормональная питательная среда MS; 2 – среда MS, содержащая БАП. Культуральные сосуды стерильно закрывают крышками из фольги, переносят в световую комнату (фитостат).

Через 3–4 нед. анализируют результаты. Отмечают количество микропобегов и сформированных междоузлий на безгормональной питательной среде MS и среде, содержащей БАП. Измеряют длину междоузлий. На основании анализа данных для пяти культуральных сосудов каждого варианта находят средние значения и вносят результаты эксперимента в табл. 19.

Таблица 19

#### Эффективность микрочеренкования побегов

Вариант питательной среды	Среднее количество микропобегов, шт.	Среднее количество междоузлий, шт.	Средняя длина междоузлий, мм

Формулируют вывод о степени пролиферации почек на безгормональной питательной среде и среде с цитокинином.

#### **Задание 2.** Провести укоренение микропобегов.

Проводят подготовку ламинар-бокса и инструментов к работе. В условиях ламинар-бокса побеги, состоящие из 3–5 междоузлий, с помощью стерильного пинцета извлекают из культуральных сосудов и переносят в сосуды с агаризованной средой MS, содержащей 1 мг/л ауксина (ИМК, НУК либо ИУК). Сосуды стерильно закрывают крышками из фольги, помещают в культуральную комнату с освещением 5000 лк, температурой  $25 \pm 2$  °С.

Результаты укоренения оценивают через 2–4 нед. Отмечают количество сформированных адвентивных корней, их длину. На основании анализа данных для пяти культуральных сосудов каждого варианта находят средние значения и заносят результаты эксперимента в табл. 20.

Таблица 20

#### Эффективность укоренения микропобегов

Ауксин	Среднее количество корней, шт.	Средняя длина корней, мм

Формулируют выводы об эффективности разных ауксинов для укоренения микропобегов.

### Контрольные вопросы

1. Перечислите способы микроклонального размножения растений.
2. На чем основан метод активации уже существующих меристем?
3. Какие способы микроклонального размножения растений представляют собой варианты прямого морфогенеза *in vitro*?

4. Каким образом изменяют состав питательной среды на этапе укоренения микропобегов?
5. Какие ауксины используют для укоренения побегов?
6. При каком способе микроклонального размножения отсутствует необходимость в проведении процедуры укоренения?
7. Охарактеризуйте способы укоренения микропобегов.

## **Лабораторная работа № 16** **СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ** **В КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ**

Соматический или неполовой эмбриогенез представляет собой процесс формирования зародышеподобных структур из соматических клеток. При развитии соматических эмбриоидов наблюдаются стадии, аналогичные стадиям при зиготическом эмбриогенезе: глобулы, сердца, торпедо и молодого проростка. Основное отличие образования зародышей *in vitro* от *in vivo* заключается в том, что соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка. При соматическом эмбриогенезе в отличие от органогенеза образуются биполярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апексов стебля и корня.

Соматический эмбриогенез можно наблюдать непосредственно в тканях экспланта (*прямой соматический эмбриогенез*), а также в каллусной либо суспензионной культуре (*непрямой соматический эмбриогенез*). Формирование зародышей из соматических клеток в условиях *in vitro* впервые наблюдали в 1958 г. в суспензионной культуре клеток моркови Ф. Стюард с сотрудниками. Этот процесс наглядно демонстрирует тотипотентность растительной клетки.

Прямой соматический эмбриогенез происходит у цитрусовых, у которых ткани нуцеллуса дают начало многочисленным соматическим (нуцеллярным) зародышам. Данное явление получило название *полиэмбрионии*. Соматический эмбриогенез в культурах клеток моркови представляет собой классический пример регенерации растений по типу непрямого соматического эмбриогенеза. У моркови практически любая часть растения (корень, черешок листа, лист, стебель или зиготический зародыш) продуцирует эмбриогенный каллус. Из свежеизолированных эксплантов моркови, а также линий каллусных клеток и суспензионных культур (оптимальный возраст культуры для индукции соматического эмбриогенеза 15–20 нед.) путем ма-

нипуляций со средой культивирования можно индуцировать образование соматических эмбриоидов. При продолжительном культивировании *in vitro* морфогенетическая способность клеток обычно снижается. В культуре клеток моркови способность к соматическому эмбриогенезу, как правило, полностью утрачивается через 30–40 нед. после изолирования экспланта.

Формирование соматических эмбриоидов в культуре *in vitro* происходит в два этапа. На первом этапе из одиночных клеток в результате многочисленных делений формируются компактные проэмбриогенные комплексы, которые на втором этапе дают начало одному или нескольким эмбриоидам. Образование проэмбриогенных комплексов происходит в присутствии ауксинов, в частности на средах с 2,4-Д. Для формирования эмбриоидов на втором этапе необходимо уменьшить концентрацию ауксина или полностью исключить его из состава питательной среды. Таким образом, потребность в гормонах на каждом из этапов эмбриогенеза различна.

Соматический эмбриогенез как метод микрочлонального размножения имеет свои преимущества, связанные с отсутствием необходимости в подборе специальных условий укоренения и адаптации пробирочных растений, что сокращает продолжительность процесса клонирования растений. На основе этого способа регенерации растений была создана техника искусственных семян. Соматические эмбриоиды, в отличие от зиготических, не имеют эндосперма и не могут обеспечить себя питательными веществами, поэтому предлагается заключать эмбриоиды в капсулу из желатина с элементами питательной среды и повышенным содержанием сахарозы. Искусственные семена в первую очередь перспективно использовать для гибридных овощных культур и для размножения генетически трансформированного материала.

**Цель работы:** индуцировать соматический эмбриогенез в каллусной культуре.

**Материалы и оборудование:** каллусная культура моркови, чашки Петри с безгормональной питательной средой MS, 70 % и 96 % этанол, скальпель, пинцет, спиртовка, стерильные чашки Петри, стерильная вата, парафилм, ламинар-бокс, световая культуральная комната.

## Ход работы

**Задание.** Получить соматические эмбриоиды в каллусной культуре моркови.

Проводят подготовку ламинар-бокса и инструментов к работе. В качестве объекта используют каллусную культуру моркови в возрасте 15–20 нед.,

которая инкубировалась на питательной среде MS, включающей 2,4-Д. В условиях ламинар-бокса с помощью простерилизованного скальпеля отделяют транспланты и стерильно переносят в чашки Петри с питательной средой MS, не содержащей гормоны. Чашки запечатывают, подписывают и помещают в световую камеру с периодичностью освещения 16 ч свет/8 ч темнота. Каждую неделю проводят наблюдения за поверхностью каллусов и отмечают формирование окрашенных в зеленый цвет зародышеподобных структур. После того как эмбриониды достигнут размеров не менее 2 мм, их можно аккуратно отделить от каллусной ткани и пересадить в колбы на агаризованную безгормональную среду MS для формирования растений-регенерантов.

### **Контрольные вопросы**

1. В чем состоит отличие органогенеза от соматического эмбриогенеза?
2. Какие этапы включает соматический эмбриогенез? Какие условия необходимо создать на каждом из этапов?
3. В чем суть прямого и непрямого соматического эмбриогенеза? Приведите примеры.
4. Каким образом возраст культуры оказывает влияние на эффективность соматического эмбриогенеза?
5. В чем преимущество соматического эмбриогенеза по сравнению с другими способами микрклонального размножения растений?
6. Что такое искусственные семена?

## Раздел 5

# ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ

В качестве отдельной отрасли биотехнологии выступает использование иммобилизованных растительных клеток для продукции ценных вторичных метаболитов на основе реакций биосинтеза либо биотрансформации. С помощью методов иммобилизации может быть решен ряд проблем, связанных с получением биологически активных соединений на основе суспензионных культур растительных клеток (зачастую низкий выход целевого продукта, слабая механическая устойчивость и др.). Применение для этих целей в промышленных масштабах иммобилизованных клеток растений является гораздо более эффективным по следующим причинам:

- ❖ возможность многократного использования биомассы;
- ❖ отсутствие затрат на выделение и очистку продуктов реакции;
- ❖ более высокая активность и способность к сверхсинтезу продуктов вторичного метаболизма;
- ❖ стабильность;
- ❖ наличие защиты от микробного заражения и механического повреждения;
- ❖ возможность длительного культивирования и создания непрерывных автоматических процессов.

Перечисленные преимущества определяют значительный технологический потенциал иммобилизованных растительных клеток.

Получение иммобилизованных систем клеток растений включает следующие этапы:

- 1) выявление культуры клеток с определенными заданными свойствами, например линии клеток с высоким выходом продукта и низкой скоростью роста;

2) подбор соответствующего метода иммобилизации и условий культивирования, при котором жизнеспособность клеток и биосинтез целевого продукта поддерживались бы максимально длительное время;

3) создание условий экскреции продукта из клеток в среду культивирования при сохранении жизнеспособности культуры.

Для растительных клеток наиболее подходящим из методов иммобилизации является включение в гель. Начальная концентрация иммобилизованных растительных клеток в препарате может варьировать в широких пределах (от 20 до 50 % по весу и выше). Гранулы геля с включенными клетками помещают в постоянно перемешиваемую питательную среду либо пропускают среду через иммобилизованный объект, заполняющий колонку. Иммобилизацию растительных клеток, культивируемых *in vitro*, проводят в стерильных условиях, поскольку заражение быстрорастущими клетками микроорганизмов представляет для них большую опасность. В связи с этим используемый для иммобилизации носитель должен выдерживать соответствующую обработку, например автоклавирование.

## **Лабораторная работа № 17**

### **ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ В ГРАНУЛЫ Са-АЛЬГИНАТНОГО ГЕЛЯ**

Для иммобилизации клеток широко используют альгинатные гели. Альгиновая кислота и ее соли встречаются в морских бурых водорослях (*Phaeophyta*), в которых они составляют основную часть полисахаридов, достигая 40 % сухой массы, а также в красных водорослях семейства *Corallinaceae*. Бактерии родов *Azotobacter* и *Pseudomonas* также способны продуцировать альгиновые кислоты.

Альгиновая кислота представляет собой гетерополимер и состоит из остатков  $\beta$ -D-маннуриновой и  $\alpha$ -L-гулуриновой кислот (рис. 9, а), соединенных (1–4)-связями (рис. 9, б). Повторяющиеся мономеры  $\alpha$ -L-гулуриновой кислоты образуют G-блоки,  $\beta$ -D-маннуриновой кислоты – M-блоки (рис. 9, в).

Альгиновые кислоты различаются молекулярной массой (100–500 кДа), процентным соотношением  $\beta$ -D-маннуриновой и  $\alpha$ -L-гулуриновой кислот (M- и G-блоки) и распределением мономерных звеньев вдоль цепи полимера. Альгинат, содержащий остатки только  $\beta$ -D-маннуриновой кислоты, остается в растворе в виде клубков, а введение в макромолекулу остатков  $\alpha$ -L-гулуриновой кислоты приводит к формированию сетчатой структуры.

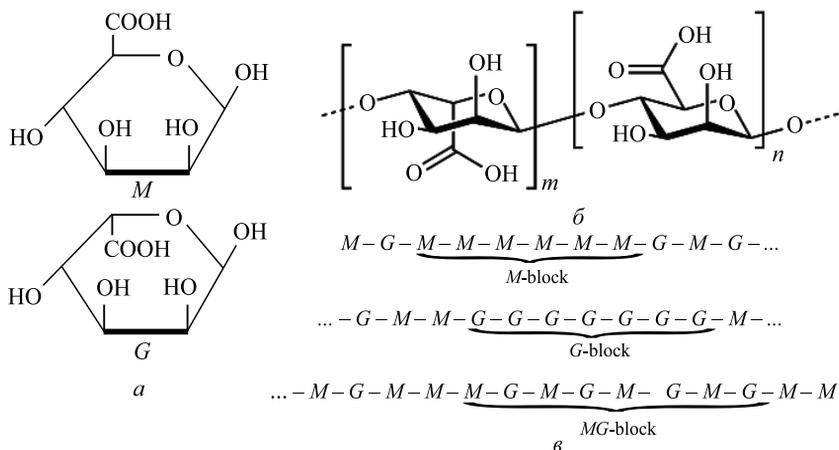


Рис. 9. Химическая структура  $\beta$ -D-маннуровой (M),  $\alpha$ -L-гулуровой (G) кислот (a), альгиновой кислоты (б, в)

Альгиновые кислоты содержат множество свободных гидроксильных и карбоксильных групп, распределенных вдоль основной цепи полимера, и, в отличие от нейтральных полисахаридов, имеют два типа функциональных групп, которые могут быть модифицированы. В присутствии моновалентных катионов альгинаты образуют вязкий, клейкий раствор, а в присутствии двухвалентных катионов (кальций, магний, стронций и барий) наблюдается образование плотного геля. Альгинаты могут быть монокатионными, когда в образовании геля участвуют катионы одного металла, или поликатионными – с участием нескольких металлов. В зависимости от присутствующего катиона гели носят различные названия, например Са-альгинатный гель и т. д.

Переход в состояние геля происходит за счет того, что G-блоки углеводных цепей взаимодействуют с двухвалентными катионами, например  $\text{Ca}^{2+}$  (рис. 10, а), и формируют структуры, именуемые «egg-box» («упаковка для яиц») (рис. 10, б). Альгинатный гель не образуется, если содержание  $\alpha$ -L-гулуровой кислоты меньше 20–25 %.

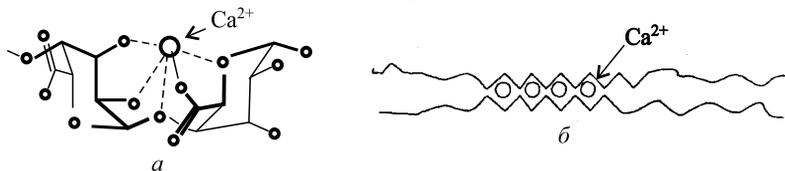


Рис. 10. Схема образования геля альгината кальция: а – связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с  $\alpha$ -L-гулуровой кислотой; б – формирование структуры «egg-box»

Физические характеристики гелевой системы зависят от химического состава альгинатов (соотношения и расположения *G*- и *M*-блоков), молекулярной массы полимеров, концентрации и типа катионов, температуры, рН. Так, гели, полученные с использованием бария или стронция, более прочные, чем гели на основе хлорида кальция.

К достоинствам Са-альгинатных гелей в качестве носителей для иммобилизации клеток относят:

- ❖ мягкие условия иммобилизации;
- ❖ полимер можно стерилизовать автоклавированием;
- ❖ обратимость процесса иммобилизации (достигается добавлением агента, связывающего кальций);
- ❖ возможность регулирования плотности сшивки геля.

Благодаря уникальным физико-химическим свойствам альгиновые кислоты и их соли нашли широкое применение не только в биотехнологии, но и в медицине, пищевой и ряде других отраслей промышленности.

**Цель работы:** освоить методику иммобилизации растительных клеток путем включения в Са-альгинатный гель на примере микроводорослей.

**Материалы и оборудование:** суспензия клеток *Chlorella*, 3 % раствор альгината натрия, 0,25 М СаСl<sub>2</sub>, дистиллированная вода, чашки Петри, пластмассовые шприцы (5 мл), химический стаканчик (50 мл), автоматический дозатор на 100–1000 мкл, наконечники на 100–1000 мкл.

## Ход работы

**Задание.** Провести иммобилизацию клеток *Chlorella* в гранулы Са-альгинатного геля.

С помощью пластмассового шприца переносят в химический стаканчик 5 мл 3 % раствора альгината натрия, а затем 0,1 мл суспензии клеток хлореллы, перемешивают. В чашку Петри наливают 30 мл раствора 0,25 М хлорида кальция. Полученную суспензию клеток микроводорослей в растворе альгината натрия набирают в пластмассовый шприц и по каплям добавляют в чашку Петри, заполненную хлоридом кальция таким образом, чтобы образовывались отдельные гранулы.

Оставляют образовавшиеся гранулы в растворе СаСl<sub>2</sub> на 15 мин. Затем с помощью шприца отбирают из чашки Петри наружный раствор, к гранулам добавляют порцию дистиллированной воды, перемешивают. Аналогичным образом дважды повторяют процедуру отмывки гранул от хлорида кальция. Собирают гранулы в колбу с дистиллированной водой.

## Контрольные вопросы

1. Перечислите источники получения альгиновых кислот.
2. Охарактеризуйте химическую природу альгиновых кислот.
3. По каким параметрам отличаются между собой альгиновые кислоты?
4. Какие функциональные группы содержат альгиновые кислоты?
5. В чем различия солей альгиновых кислот с моновалентными и двухвалентными катионами?
6. Каким образом происходит формирование структуры «egg-box»?
7. Перечислите преимущества Са-альгинатных гелей.
8. Какие факторы оказывают влияние на прочность альгинатных гелей?
9. Назовите области применения альгиновых кислот и их солей.

## Лабораторная работа № 18

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК

Одно из требований, предъявляемых к носителям для иммобилизации клеток, – отсутствие токсических эффектов. Однако в некоторых случаях процедура иммобилизации может приводить к снижению жизнеспособности клеток, обусловленному токсическим воздействием исходных реагентов (мономеры, концентрированные растворы сшивающих агентов, органические растворители и т. п.) или высоких температур. В связи с этим контроль жизнеспособности иммобилизованных растительных клеток – важная технологическая задача.

Для определения жизнеспособности иммобилизованных растительных клеток могут быть использованы различные методы (см. лабораторную работу № 11).

**Цель работы:** провести иммобилизацию клеток суспензионной культуры в гранулы Са-альгинатного геля и оценить их жизнеспособность.

**Материалы и оборудование:** суспензионная культура, 3 % раствор альгината натрия, 0,25 М  $\text{CaCl}_2$ , 0,1 % раствор нейтрального красного, 0,01 н  $\text{NaOH}$ , дистиллированная вода, пластмассовые шприцы (5 мл), химические стаканчики на 50–100 мл, чашки Петри, предметные и покровные стекла, автоматический дозатор на 1–5 мл, наконечники на 1–5 мл, микроскоп.

## Ход работы

**Задание 1.** Провести иммобилизацию клеток суспензионной культуры в гранулы Са-альгинатного геля.

С помощью пластмассового шприца переносят в химический стаканчик 5 мл 3 % раствора альгината натрия, а затем 5 мл суспензионной культуры, перемешивают. В чашку Петри добавляют 30 мл раствора 0,25 М хлорида кальция. Полученную суспензию клеток в растворе альгината натрия набирают в пластмассовый шприц и по каплям добавляют в чашку Петри, заполненную хлоридом кальция таким образом, чтобы образовывались отдельные гранулы.

Оставляют образовавшиеся гранулы альгината кальция с включенными в них клетками в растворе  $\text{CaCl}_2$  на 15 мин. С помощью шприца убирают из чашки Петри наружный раствор, к гранулам добавляют порцию дистиллированной воды, перемешивают. Аналогичным образом дважды повторяют процедуру отмывки гранул от хлорида кальция. Переносят гранулы в химический стаканчик. Добавляют 10 мл дистиллированной воды.

**Задание 2.** Оценить влияние процедуры иммобилизации на жизнеспособность клеток суспензионной культуры.

В химический стаканчик с гранулами иммобилизованных клеток, полученных в результате выполнения задания 1, добавляют 1 мл 0,1 % раствора нейтрального красного. Через 3 мин по каплям добавляют 0,01 М раствора NaOH до появления оранжевой окраски, оставляют на 20 мин. С помощью шприца отбирают краситель и заменяют раствор на дистиллированную воду. Рассматривают гранулы. Затем с помощью двух предметных стекол готовят давленный препарат гранулы, помещают препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива, оценивают долю окрашенных клеток. Сравнивают с результатами окрашивания свободных клеток суспензионной культуры.

Для оценки жизнеспособности неиммобилизованных клеток в химический стаканчик с помощью шприца помещают 5 мл суспензионной культуры, 5 мл дистиллированной воды, 1 мл 0,1 % раствора нейтрального красного. Через 3 мин по каплям добавляют 0,01 М раствор NaOH до появления оранжевой окраски, оставляют на 20 мин. На предметное стекло с помощью пипетки помещают каплю окрашенной суспензии клеток, накрывают покровным стеклом, помещают препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива, оценивают долю окрашенных клеток.

Формулируют вывод о характере влияния процедуры иммобилизации в Са-альгинатный гель на жизнеспособность клеток суспензионной культуры.

## Контрольные вопросы

1. Перечислите преимущества иммобилизованных растительных клеток.
2. Какие факторы могут приводить к снижению жизнеспособности иммобилизованных растительных клеток?

## Лабораторная работа № 19 ВЛИЯНИЕ ХЕЛАТИРУЮЩИХ АГЕНТОВ НА СОСТОЯНИЕ Са-АЛЬГИНАТНЫХ ГЕЛЕЙ

Полимерные гели альгинатов способны деградировать. На скорость их деградации влияют тип и концентрация двухвалентных катионов ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ), химический состав и молекулярный вес полимеров, наличие дополнительных сшивок между цепями полисахаридов. Для утраты носителем механической прочности и жесткости достаточно потери катионов, обеспечивающих гелеобразное состояние системы.

Полная обратимость процесса иммобилизации клеток в Са-альгинатные гели может быть достигнута в результате действия агентов, связывающих кальций (например, ЭДТА, цитратов и фосфатов). Поэтому при использовании Са-альгинатных гелей необходимо, чтобы в системе отсутствовали хелатирующие агенты.

Для упрочнения гранул иммобилизованных биокатализаторов предложена их дополнительная обработка сшивающим агентом, в частности глутаровым альдегидом. Для этого гранулы Са-альгинатного геля после экспонирования в растворе хлорида кальция переносят в раствор глутарового альдегида, после чего 3–4 раза промывают дистиллированной водой. В результате происходит упрочнение гранул, но вследствие токсичности глутарового альдегида может отмечаться снижение жизнеспособности клеток, что является недостатком такого технического решения. Повышение прочности гелей может быть достигнуто при использовании вместо кальция таких катионов, как барий и стронций.

**Цель работы:** сравнить скорость деградации гранул Са-альгинатного геля под влиянием различных хелатирующих агентов.

**Материалы и оборудование:** иммобилизованные в гранулы Са-альгинатного геля клетки микроводорослей *Chlorella*, 0,1 М раствор цитрата

натрия, 0,1 М раствор фосфатного буфера, 0,1 М раствор натрия ЭДТА, конические колбы объемом 50 мл, мерный цилиндр, лотки для взвешивания, весы, шейкер ротационного типа.

## Ход работы

**Задание.** Провести деградацию гранул Са-альгинатного геля с помощью хелатирующих агентов.

В три конические колбы помещают по 2 г гранул Са-альгинатного геля с иммобилизованными клетками микроводорослей и добавляют по 20 мл растворов хелатирующих агентов: 0,1 М цитрата натрия, 0,1 М фосфатного буфера, 0,1 М ЭДТА натрия. Помещают колбы на платформу орбитального шейкера для постоянного перемешивания содержимого. Каждые 5 мин проводят наблюдения за состоянием гранул. Устанавливают время, необходимое для полного растворения Са-альгинатного геля с иммобилизованными клетками. Полученные результаты оформляют в виде табл. 21.

Таблица 21

**Эффективность разных хелатирующих агентов  
в процессе разрушения гранул Са-альгинатного геля**

Тип и концентрация хелатирующего агента	Цитрат натрия, 0,1 М	Фосфатный буфер, 0,1 М	ЭДТА натрия, 0,1 М
Время полного разрушения гранул Са-альгинатного геля с иммобилизованными клетками, мин			

Формулируют вывод об эффективности различных хелатирующих агентов.

## Контрольные вопросы

1. Приведите примеры обратимой и необратимой иммобилизации.
2. С помощью каких агентов можно обеспечить обратимость процесса иммобилизации растительных клеток в Са-альгинатные гели?
3. От чего зависит скорость деградации Са-альгинатных гелей?
4. Какими способами можно повысить прочность альгинатных носителей?



**Материалы и оборудование:** иммобилизованные в гранулы Са-альгинатного геля растительные клетки, окрашенные нейтральным красным, ДМСО, конические колбы объемом 50 мл, мерный цилиндр, лотки для взвешивания, воронки, бумажные фильтры, весы, шейкер ротационного типа, спектрофотометр.

## Ход работы

**Задание.** Исследовать влияние ДМСО в качестве пермеабилizующего агента на экскрецию внутриклеточных метаболитов иммобилизованными растительными клетками.

В работе используют иммобилизованные в гранулы Са-альгинатного геля растительные клетки, окрашенные нейтральным красным (см. лабораторную работу № 18). В три конические колбы помещают по 3 г гранул с иммобилизованными клетками. В одну колбу добавляют 10 мл дистиллированной воды (контроль), во вторую – 5 % раствор ДМСО, в третью – 10 % раствор ДМСО. Переносят колбы на платформу орбитального шейкера для постоянного перемешивания содержимого. Через 30–40 мин отделяют гранулы от инкубационной среды путем фильтрования содержимого колб через бумажный фильтр. С помощью спектрофотометра проводят определение оптической плотности инкубационной среды при длине волны 530 нм.

Полученные результаты заносят в табл. 22.

Таблица 22

**Влияние ДМСО на выход нейтрального красного из иммобилизованных клеток суспензионной культуры**

Вариант	Контроль (вода)	5 % раствор ДМСО	10 % раствор ДМСО
Оптическая плотность ( $D_{530}$ )			

Формулируют вывод о степени пермеабилizующего эффекта разных концентраций ДМСО.

## Контрольные вопросы

1. Что такое пермеабилizация?
2. Приведите примеры пермеабилizующих агентов.
3. Что представляет собой технологический процесс, основанный на периодически индуцируемой экскреции продукта иммобилизованными растительными клетками?

## ЗАДАНИЯ ДЛЯ КОНТРОЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

1. Кем впервые была выдвинута гипотеза о тотипотентности растительной клетки?

- |                  |                |
|------------------|----------------|
| а) Уайтом;       | г) Скугом;     |
| б) Коккином;     | д) Готре;      |
| в) Габерландтом; | е) Рехингером. |

2. Какое из перечисленных соединений с ауксиновой активностью легко окисляется под действием специфической оксидазы, содержащейся в тканях экспланта, вследствие чего инактивируется?

- |           |         |
|-----------|---------|
| а) 2,4-Д; | г) НУК; |
| б) ИМК;   | д) ФМК; |
| в) ИУК;   | е) ФУК. |

3. Выберите вариант расположения соединений с ауксиновой активностью в порядке ее возрастания:

- 1) 2,4-Д;  
2) ИУК;  
3) НУК.  
а) 2, 1, 3; б) 3, 1, 2; в) 1, 2, 3; г) 2, 3, 1; д) 3, 2, 1; е) 1, 3, 2.

4. Выберите правильное утверждение:

- а) цитокинины были открыты раньше ауксинов;  
б) кинетин проявляет более слабую цитокининовую активность по сравнению с 6-БАП;  
в) зеатин является синтетическим цитокинином;  
г) ИПА относится к синтетическим цитокининам;  
д) цитокинины стимулируют процесс ризогенеза.

5. В каких пределах должен лежать рН питательных сред для культивирования растительных объектов *in vitro* до автоклавирования?

- |             |             |
|-------------|-------------|
| а) 5,2–5,4; | г) 5,8–6,0; |
| б) 5,4–5,6; | д) 6,0–6,2; |
| в) 5,6–5,8; | е) 6,2–6,4. |

6. После использования какого из стерилизующих агентов не требуется тщательного промывания растительных тканей стерильной дистиллированной водой?

- |                       |                       |
|-----------------------|-----------------------|
| а) сулема;            | г) диацид;            |
| б) гипохлорит натрия; | д) перекись водорода; |
| в) фенол;             | е) хлорамин.          |

7. Выберите правильное соответствие:

- а) питательная среда Уайта – индукция андрогенеза;
- б) питательная среда Као и Михайлюка – укоренение побегов;
- в) питательная среда Гамборга и Эвелега – культивирование клеток и тканей злаков;
- г) питательная среда Ничей – культивирование одиночных клеток;
- д) питательная среда В5 – культивирование протопластов.

8. Укажите вариант, содержащий неправильные утверждения:

- 1) в ходе дедифференциации в клетках экспланта накапливаются запасные питательные вещества;
  - 2) при дедифференцировке происходят изменения в активности генов и белковом аппарате растительных клеток;
  - 3) в клетках растений существует двойной гормональный контроль деления;
  - 4) ауксины необходимы для перехода клеток из G<sub>2</sub>-фазы к митозу;
  - 5) если в питательной среде присутствуют только ауксины, то растительные клетки не делятся, а начинают расти растяжением;
  - 6) для индукции каллусогенеза требуются более низкие концентрации ауксинов, чем для поддержания дальнейшего роста полученных каллусных культур.
- а) 1, 3, 5; б) 1, 4, 6; в) 2, 4, 6; г) 2, 4, 5; д) 2, 5, 6; е) 3, 5, 6.

9. Укажите неправильное утверждение:

- а) первичный каллус, как правило, относится к плотным каллусам;
- б) для получения плотных каллусов необходимо использовать каллусы рыхлого типа;

- в) для того чтобы «разрыхлить» каллус, необходимо снизить концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в питательной среде;
- г) темная окраска каллусов свидетельствует о старении культуры;
- д) плотные каллусы могут содержать зоны с трахеидоподобными элементами;
- е) гетерогенность каллусов по клеточному составу связана с гетерогенностью исходного экспланта.

10. «Привыкшие» ткани – это:

- а) каллусные культуры, прекратившие свой рост;
- б) каллусные ткани, из которых невозможно инициировать суспензионную культуру;
- в) каллусные ткани, которые не способны давать нормальный органогенез;
- г) каллусные ткани, которые способны расти на средах без сахарозы;
- д) гормонезависимые каллусные ткани;
- е) каллусные культуры, которые имеют миксотрофный способ питания.

11. Выберите правильное утверждение:

- а) для того чтобы «разрыхлить» каллус, необходимо повысить концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в питательной среде;
- б) первичный каллус, как правило, относится к каллусам рыхлого типа;
- в) для получения плотных каллусов необходимо использовать каллусы рыхлого типа;
- г) гетерогенность каллусов по клеточному составу не связана с гетерогенностью исходного экспланта;
- д) темная окраска каллусов свидетельствует об их высоком биосинтетическом потенциале;
- е) плотные каллусы могут содержать зоны с трахеидоподобными элементами.

12. Выберите правильное утверждение относительно суспензионных культур:

- а) являются гормонезависимыми;
- б) существенно отличаются по своим питательным потребностям от каллусных культур;
- в) клетки не способны переходить к дифференцировке;
- г) состоят только из одиночных клеток, выращиваемых в жидкой питательной среде во взвешенном состоянии;
- д) имеют менее продолжительный ростовой цикл.

13. Выберите вариант, где перечислены факторы, способствующие повышению степени агрегированности суспензионной культуры:

- 1) повышение уровня цитокининов в питательной среде;
- 2) снижение уровня цитокининов в среде культивирования;
- 3) добавление в питательную среду пектоцеллюлолитических ферментов в низких концентрациях;
- 4) повышение уровня ауксинов в среде культивирования;
- 5) повышение концентрации сахарозы и других углеводов в питательной среде;
- 6) возрастание частоты субкультивирования.

а) 1, 2, 5; б) 1, 5, 6; в) 2, 3, 6; г) 2, 4, 5; д) 2, 4, 6; е) 3, 5, 6.

14. Какой из способов культивирования суспензионных культур основан на добавлении в культуральный сосуд свежей питательной среды и удалении равного объема «отработанной» среды?

- а) накопительное культивирование;
- б) непрерывное культивирование в открытом проточном режиме;
- в) непрерывное культивирование в закрытом проточном режиме;
- г) непрерывное культивирование в полупроточном режиме;
- д) культивирование в режиме турбидостата;
- е) культивирование в хемотропном режиме.

15. Выберите вариант, где перечислены характеристики, относящиеся к клеткам в стационарной фазе роста:

- 1) увеличение объема цитоплазмы;
- 2) повышение активности дыхания;
- 3) активация оксидаз и гидролаз;
- 4) максимальный объем вакуоли;
- 5) максимум синтеза РНК и белка;
- 6) синтез ферментов, ключевых для вторичного метаболизма.

а) 1, 3, 6; б) 2, 3, 4; в) 3, 4, 5; г) 3, 4, 6; д) 3, 5, 6; е) 4, 5, 6.

16. Выберите вариант, где перечислены способы синхронизации клеточных культур:

- 1) использование 5-оксиметилмочевины;
- 2) увеличение концентрации ауксинов в питательной среде;
- 3) исключение из среды сахарозы;
- 4) создание условий гипоксии;
- 5) добавление в питательную среду абсцизовой кислоты;
- 6) действие пониженных температур.

а) 1, 3, 6; б) 2, 3, 4; в) 3, 4, 5; г) 3, 4, 6; д) 3, 5, 6; е) 4, 5, 6.

17. Что из перечисленного **не относится** к цитогенетическим особенностям популяций культивируемых *in vitro* растительных клеток?

- а) асинхронность;
- б) сохранение эпигенетических особенностей растения-донора;
- в) повышение генетической гетерогенности в результате мутагенного воздействия регуляторов роста;
- г) более высокая степень морфологической гетерогенности клеток суспензионных культур по сравнению с каллусными;
- д) повышение уровня плоидности клеток в результате увеличения продолжительности культивирования.

18. Выберите вариант, где перечислены факторы, способствующие повышению выхода БАВ в культурах растительных клеток:

- 1) повышение уровня сахарозы в питательной среде;
  - 2) снижение уровня сахарозы в питательной среде;
  - 3) добавление в среду культивирования предшественников вторичных метаболитов;
  - 4) уменьшение концентрации фосфатов;
  - 5) уменьшение концентрации 2,4-Д;
  - 6) увеличение концентрации 2,4-Д.
- а) 1, 2, 5; б) 1, 2, 4; в) 1, 3, 5; г) 1, 4, 5; д) 4, 5, 6.

19. Выберите вариант с правильными утверждениями относительно особенностей вторичного метаболизма в культурах растительных клеток:

- 1) процессы синтеза вторичных метаболитов преимущественно протекают в пластидах и эндоплазматическом ретикулуме;
  - 2) процессы синтеза вторичных метаболитов преимущественно протекают в вакуолях;
  - 3) накопление большинства вторичных метаболитов происходит при замедлении роста клеток;
  - 4) одинаковая биосинтетическая способность клеток как в стационарной, так и логарифмической фазе роста.
- а) 1, 3; б) 1, 4; в) 2, 3; г) 2, 4.

20. Какой тип дифференцировки может иметь место как в каллусных, так и суспензионных культурах?

- а) ризогенез;
- б) ксилемогенез;
- в) стеблевой органогенез;
- г) соматический эмбриогенез;
- д) флоральный органогенез;
- е) флорозогенез.

21. Повышенная активность какого фермента может быть использована в качестве маркера процесса ксилемогенеза в каллусных тканях?

- а) пероксидазы;
- б) ксантиноксидазы;
- в) ФЕП-карбоксилазы;
- г) кумаратлигазы;
- д) фенилаланинаммиаклиазы;
- е) АЛК-синтетазы.

22. При каких условиях наблюдается индукция образования адвентивных побегов?

- 1) отсутствие в питательной среде 2,4-Д в качестве ауксина;
- 2) полное исключение цитокининов;
- 3) высокое соотношение между цитокининами и ауксинами (100 : 1);
- 4) присутствие только цитокининов;
- 5) высокое соотношение между ауксинами и цитокининами;
- 6) отсутствие регуляторов роста в среде культивирования.

Выберите нужный вариант:

- а) 1, 2; б) 2, 3; в) 3, 4; г) 4, 5; д) 5, 6.

23. При каком условии наблюдается стимуляция соматического эмбриогенеза в суспензионных культурах растительных клеток?

- а) присутствие в питательной среде 2,4-Д;
- б) полное исключение цитокининов;
- в) высокое соотношение между цитокининами и ауксинами;
- г) присутствие только цитокининов;
- д) отсутствие регуляторов роста в среде культивирования.

24. При каком условии наблюдается стимуляция ризогенеза?

- а) присутствие в питательной среде 2,4-Д в качестве ауксина;
- б) высокое соотношение между цитокининами и ауксинами (100 : 1);
- в) присутствие только цитокининов;
- г) высокое соотношение между ауксинами и цитокининами;
- д) отсутствие регуляторов роста в среде культивирования.

25. Какой из способов микрклонального размножения в наименьшей степени обеспечивает получение растений, идентичных исходному?

- а) прямой соматический эмбриогенез;
- б) непрямой соматический эмбриогенез;
- в) активация развития боковых почек путем снятия апикального доминирования;
- г) индукция возникновения адвентивных побегов непосредственно из тканей экспланта;
- д) индукция возникновения адвентивных побегов в каллусной ткани.

26. Выберите вариант, где указанное **не относится** к преимуществам соматического эмбриогенеза как одного из способов микроклонального размножения растений:

- 1) отсутствие необходимости в укоренении получаемых регенерантов;
- 2) возможность получения искусственных семян;
- 3) стабильно высокие показатели размножения;
- 4) отсутствие возможности развития соматоклональных вариантов;
- 5) высокая эффективность и экономичность;
- 6) отсутствие возможности проявления мутагенной активности повышенных концентраций цитокининов.

а) 1, 2; б) 2, 3; в) 3, 4; г) 3, 5; д) 4, 5; е) 4, 6.

27. Укажите неправильное утверждение:

- а) ювенильный материал наиболее пригоден для повышения эффективности микроклонального размножения;
- б) для изоляции эксплантов лучше использовать растения в генеративной фазе развития;
- в) однодольные травянистые растения характеризуются менее выраженным морфогенетическим потенциалом по сравнению с двудольными травянистыми видами;
- г) оптимумы температуры, рН и освещения при микроклональном размножении должны соответствовать таковым для естественных условий произрастания данного вида;
- д) направление морфогенеза не зависит от соотношения уровней ауксинов и цитокининов в питательной среде.

28. Каким образом изменяют состав питательной среды на этапе укоренения микропобегов, полученных в результате клонального размножения?

- 1) Повышают концентрацию цитокининов;
- 2) исключают цитокинины из состава питательной среды;
- 3) уменьшают концентрацию сахарозы;
- 4) повышают концентрацию сахарозы;
- 5) повышают концентрацию ауксинов;
- 6) снижают концентрацию ауксинов.

Выберите правильный вариант:

а) 1, 2, 5; б) 1, 2, 4; в) 1, 3, 5; г) 1, 4, 5; д) 4, 5, 6.

29. Каковы основные причины увядания и гибели пробирочных растений на этапе адаптации к почвенным условиям произрастания?

- 1) Слабое функционирование фотосинтетического аппарата;
- 2) плохо выраженная способность к образованию корневых волосков;

- 3) отсутствие в среде фитогормонов;
- 4) слабое развитие устьичного аппарата;
- 5) поражение почвенными патогенами;
- 6) высокий осмотический потенциал почвенного раствора.

Выберите нужный вариант:

- а) 1, 3; б) 2, 4; в) 2, 5; г) 3, 4; д) 4, 5; е) 4, 6.

30. Что из перечисленного **не относится** к преимуществам иммобилизованных растительных клеток?

- а) механическая устойчивость;
- б) ускорение ростовых процессов;
- в) повышение биосинтетического потенциала за счет более эффективного использования кофакторов, участвующих в клеточном метаболизме;
- г) возможность осуществлять эффективную биотрансформацию веществ.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

*Авксентьева, О. А.* Биотехнология высших растений: культура *in vitro* : учеб.-метод. пособие / О. А. Авксентьева, В. А. Петренко. Харьков : ХНУ им. В. Н. Каразина, 2011. 60 с.

Лабораторно-практические занятия по сельскохозяйственной биотехнологии : метод. указания / под ред. В. С. Шевелухи. М. : Изд-во МСХА, 1996. 90 с.

*Мокроносов, А. Т.* Малый практикум по физиологии растений : учеб. пособие / А. Т. Мокроносов. М. : Изд-во МГУ, 1994. 184 с.

*Носов, А. М.* Методы оценки и характеристики роста культур клеток высших растений / А. М. Носов // Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений. М. : БИОНОМ, 2011. С. 386–403.

Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей : учеб. пособие / И. К. Сорокина [и др.]. Н. Новгород : Нижегород. гос. ун-т, 2002. 45 с.

Современные проблемы и методы биотехнологии [Электронный ресурс] : лаб. практикум / Н. А. Войнов [и др.]. Красноярск : ИПК СФУ, 2009. 111 с.

*Широков, А. И.* Основы биотехнологии растений. Электронное учеб.-метод. пособие / А. И. Широков, Л. А. Крюков. Н. Новгород : Нижегород. гос. ун-т, 2012. 49 с.

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	3
Список сокращений .....	5
<b>Раздел 1 . ОБЕСПЕЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКИХ УСЛОВИЙ ПРИ РАБОТЕ С КУЛЬТУРАМИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК</b> .....	<b>6</b>
<i>Лабораторная работа № 1.</i> Общие требования к лаборатории по культивированию растительных клеток. Ламинар-боксы .....	6
<i>Лабораторная работа № 2.</i> Методы стерилизации при проведении работ с культурами клеток и тканей растений .....	12
<i>Лабораторная работа № 3.</i> Техника работы в ламинар-боксе .....	18
<b>Раздел 2 . ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК</b> .....	<b>21</b>
<i>Лабораторная работа № 4.</i> Приготовление питательной среды по прописи Мурасиге и Скуга .....	24
<i>Лабораторная работа № 5.</i> Приготовление питательной среды WPM .....	30
<b>Раздел 3 . КАЛЛУСНЫЕ И СУСПЕНЗИОННЫЕ КУЛЬТУРЫ</b> .....	<b>34</b>
<i>Лабораторная работа № 6.</i> Получение каллусной ткани и ее субкультивирование .....	35
<i>Лабораторная работа № 7.</i> Получение суспензионной культуры растительных клеток и ее субкультивирование .....	38
<i>Лабораторная работа № 8.</i> Определение содержания воды и сухого вещества в каллусных культурах .....	41
<i>Лабораторная работа № 9.</i> Изучение морфологии клеток каллусных и суспензионных культур .....	43
<i>Лабораторная работа № 10.</i> Определение ростовых показателей каллусных и суспензионных культур .....	45
	95

<i>Лабораторная работа № 11. Определение жизнеспособности клеток суспензионных культур</i> .....	51
<i>Лабораторная работа № 12. Определение степени агрегированности и плотности суспензионных культур</i> .....	58
<i>Лабораторная работа № 13. Определение содержания вторичных метаболитов фенольной природы в культурах растительных клеток</i> .....	62
<b>Р а з д е л 4. РЕГЕНЕРАЦИЯ РАСТЕНИЙ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i></b> .....	66
<i>Лабораторная работа № 14. Влияние фитогормонов на тип морфогенеза в культуре клеток и тканей</i> .....	68
<i>Лабораторная работа № 15. Микрочеренкование побегов и индукция их укоренения</i> .....	69
<i>Лабораторная работа № 16. Соматический эмбриогенез в каллусной ткани</i> .....	73
<b>Р а з д е л 5. ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ РАСТИТЕЛЬНЫЕ КЛЕТКИ</b> .....	76
<i>Лабораторная работа № 17. Иммуобилизация клеток микроводорослей в гранулы Са-альгинатного геля</i> .....	77
<i>Лабораторная работа № 18. Определение жизнеспособности иммобилизованных растительных клеток</i> .....	80
<i>Лабораторная работа № 19. Влияние хелатирующих агентов на состояние Са-альгинатных гелей</i> .....	82
<i>Лабораторная работа № 20. Пермеабиллизация растительных клеток, иммобилизованных в гранулы Са-альгинатного геля</i> .....	84
<b>Задания для контроля самостоятельной работы студентов</b> .....	86
<b>Список литературы</b> .....	94

Учебное издание

**Дитченко** Татьяна Ивановна

## **КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК**

**Учебно-методическое пособие**

Редактор *Т. Н. Крюкова*

Художник обложки *Т. Ю. Таран*

Технический редактор *Л. В. Жаборовская*

Компьютерная верстка *В. В. Мироновой*

Корректор *А. В. Лебедько*

Подписано в печать 25.05.2018. Формат 60×84/16. Бумага офсетная.  
Ризография. Усл. печ. л. 5,58. Уч.-изд. л. 6,63. Тираж 120 экз. Заказ 265.

Белорусский государственный университет.  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/270 от 03.04.2014.  
Пр. Независимости, 4, 220030, Минск.

Республиканское унитарное предприятие  
«Издательский центр Белорусского государственного университета».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 2/63 от 19.03.2014.  
Ул. Красноармейская, 6, 220030, Минск.