

Т. А. Красинская

КЛЕТОЧНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ





Учреждение образования
«Международный государственный
экологический институт имени А. Д. Сахарова»
Белорусского государственного университета

Т. А. Красинская

КЛЕТОЧНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Методические указания

Минск
ИВЦ Минфина
2024

УДК 60(076.5)
ББК 30.16я73
К 78

Рекомендовано к изданию научно-методическим советом
МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ

Рецензенты: кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник отдела биотехнологии РУП «Институт плодоводства» *М. С. Кастрицкая*; кафедра общей биологии и генетики факультета экологической медицины (рецензент – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент *В. О. Лемешевский*)

Красинская, Т. А.

К 78 Клеточная биотехнология : методические указания / Т. А. Красинская. – Минск : ИВЦ Минфина, 2024. – 48 с.
ISBN 978-985-880-542-5.

В пособии представлены лабораторные работы по дисциплине «Клеточная биотехнология», модуль «Микробиология и молекулярная биотехнология». Содержатся задачи практического плана с разнообразными направлениями и методами, используемыми в клеточной биотехнологии. Издание состоит из разделов, отражающих весь объем материала, необходимого для закрепления знаний.

Предназначается для обучающихся по специальности углубленного высшего образования 7-06-0511-04 Медико-биологическое дело.

УДК 60(076.5)
ББК 30.16я73

ISBN 978-985-880-542-5

© Красинская Т. А., 2024
© МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, 2024

Введение

Изучение дисциплины «Клеточная биотехнология» модуля «Микробиология и молекулярная биология» занимает определенное место в подготовке биологов, специалистов в области биотехнологии. *Основные цели* при изучении курса данной дисциплины – формирование знаний о принципах и специфике работы с различными биологическими объектами (растительная клетка, животная клетка, микробиологические системы), формирование профессиональных навыков для решения поставленных задач.

Данные методические указания к лабораторным работам разработаны для обучающихся, получающих углубленное высшее образование. Они состоят из трех лабораторных работ, которые полностью соответствуют темам учебной программы.

На практике развивая и закрепляя теоретические положения лекционного курса, студенты приобретают навыки работы с биологическими объектами в стерильных условиях, умения подбора и приготовления питательных сред, а также знания и умения работы с ними при подготовке к долговременному хранению (криосохранение) в генобанках.

Лабораторные работы по клеточной биотехнологии способствуют закреплению теоретических знаний, развивают навыки самостоятельной практической и экспериментальной работы, формируют умение анализировать полученные результаты и делать выводы. Проведение занятий описано по общей схеме: приводятся название темы лабораторной работы, цель, материалы и оборудование, краткая теоретическая часть, задания и методика их выполнения. В теоретической части сжато излагаются основные вопросы и сведения, необходимые для выполнения практической работы, некоторые вопросы дополняются вспомогательными иллюстрациями.

Пособие практико-ориентировано (приведены результаты исследований научных коллективов), содержательно и логично. Оно имеет практическую значимость, поскольку материал в нем систематизирован, грамотно и доступно изложен.

Лабораторная работа 1

Питательные среды для культивирования клеток и тканей растений. Требования к средам

Цель работы – ознакомиться с оборудованием в биотехнологической лаборатории, а также техникой безопасности при работе с химическими веществами и живыми объектами; изучить принципы и овладеть методикой приготовления основных питательных сред для культивирования клеток и тканей растений.

Материалы и оборудование: инструкция по технике безопасности при работе в биотехнологической лаборатории, журнал по технике безопасности; компоненты питательной среды Мурасиге-Скуга для приготовления маточных растворов: макро- и микросоли, витамины (В1, В6, РР, С), глицин, мезоинозит, гормоны (6-бензидаденин), сахароза, агар, дистиллированная вода, 0,1н КОН, 0,1н НСl; колбы для приготовления маточных растворов, аналитические весы, весы, мерные цилиндры (до 100 мл, до 1000 мл), магнитная мешалка, магниты для перемешивания, рН метр, микроволновая печь, стаканы для приготовления питательной среды, лабораторные дозаторы (200 μ л, 1000 μ л, 5000 μ л).

Задачи:

1. Ознакомиться с оборудованием рабочего места и техникой безопасности при работе с химическими веществами и живыми объектами.
2. Изучить основные принципы приготовления питательных сред.
3. Освоить метод приготовления питательных сред для культивирования клеток и тканей растений.

При выполнении работ в биотехнологической лаборатории необходимо соблюдать требования техники безопасности при работе с химическими реактивами. Все работы проводят в перчатках и лабораторных халатах. Помещение, в котором проводят работы, должно быть оборудовано общей приточно-вытяжной вентиляцией. Помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности и иметь средства пожаротушения. При работе с УФ-излучением необходимо пользоваться защитным экраном и защитными очками.

Для оптимальной организации лабораторных работ используются следующие помещения:

1. **Комната для приготовления питательных сред.** Необходимо следующее оборудование: дистиллятор/бидистиллятор; водяная баня, электроплитки или СВЧ-печь; магнитные или механические мешалки; рН-метр; весы (диапазоном до 1000 мг и до 20 г); лабораторная посуда (химические стаканы, колбы, мерные цилиндры, пипетки/лабораторные дозаторы, пробирки и др.), холодильники.

2. **Комната для мытья посуды**, оборудованная мойками, сушильным шкафом для сушки посуды, посудомоечной машиной.

3. **Автоклавная комната**, оснащенная минимум тремя автоклавами (для стерилизации питательных сред, инфицированного материала и субстрата).

4. **Ламинарная комната**. Отдельное помещение с легко моющимися поверхностями стен и пола, оборудованное ламинарными боксами, бактерицидной ультрафиолетовой лампой и бинокулярным микроскопом.

5. **Климатические комнаты** с оборудованием, предназначенным для поддержания благоприятного микроклимата: стеллажами с освещением, кондиционерами, вентиляторами, программным реле времени.

Подготовительные работы для работы с биообъектами в биотехнологии

1. Стерилизация инструментов и питательной среды

Новую посуду рекомендуется простерилизовать с дистиллированной водой в автоклаве при давлении 1,5–2 атм 20–30 мин.

Посуду, бывшую в употреблении, освобождают от остатков агара и тщательно моют с применением обычных моющих средств и трехкратно ополаскивают дистиллированной водой. Сосуды с инфицированной питательной средой автоклавируют или прожаривают в сушильном шкафу для предотвращения распространения инфекции. Загрязненную посуду можно прокипятить со стиральным порошком, затем хорошо промыть и ополоснуть.

Мытую посуду сушат и стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 170–180 °С 1–2 ч.

Стерилизация инструментов для работы с культурами клеток и тканей, микроорганизмами:

Перед работой инструменты предварительно прожаривают в течение 2 ч при 140–160 °С.

В ламинарном боксе во время работы инструменты опускают в стакан с 96°-ным этанолом, обжигают в пламени спиртовки и сохраняют на стерильных держателях. Либо используют термический стерилизатор (рис. 1).

Используют инструменты только для одноразовой манипуляции с тканью, после чего вновь стерилизуют спиртом и обжигают. Очень тонкие инструменты (иглы) могут терять свои свойства при обжигании, поэтому их только погружают в спирт.



Рис. 1. Стерилизатор термический Simon Keller Steri 250 AC input
(фото с сайта <https://drs.illinois.edu>)

2. Питательные среды, их состав и приготовление

Состав питательных сред для культивирования биотехнологических объектов зависит от типа их питания:

- среда без глюкозы – для хлореллы, цианобактерий;
- среда без витаминов и гормонов – для грибов (фузариума, ботритиса) и для ряски;
- среда с азотом, сахарами, витаминами, гормонами – для культивирования клеток и тканей высших растений.

Питательная среда – основной фактор, обуславливающий успех культивирования живых организмов на клеточном, тканевом и органном уровне организации (в частности и на успех клонального микроразмножения растений).

Основой всех питательных сред являются минеральные соли, необходимые растению:

макроэлементы – N, P, K, Ca, Mg;

микроэлементы – B, Mn, Zn, Si, Co, Mo, I, Fe.

Кроме того, в состав питательных сред входят аминокислоты, витамины, регуляторы роста.

Поскольку питание культивируемых тканей фотомиксотрофно, необходимо присутствие углеводов: сахарозы, глюкозы или фруктозы.

Основные процессы, происходящие при культивировании тканей, в значительной мере регулируются минеральными компонентами питательной среды, их концентрацией и соотношением.

Азот, непременно входящий в состав питательных сред, определяет морфологические возможности тканей. Существенную роль играет

форма азота. В зависимости от соотношения **нитратной и аммонийной** формы индуцируются побеги или корни, почки или эмбриониды.

Рост ряда тканей активируется при введении в состав среды отдельных аминокислот, чаще всего глицина, или их смесей, в виде гидролизата казеина, пептона.

Важным фактором, регулирующим дифференциацию и морфогенез изолированных тканей, является наличие в питательной среде **регуляторов роста** – ауксинов, цитокининов, гиббереллинов. Подбирая соотношение и концентрацию этих веществ, можно направленно регулировать их органогенное действие. Для каждого вида, а иногда и сорта растения экспериментально должен быть установлен соответствующий уровень фитогормонов в среде.

Чаще всего применяются следующие **ауксины**:

- индолилмасляная кислота (ИМК) в концентрациях от 0,01–2 мг/л,
- а-нафтилуксусная кислота (НУК) в концентрациях 0,1–2 мг/л,
- β-индолилуксусная кислота (ИУК) в концентрациях 1–30 мг/л,
- 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) в концентрациях 1–10 мг/л.

Для индукции образования каллуса обычно используют 2,4-Д, которая более активна, чем ИУК и НУК.

Для тканей однодольных используют довольно высокие концентрации 2,4-Д – 2–10 мг/л,

Для получения каллусных культур двудольных вводят в среду ИУК–1–10 мг/л.

Во многих случаях низкие уровни ауксинов способствуют морфогенезу корней, образованию луковичек, стимулируют эмбриогенез.

Обязательным компонентом питательных сред являются вещества группы **цитокининов**:

- кинетин (6-фурфуриламинопурин),
- бензиламинопурин (6-БА),
- зеатин (природный цитокинин),
- N-изопентиленаминопурин (2iP).

Цитокинины снимают апикальное доминирование и индуцируют развитие пазушных почек в культуре апексов, стимулируют рост покоящихся органов. Для реализации морфогенетических реакций изолированным тканям необходимы экзогенные цитокинины, под действием которых происходит дефференциация в каллусных культурах, образование стеблевых почек и побегов. Цитокинины регулируют рост соматических зародышей и формирование растений, замедляют старение органов и повышают их устойчивость к неблагоприятным условиям внешней среды.

Гиббереллины усиливают рост стебля, листьев, индуцируют прорастание семян, снимают состояние покоя. При микроразмножении используют в основном гиббереллин GA₃ (гибберелловая кислота) в концентрациях 0,1–0,5 мг/л, это способствует ускорению роста сформировавшихся почек и получению растений с хорошо развитой надземной частью. Гиббереллины стимулируют развитие органов, но обычно подавляют процессы их заложения.

Совместное внесение в среду веществ разных групп действует синергически или антагонистически.

Например, кинетин усиливает каллусогенное действие ауксинов, но снижает их корнеобразующее влияние.

Ауксины в низких концентрациях повышают действие цитокининов, направленное на образование адвентивных почек, а цитокинины в низких концентрациях усиливают корнеобразующее действие ауксинов.

Очень часто для индукции пролиферации каллуса и дифференциации органов к питательной среде добавляют **вещества неопределенного химического состава**: эндосперм кокосового ореха, апельсиновый сок, березовый сок, картофельный экстракт, гидролизат казеина. Эти вещества обладают активирующими свойствами. Однако экспериментальные данные о действии указанных веществ нередко противоречивы, поэтому при культивировании тканей многих растений обычно используют экзогенные фитогормоны.

В состав многих сред включают **витамины**, которые продлевают срок жизни экспланта или растения-регенеранта, нормализуют некоторые ростовые процессы, протекающие при регенерации, но не являются фактором, определяющим развитие эксплантов. Многие исследователи считают, что в процессе культивирования ткани приобретают способность к синтезу некоторых витаминов и их не обязательно вводить в состав сред. Однако, когда в культуру *in vitro* вводится новая ткань и условия питания еще не установлены, витамины следует добавлять. Широко применяемые витамины: витамины С (аскорбиновая кислота), РР (никотиновая кислота), группы В (В₁, В₆, В₁₂), мезоинозит.

Аскорбиновая кислота (С) используется в качестве антиоксиданта и адсорбента. Многие растительные ткани в питательную среду выделяют фенольные вещества, которые при длительном контакте с растительной тканью вызывают их некроз.

Тиамин (В₁) входит в состав фермента пируватдекарбоксилазы, участвует в превращениях углеводов. Тиаминпирофосфат входит в состав ферментов окислительного декарбоксилирования кетокислот (пировиноградной и кетоглутаровой), является коферментом транскетолазы.

Пиридоксин (В₆) в виде фосфорнокислого эфира входит в состав ферментов декарбоксилирования и переаминирования аминокислот.

Никотиновая кислота (РР) в виде амида входит в состав дегидрогеназ НАД⁺ и НАДН₂, катализирующих донорно-акцепторную цепь Н⁺ (отнятие Н⁺ от молекул органических веществ).

Для тканей большинства растений лучшим **источником углеводов** является сахароза или глюкоза в концентрациях 20–40 г/л. Для индукции каллусообразования и морфогенеза на первом и втором этапе микроразмножения используют 20–30 г сахарозы, при укоренении побегов концентрацию сахарозы снижают или совсем исключают из состава питательной среды.

Культивирование растительных тканей *in vitro*, как правило, проводят на твердой или полужидкой питательной среде с использованием гелеобразователей. Тип используемого желирующего агента может влиять на рост ткани в культуре. Как чистота, так и стоимость гелеобразующего агента являются важными факторами в любой исследовательской или производственной работе.

Традиционно используется **агар-агар**, полисахарид, получаемый из морских водорослей. Основные различия между различными агаровыми продуктами связаны с примесями, их уровнем и составом. Агар широко используется, поскольку он обладает удобными желирующими свойствами и стабильностью при культивировании тканей. Обычно агар выпускают двух типов:

1. **Пластинчатый.** Пластинчатый агар необходимо предварительно промыть проточной водопроводной водой в течение нескольких часов, затем 5–6 раз дистиллированной водой и просушить в эмалированных кюветах при комнатной температуре.

2. **Порошковидный.** Порошковидный агар и бактериальный агар «Difco» промывать не следует.

Камеди, такие как **геллан (геллановая камедь)**, вырабатываемые бактериями и выпускаемые под разными названиями: Gel-Gro®, Gerlite® и Phyta-gel®, представляют собой полисахариды, не содержащие дополнительных веществ. Более того, эти вещества добавляют в питательные среды в меньшем количестве на литр, чем агар, для получения такой же консистенции (примерно 1/4 от массы агара). Кроме того, питательные среды с геллановой камедью получаются более прозрачными и улучшают визуальный мониторинг на наличие бактериальной инфекции.

В последнее время многими экспериментаторами ведутся поиски заменителей агара. В качестве поддержки для культивируемых тканей используют пластинки из пенополиуретана, перлит. При выращивании

тканей в стационарной жидкой среде пользуются мостиками из фильтровальной бумаги.

Показатель pH питательной среды. Концентрация водородных ионов в питательной среде влияет на устойчивость и усвояемость ряда компонентов.

Наиболее чувствительны к pH среды ИУК, гибберелловая кислота, витамины. От величины pH зависит доступность для тканей фосфатов, соединений железа, солей тяжелых металлов.

При низких величинах pH не происходит желатинизация агара.

Оптимальными для большинства изолированных тканей являются среды с pH 5,0–5,8. Для поддержания постоянного значения pH следует вводить в среду буферные смеси (фосфаты и карбонат кальция) и хелатированное железо.

Ткани некоторых растений при культивировании часто выделяют в среду фенольные соединения. Среда быстро темнеет и ткань отмирает. Для предотвращения этого явления рекомендуется в среду добавлять активированный уголь (1–2 г/л). Адсорбирующие свойства угля способствуют равномерному распределению питательных элементов в среде и удалению продуктов метаболизма развивающихся тканей. Кроме того, добавление угля обеспечивает затемнение среды для нормального развития корней. На средах с активированным углем не происходит изменения концентрации водородных ионов в результате длительного культивирования ткани или растений-регенерантов.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ МАТОЧНЫХ РАСТВОРОВ МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

Для удобства в работе и ускорения процесса приготовления питательной среды целесообразно заранее приготовить концентрированные растворы макроэлементов, в 10–20 раз превышающие рабочие растворы, объемом 0,2–1 л.

Некоторые лаборатории готовят несколько макросолей в одном маточном растворе. Соли кальция готовят отдельно во избежание выпадения хлопьевидного осадка. Однако в научно-исследовательской лаборатории рекомендовано приготовление каждой макросоли отдельно.

Маточные растворы микроэлементов готовят в концентрациях в 100 раз превышающих необходимые, из такого расчета, чтобы в 1 мл маточного раствора содержалась масса вещества, нужного для приготовления 1 л рабочего раствора.

Приготовленные концентрированные растворы сохраняют в холодильнике при 2–4 °C в бутылках из темного стекла не более 4–6 нед.

Растворы регуляторов роста и витаминов обычно готовят из расчета 1 мг вещества в 1 мл раствора. Вещества группы цитокининов,

гиббереллинов сначала растворяют в небольшом количестве 1 н. раствора щелочи, ауксины – в капле этанола и затем доводят до нужного объема дистиллированной водой. Концентрированные растворы органических веществ хранят в морозильной камере при -20°C . Следует учитывать, что многие витамины и регуляторы роста не выдерживают длительного хранения в растворенном виде.

Углеводы, аминокислоты, пептон, гидролизат казеина, дрожжевой автолизат, агар взвешивают и добавляют прямо в среду, без предварительного растворения.

Приготовление хелатной формы железа:

Растворить 557 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 745 мг трилона Б (этилендиамин-тетрауксусная кислота, ЭДТА) в 100 мл бидистиллята. Нагреть до полного растворения смеси в микроволновой печи.

Для приготовления 1 л питательной среды берут 5 мл раствора. Хелатная форма улучшает доступность железа в широких пределах pH. Хранят приготовленный раствор в холодильнике в емкости из темного стекла.

Приготовление питательных сред требует особой тщательности, причем во избежание ошибок следует соблюдать определенную последовательность работы:

1. В мерную колбу (или цилиндр) налить 250–300 мл бидистиллированной воды и добавлять точно отмеренное количество каждого раствора макро- и микроэлементов (или их смеси, витаминов, регуляторов роста.

2. Взвесить необходимое количество углеводов, гидролизата казеина, пептона, дрожжевого автолизата и т. п.

3. Довести дистиллированной водой до нужного объема.

4. Установить pH среды на pH-метре и довести его до нужного значения, добавляя (по каплям) 0,1 н. КОН или 0,1 н. NaOH или 0,1 н. HCl.

5. Навеску агара добавить в питательную среду и нагреть при периодическом помешивании до полного растворения агара (до $90\text{--}100^{\circ}\text{C}$).

6. Разлить теплую среду в предварительно подготовленные колбы или пробирки. Закрыть пробками или фольгой, тщательно обжимая ее вокруг горлышка сосуда.

7. Стерилизовать среду в автоклаве: при давлении 0,8–1 атм. (температура $115\text{--}120^{\circ}\text{C}$) в течение 20–25 мин в зависимости от объема (табл. 1).

Таблица 1

Время стерилизации питательной среды в зависимости от ее объема

Объем питательной среды в сосуде, мл	Время стерилизации, при 121°C (1 атм), мин
20–50	15
75	20
250–500	25
1000	30
2000	40

8. Если среда содержит активированный уголь, то ее сразу же после стерилизации следует тщательно и осторожно размешать до равномерного распределения взвеси по всей среде.

Приготовленные среды желательно использовать в короткие сроки (7–10 дней). Жидкие среды разливают в специальные сосуды с боковым отростком для культивирования на роллере или пробирки с мостиками из фильтровальной бумаги (при культивировании в стационарных условиях).

При приготовлении сред с термолабильными компонентами (растительными экстрактами, аминокислотами, некоторыми стимуляторами роста (зеатин), витаминами следует растворы этих веществ стерилизовать, пропуская их через специальные фильтры холодной стерилизации (рис. 2).

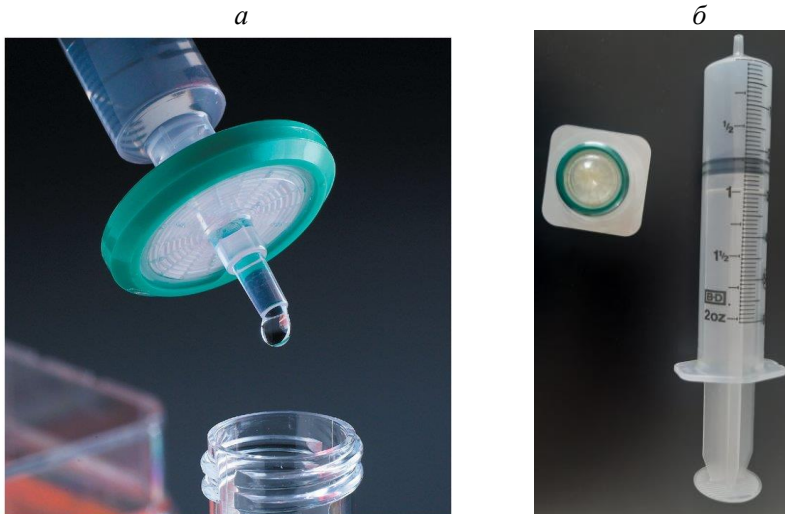


Рис. 2. Система MilliporeSigma™ Millex™-GP Sterile Syringe Filter для холодной стерилизации биологически активных веществ для культивирования клеток растений (а – фото с сайта <https://www.fishersci.co.uk> и б – фото автора)

Стерильные растворы данных веществ добавляют в ламинарном боксе в готовую стерильную питательную среду и затем разливают в стерилизованную посуду.

Состав наиболее распространенных питательных сред

В настоящее время разработано большое количество различных по составу питательных сред, многие из них являются модификациями сред Мурасиге-Скуга, Кнопа, Уайта, Готре, Хеллера.

Минеральный состав, обусловленный основными физиологическими требованиями большинства тканей растений, наиболее стабилен, его модификации достигаются внесением различных добавок: аминокислот, регуляторов роста, витаминов (табл. 2).

Наиболее распространена среда Мурасиге – Скуга, которая содержит хорошо сбалансированный состав питательных веществ, благоприятный для роста изолированных тканей многих растений.

Задание 1. Необходимо приготовить маточные растворы солей, которые будут использоваться для приготовления питательной среды для введения в культуру *in vitro* эксплантов растений. Опираясь на прописи сред в табл. 3, проведите расчеты сколько г или мг веществ необходимо взять для приготовления маточных растворов макро- и микроэлементов, входящих в состав сред:

1. Мурасиге – Скуга
2. DKW

Пересчитайте массы веществ и запишите полученные данные в табл. 4.

Для каждой питательной среды (MS, DKW, QL) таблицы оформить отдельно.

Задание 2. Приготовьте маточные растворы биологически активных веществ (витаминов и гормонов) согласно табл. 5.

Задание 3. Приготовить маточные растворы макро- и микросолей, необходимых для приготовления питательной среды Мурасиге – Скуга, согласно полученным расчетам.

1. Подготовить чистые емкости для маточных растворов. Подписать название компонента, название питательной среды, число приготовления, имя лаборанта.

2. Взвесить необходимую соль.

3. Добавить соль в емкость и долить необходимый объем дистиллированной воды.

Таблица 2

Минеральный состав наиболее распространенных питательных сред

Компоненты сред	Концентрация в средах по прописи мг/л								
	Мурасиге и Скуга	Андерсна	Нича и Нича	Гамборга	QL	Уайта	WPM	DM	Ли-Фоссарда
NH ₄ NO ₃	1650	400	720	–	400	–	400	412,5	800
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	–	–	460	–	–	–	37,5	–
KNO ₃	1900	480	950	2830	1800	80	–	247,5	1010
KCl	–	–	–	–	–	65	–	–	–
KH ₂ PO ₄	170	–	68	400	270,0	–	170	165	–
K ₂ SO ₄	–	–	–	–	–	–	990	105	–
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	–	–	–	–	833,8	300	555,5	307,5	–
CaCl ₂	–	322,2	166	–	–	–	72,5	–	–
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	–	–	170	–	–	-	-	294
MgSO ₄	–	180,7	90,4	–	–	–	180,7	277,5	–
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	–	–	900	360,6	720	–	–	370
NaH ₂ PO ₄	–	330,6	–	–	–	–	–	75	–
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	–	–	–	–	–	16,5	–	–	138
Na ₂ SO ₄	–	–	–	–	–	200	–	–	63,9
Na ₂ ЭДТА	37,3	74,5	37,3	37,3	37,3	–	37,3	27,98	16,8
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	55,7	27,8	27,8	27,8	–	27,8	20,85	13,9
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	10	6,2	6,2	1,5	6,2	4,65	3,1
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3	–	–	22,3	9,8	7,0	–	–	11,1
MnSO ₄ ·H ₂ O	–	16,9	18,9	–	–	–	22,3	12,67	
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	8,6	–	–	8,6	–	–	–	–	5,8
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	–	8,6	10	–	8,6	3,0	8,6	6,45	–
KJ	0,83	0,3	–	0,83	0,08	0,75	–	0,62	0,4

Компоненты сред	Концентрация в средах по прописи мг/л								
	Мурасиге и Скуга	Андерсна	Нича и Нича	Гамборга	QL	Уайта	WPM	DM	Ли-Фоссарда
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,25	0,25	0,3	—	0,250	0,19	0,024
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,0001	0,25	0,019	0,025
$\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	—	0,025	0,025	—	—	0,019	0,118

Таблица 3

Состав питательных сред, используемых для культивирования клеток и тканей растений в условиях *in vitro*

	Компоненты питательной среды	Среда MS (Murashige Skoog)	Среда DKW (Driver Kuni- yuki walnut medium)	Среда QL (Quoirin Lepoivre)
		концентрация мг/л		
	KNO_3	1900		1800
	MgSO_4		361.49	175,79
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370		
	KH_2PO_4	170	265	270
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$			578,92
	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		1664.64	
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440		
	K_2SO_4		1559	
	CaCl_2		112.50	
Хелат железа	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8	33,8	27,8
	ЭДТА $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3	45,4	37,3
Микросоли	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3		
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		33.80	0,76
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	17	8,6
	H_3BO_3	6,2	4.80	6,2

	Компоненты питательной среды	Среда MS (Murashige Skoog)	Среда DKW (Driver Kuni- yuki walnut medium)	Среда QL (Quoirin Lepoivre)
	KI	0,83		0,08
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0.39	0,25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0.25	0,025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025		0,025
Биологически актив- ные вещества	пиридоксина гидрохлорид	0,5		
	тиамина гидрохлорид	0,1	2	
	никотиновая кислота	0,5	1	
	аскорбиновая кислота	—	—	
	глицин	2,0	2,0	
	индолилуксусная кислота	2,0		
	кинетин	0,2		
	мезо- или мио-инозитол	100	100	
Сахароза	30000			
pH	5,6–5,8			

Таблица 4

Приготовление маточных растворов солей для приготовления питательных сред

Компонент питательной среды	Объем маточного раствора, мл	Объем маточного раствора, необходимого для приготовления 1 л питательной среды, мл	Масса вещества для приготовления маточного раствора, мг/г
Макросоли			
NH ₄ NO ₃	200	10	
KNO ₃			
MgSO ₄			
MgSO ₄ ·7H ₂ O			
KH ₂ PO ₄			
Ca(NO ₃) ₂			
Ca(NO ₃) ₂ ·2H ₂ O			
CaCl ₂ ·2H ₂ O			
K ₂ SO ₄			
CaCl ₂			
Хелат железа			
FeSO ₄ ·7H ₂ O	200	5	
ЭДТА·2H ₂ O			
Микросоли			
MnSO ₄ ·4H ₂ O	100	1	
MnSO ₄ ·H ₂ O			
ZnSO ₄ ·7H ₂ O			
H ₃ BO ₃			
KI			
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O			
CuSO ₄ ·5H ₂ O			
CoCl ₂ ·6H ₂ O			

Таблица 5

Приготовление маточных растворов биологически активных веществ

Название биологически активного вещества	Масса навески для приготовления раствора, мг	Объем растворителя
пиридоксина гидрохлорид	10	10 мл дистиллированной воды
тиамина гидрохлорид	10	10 мл дистиллированной воды
никотиновая кислота	10	10 мл дистиллированной воды
аскорбиновая кислота	10	10 мл дистиллированной воды
глицин	10	10 мл дистиллированной воды
индолилуксусная кислота индолилмасляная кислота	10	0,5 мл 96% этилового спирта 9,5 мл дистиллированной воды
6-бензиладенин	10	0,5 мл 1н КОН (NaOH) 9,5 мл дистиллированной воды
гиберелловая кислота	10	0,5 мл 1н КОН (NaOH) 9,5 мл дистиллированной воды

Задание 4. Приготовить 1 л питательной среды Мурасиге – Скуга согласно прописи среды и схеме приготовления.

Схема приготовления 1 л твердой (агаризованной) питательной среды

1. Налить 250–300 мл бидистиллированной воды в мерную колбу или стакан.
2. Добавить дозатором маточные растворы макро- и микроэлементов в соответствии с прописью питательной среды.
3. Добавить растворы витаминов и регуляторов роста.
4. Добавить органические компоненты (мезоинозит) и углеводы (сахароза). Довести общий объем до 1 л.
5. Установить pH, добавляя по капле 0,1н КОН или 0,1н HCl.
6. Добавить желеобразующий компонент (агар-агар или Gerlite).
7. Нагреть до полного растворения агара в питательной среде в микроволновой печи.
8. Разлить приготовленную среду в пробирки или банки для культивирования.
9. Стерилизовать в автоклаве при 0,8–1 атм. 20–25 мин (в зависимости от объема среды).

Задание 5. Оставшиеся маточные растворы солей и гормонов поставить в холодильник. Маточные растворы витаминов разликвотить по иппендорфам объемом 1 мл и поставить в морозилку.

Лабораторная работа 2

Клональное микроразмножение растений.

Введение в культуру *in vitro* фиалки узамбарской

Цель работы – отработать методику введения в культуру *in vitro* растительных объектов.

Оборудование и материалы:

Листья фиалки узамбарской (стебли с хризантем);

Стерилизующие агенты: стерильная дистиллированная вода (3 колбы по 200 мл), 70%-ный этиловый спирт, перекись водорода 30 или 50 %.

Инструменты для культуральных работ:

- стерильные пинцеты – 3 шт.,
- стерильные скальпели – 3 шт.,
- стерильные чашки Петри – 5 шт.,
- стерильная колба для стерилизации растительных объектов,
- стерильные матрасики для работы в ламинарном боксе или чашки

Петри.

Пробирки с питательной средой Мурасиге – Скуга.

Маркер для подписей.

Задачи:

1. Отработать технику работы в ламинарном боксе, соблюдая стерильные условия.
2. Научиться работать с растительными объектами в культуре *in vitro*.
3. Проанализировать полученные результаты эффективности применения различной экспозиции стерилизующих агентов на процессы регенерации эксплантов в культуре *in vitro*.

Использование культуры тканей и органов *in vitro* имеет широкие перспективы, являясь частью широкого перечня технологических операций в растениеводстве. Культура тканей растений в условиях *in vitro* используется при:

- освобождении от системных патогенов (вирусов, фитоплазм, бактерий), как отдельно, так и в комплексе с хемо- и термотерапией, криотерапией *in vitro*;
- массовом размножении растений (клонирование);
- депонировании генотипов при нормальной и минимальной вегетации, создании оздоровленных от системных патогенов коллекций, в том числе криоколлекций;
- регенерации растений после криоконсервации;

- ускоренном размножении единичных экземпляров хозяйственно полезных генотипов;
- обмене растительным материалом с минимальными затратами на подтверждение карантинного соответствия;
- селекционных работах, в том числе получение гибридов при различных видах несовместимости родительских компонентов, размножении селекционного материала и т.д.
- оценке устойчивости сортов, гибридов и т. д. к патогенам, в первую очередь особо опасным для минимизации экологических рисков.

Существует несколько методов клонального микроразмножения. Различные авторы, проводя индивидуальные исследования по влиянию условий культивирования эксплантов на процессы морфогенеза, наблюдали разные ответные морфогенетические реакции на изменение условий выращивания, что в свою очередь привело к созданию новых классификаций методов клонального микроразмножения. Исходя из предложенных в литературе методов микроразмножения растений, этот процесс возможно осуществлять следующими путями:

- активация развития уже существующих в растении меристем (апекс-стебля, пазушные и спящие почки и интеркамерные зоны стебля);
- индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;
- индукция соматического эмбриогенеза;
- дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной тканях.

Основной метод, используемый при клональном микроразмножении растений, – это активация развития уже существующих в растении меристем, основывающийся на снятии апикального доминирования, что может быть достигнуто двумя путями:

- а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде;
- б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурина (кинетин), а также 2-изопентениладенин (2iP) и зеатин. Полученные таким образом побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.

Этапы клонального микроразмножения:

Этап 1. Введение в культуру *in vitro*. Цель – получение стерильного и жизнеспособного растительного материала в культуре *in vitro*. Размножение на этом этапе не является важным (рис. 1).

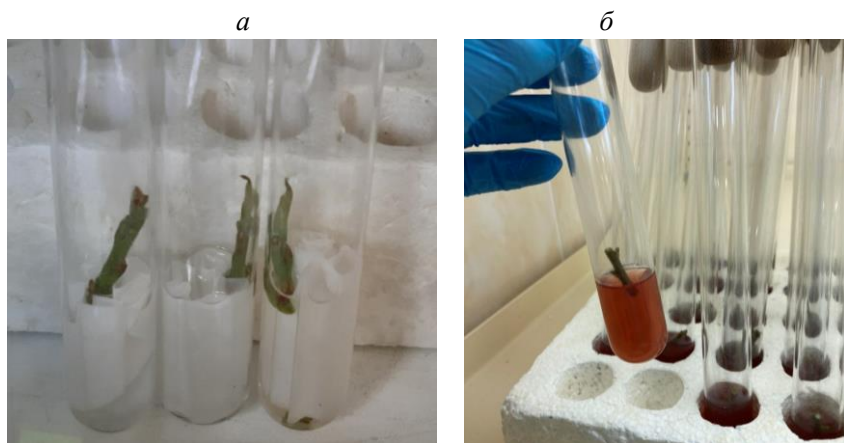


Рис. 1. Введение в культуру *in vitro* эксплантов яблони на жидкой питательной среде (а) и хризантемы на твердой питательной среде (б)

Подобрать оптимальную схему стерилизации растительных тканей – важная задача данного этапа. Экспланты должны быть жизнеспособными и стерильными (отсутствие грибной и бактериальной инфекции) (рис. 2)



Рис. 2. Инфекция в культуре *in vitro* и стерильная жизнеспособная культура тканей растений

Этап 2. Собственно размножение. Цель – увеличить число микропобегов. Для этого индуцируются меристематические центры, которые развиваются в почки и/или побеги (рис. 3).



Рис. 3. Растения-регенеранты яблони на этапе микроразмножения

Этап 3. Этап укоренения в условиях *in vitro*. Цель – получить максимальное количество укорененных растений-регенерантов. На этом этапе удлиняются побеги, индуцируются и развиваются корни (рис. 4).



Рис. 4. Растения-регенеранты хризантемы корейской на этапе укоренения в условиях *in vitro*

Этап 4. Адаптация к условиям *ex vitro*. Перенос в нестерильные условия. Цель – получить максимальное количество адаптированных растений к нестерильным условиям (рис. 5).



Рис. 5. Адаптация растений к условиям *ex vitro*

ПОДГОТОВКА ИСХОДНОГО РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА. СТЕРИЛИЗАЦИЯ

Получение стерильного исходного материала является сложной задачей, так как поверхностные ткани органов растений заражены эпифитными бактериями, грибами и их спорами. Правильный выбор стерилизующего вещества заключается в том, чтобы нейтрализовать эпифитную микрофлору и не повредить ткань растения. Кроме того, вещество не должно проникать в ткань и легко смываться.

Обычно режим стерилизации устанавливают экспериментально для каждого объекта. Однако существуют общие правила, которых следует придерживаться.

Перед стерилизацией ткань очищают от остатков земли, засохших листьев, кроющихся чешуи (*клубни, корнеплоды, подземные побеги*). Тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, затем некоторое время (60–40 мин) промывают проточной и ополаскивают дистиллированной водой. Такая предварительная подготовка намного снижает контаминацию поверхностных тканей.

Листья, побеги травянистых растений промывают теплой водой с мылом, затем проточной (30–40 мин) и споласкивают дистиллированной водой.

Стерилизация растительного материала

Обычно стерилизацию начинают с погружения растительного материала в 70%-ный этанол: листья, почки, семена погружают на несколько секунд (2–10). Корни, клубни, луковицы – на 1–2–5 мин. Иногда рекомендуют поверхность побегов, листьев и крупных семян протирать ватой, смоченной 96%-ным этанолом.

Обработка тканей этанолом разрушает восковой налет на листьях, усиливает действие стерилизующих веществ. Эффективность стерилизации заметно повышается при добавлении в стерилизующий раствор детергентов типа Tween-20 или Tween-80 (несколько капель на 1 л) или обычных моющих средств – стирального порошка, мыла.

Этиловый спирт часто применяют для предварительной стерилизации, протирая им поверхность материала или погружая материал на несколько секунд в 96 % спирт. Иногда такой стерилизации достаточно (ее используют при работе с плодами, семенами, побегами, завязями).

Для стерилизации интактных растений применяют большой набор различных стерилизующих веществ.

Наиболее распространены растворы, содержащие **активный хлор**: гипохлорит кальция и натрия, хлорная известь, хлорамины.

Гипохлорит натрия (NaCClO) применяют в виде 0,5–5 % растворов в течение 1–20 мин. Это вещество является клеточным ядом, поэтому время стерилизации и концентрацию подбирают экспериментально. Например, для изолированных зародышей используют 2–3 % раствор в течение 10–15 мин, а для сухих семян 3–5 % раствор в течение часа. Остатки гипохлорита натрия сначала удаляют 0,01н HCl, а затем восемь раз промывают дистиллированной водой.

В зарубежной литературе часто рекомендуют использовать коммерческий препарат **Хлорокс**. Это 5–25%-ный раствор гипохлорита натрия, содержащий следы перманганата. Гипохлорит натрия является клеточным ядом и после его применения необходима многократная промывка в стерильной дистиллированной воде.

Гипохлорит кальция ($\text{Ca}(\text{CClO})_2$) менее токсичен для тканей и находит широкое применение для стерилизации поверхностей самых различных органов растений в концентрации 90 г/л в течение 15–30 мин. Гипохлорит кальция (хлорная известь) используется в виде 5–7 % раствора для обработки почек, завязей, цветков, семян, побегов в течение 5–8 мин.

Хлорная известь, часто рекомендуемая для стерилизации растительных объектов, состоит почти из чистого гипохлорита кальция

(содержит 70 % активного хлора), ее используют в концентрации 50–90 г/л в течение 5–30 мин. Коммерческий препарат **нит-хлор** содержит до 70 % гипохлорита кальция и используется в 5%-ном растворе.

Хорошей стерилизующей способностью обладает смесь равных объемов растворов хлорной извести и кальцинированной соды. Такая смесь содержит 2 % активного хлора и 1,5–3 % щелочи и обладает поверхностной активностью и моющей способностью. Используют свежеприготовленный раствор.

Для менее загрязненных объектов применяют растворы **хлорамина** в концентрации 0,2–6–10 % в течение 20–30 мин.

Хлорамин применяют в концентрации 1–6 %. Пыльники и молодые зародыши обрабатывают в течение одной – трех минут, сухие семена – 30–60 мин, затем промывают стерильной дистиллированной водой два – три раза.

Для приготовления стерилизующих растворов, содержащих хлор, определенную навеску препарата растворяют в дистиллированной воде, взбалтывают 8–10 мин и фильтруют через бумажный фильтр. Раствор используют однократно сразу же после приготовления.

Ртутные препараты:

Сулема – токсичное вещество, которое требует особой тщательности как при хранении, так и при подборе концентрации для отдельных объектов (рис. 6). Для стерилизации зародышей используют 0,1 % раствор в течение одной – трех минут, для корне- и клубнеплодов – до 10–20 мин.

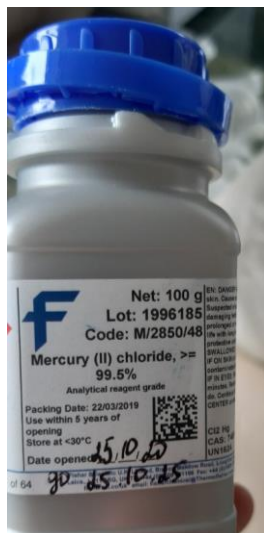


Рис. 6. Хлорид ртути (сулема) – стерилизующий агент

Диацид используется в 0,1–0,2%-ном растворе для стерилизации корнеплодов, семян, кусочков тканей, верхушечных меристем, изолированных зародышей, пыльников. Диацид готовят, растворяя отдельно 330 мг этанолртухлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (330 мл). Затем их смешивают и доводят объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента твин-80; хранят в плотно закрытой колбе в темноте. Диацид действует слабее сулемы и используется в концентрации 0,1 %.

Мертиолат используется в концентрации 0,1 %.

Фамосепт в разведении 1:9 при экспозиции 10–20 мин.

Ртутные препараты можно использовать для стерилизации 3–4 раза. Растительные ткани после стерилизации в ртутных препаратах необходимо 4–5 раз промыть в стерильной дистиллированной воде по 15–20 мин в каждой порции.

Окислители:

перекись водорода 10–50 %. Время действия 6–10–20 мин. Перекись водорода менее всего повреждает растительные ткани и после нее отпадает необходимость продолжительной отмывки, так как она быстро разлагается.

перманганат калия,

препараты серебра,

0,8–1% AgNO_3 экспозицией 10–12 мин.

Антибиотики применяют для стерилизации растительного материала, инфицированного бактериями (ткани корончатогалловых опухолей). Наиболее часто применяют стрептомицин и тетрамицин 10–80 мг/л, ампициллин 200–400 мг/л, левомицитин, канамицин и др. (рис. 7).



Рис. 7. Антибиотики Канамицин и Цефотаксим, используемые в культуре *in vitro*

Часто для достижения оптимальных результатов стерилизации растительных тканей используют комбинации нескольких стерилизующих веществ:

этиловый спирт (30 с – 1 мин) – сулема (5– 10 мин) – пергидроль (10 мин);

этиловый спирт (30–40 с) – гипохлорит натрия (кальция) (10–15 мин) – пергидроль (10 мин);

этиловый спирт (40–60 с) – сулема (или диацид) (5–8 мин)– хлорная известь (10–15 мин) – пергидроль (5–8 мин).

В некоторых случаях рекомендуется использовать различные концентрации одного какого-либо агента. Так, при стерилизации тканей орхидей используют 10%-ный Хлорокс в течение 10 мин, затем после удаления части листьев 5%-м Хлорокс – 5 мин, далее стерилизуют отдельные почки в 1%-ном растворе –1 мин и высаживают ткань без промывания в стерильной воде. Весьма эффективным стерилизующим веществом является 0,8–1%-ный раствор азотнокислого серебра (AgNO_3) при экспозиции 10–12 мин.

После стерилизации материал переносят в стерильную дистиллированную воду, выдерживают десять минут, затем меняют воду еще два раза, выдерживают 15–20 мин. В стерильных чашках Петри или на стерильных листах бумаги обрезают стерильным скальпелем концы сегментов исходного материала, где клетки могут быть повреждены, и из средних зон нарезают кусочки тканей, которые высаживают на инициальную среду для образования каллусов. При стерилизации отрезков стебля или верхушечных почек в растворах сулемы или гипохлорита рекомендуется парафинировать срезы, чтобы стерилизатор не проник в сосуды, что может привести к интоксикации ткани.

Техника стерилизации. Стерилизацию проводят в стерильных химических колбах. В колбу очищенный и промытый растительный материал в боксе помещают на несколько секунд (или 1–2 мин) 70%-ный этиловый спирт. Если объекты всплывают, их накрывают стерильным ватным тампоном для лучшего контакта со стерилизующим раствором. Мелкие семена, плоды, почки стерилизуют в мешочках из плотной ткани (семена орхидей) или марли, последовательно проводя все операции стерилизации и промывки.

Стерильный растительный материал сохраняют в стерильных чашках Петри до начала вычленения и посадки на питательные среды.

Работающий должен вымыть руки с мылом и протереть их спиртом, надеть стерильный халат.

Факторы, влияющие на ход регенерации растений. Реализация морфогенетических потенциалов высаженных эксплантатов зависит от

условий культивирования: регулируемого освещения, фотопериода, контролируемой температуры, без резких перепадов низкой и высокой температуры, относительной влажности воздуха, соответствующей питательной среды.

Температура оказывает значительное влияние на рост и регенерацию изолированных тканей растений, способствуя активации метаболических процессов. Для большинства тканей температурный оптимум составляет 24–28 °C ($\pm 2-3^\circ$). Однако существуют различия между растениями в отношении их требований к условиям температуры. Так, образование луковичек у *Lilium auratum* наиболее эффективно при температуре 20 °C и постепенно снижается при повышении температуры до 30 °C. Охлаждение эксплантатов, предшествующее культивированию ткани гладиолуса, улучшает ее регенерационную способность.

Низкие температуры (15–18 °C) в течение 2 нед. необходимы для индукции образования побегов в культуре черешков бегонии

При выращивании тканей теплолюбивых тропических растений температуру культивирования следует увеличивать до 25–28 °C.

Условия освещения и фотопериод. Обычно изолированные ткани растений выращивают при освещении люминесцентными лампами с учетом требований материнского растения к интенсивности освещения и фотопериоду.

Т. Мурасиге рекомендует на первом и втором этапе микроразмножения содержать ткани при 1000–5000 лк и 14–16-часовом фотопериоде. Такие условия освещения способствуют инициации побегов и корней у большинства растений. Прямой солнечный свет, как правило, угнетает рост изолированных тканей и вызывает некрозы. Многие исследования свидетельствуют, что интенсивность освещения играет важную роль в индукции органогенеза. Увеличение освещенности с 3 до 6 клк способствовало интенсивному побегообразованию в культуре *Begonia hiemalis*.

Интенсивность и характер роста изолированных тканей зависят и от **спектрального состава света**. Так, белый, красный и голубой свет более интенсивно индуцирует образование почек у ткани *Heloniopsis orientalis*, чем зеленый. Красный свет стимулирует образование цветочных почек у ткани табака, а темнота – образование корней. Адвентивные почки в каллусе табака индуцируются ультрафиолетовым, голубым и фиолетовым светом. У эксплантатов салата красный свет вызывает образование побегов.

Длительность освещения влияет на морфогенез ткани и зависит от вида интактного растения. Для ткани *Helianthus* оптимален фотопериод 12 ч, способствующий морфогенезу побегов. В каллусе герани максимальное количество почек образуется при 16-часовом фотопериоде,

уменьшение или увеличение продолжительности освещения угнетает морфогенез.

Есть растения, ткани которых не реагируют на изменения фотопериода. Апикальные меристемы *Pharbitis nil* растут и образуют побеги при фотопериоде от 16 до 24 ч и морфогенез тканей не ингибируется постоянным освещением. Для большинства культур рекомендуется фотопериод в пределах 14–15 ч.

Тип эксплантата. Источник эксплантата важен в проявлении его регенерационного потенциала. Ткани различного происхождения от растений, многих таксономических групп успешно вводятся в культуру. Для клонального микроразмножения практически пригодны все меристематические ткани, характеризующиеся высокой метаболической активностью. Эти ткани лучше других приживаются в культуре и сохраняют признаки клона. Они размещаются в апексах побегов, терминальных и латеральных почках, кончиках или влагалищах листьев (или по всей ткани молодых листьев), на черешках листьев и цветков, чешуях луковиц, спящих почках побегов и цветоносов, цветочных почках и частях цветка (рис. 8 и 9). Тотипотентность присуща всем растительным клеткам, но, по мнению Т. Мурасиге, ее проявление ограничивается относительно небольшим количеством клеток, называемых меристемоидами, морфогенно компетентными клетками, которые дают начало эмбриоидам, побегам и корням.



Рис. 8. Междоузлия с двумя почками хризантемы корейской – эксплант для введения в культуру *in vitro*



Рис. 9. Виды эксплантов, используемые в клональном микроразмножении
(Источник: Калинин, Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980. – С. 52.)

Регенерация растений в культуре тканей возможна только тогда, когда экспериментально можно будет управлять трансформацией немеристематических клеток в меристематические. Поэтому первоочередной задачей является вычленение той части растения, в которой лучше других проявляется морфогенетический потенциал.

Органогенез в культуре тканей обычно зависит от размеров эксплантата. Чем меньше эксплантат, тем ниже его регенерационная способность. Большие эксплантаты с участками паренхимы, проводящей тканью и камбием нередко спонтанно индуцируют стеблевые почки независимо от концентрации фитогормонов в питательной среде. Вместе с тем отмечается, что небольшие участки гомогенных тканей, взятых из эпидермальных и субэпидермальных тканей табака и освобожденных от коррелятивного влияния других тканей, могут непосредственно образовывать сложные структуры – цветки, почки, корни.

Экспланты – апикальные верхушки размером 0,1–0,2 мм без листовых примордиев (рис. 10). Приживаемость таких апексов очень низка (до 1–10 %). Этот тип экспланта используется если целью работы стоит оздоровление растений от вирусных заболеваний.

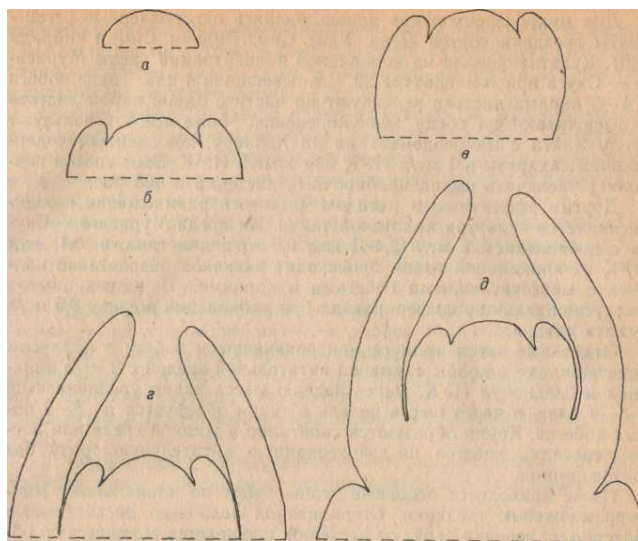


Рис. 10. Схематическое изображение эксплантатов гвоздики разных размеров: а – апекс; б – апекс с листовыми примордиями; в – апекс с субапикальной тканью; г – апекс без субапикальной ткани; д – апекс с листовыми примордиями, верхней парой листочков и субапикальной тканью (Источник: Калинин, Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980. – С. 59.)

Для массового клонального размножения используют апексы размером 0,1–0,5 см с несколькими листовыми примордиями и субапикальной тканью, которые обладают способностью регенерировать целые растения.

Размеры высечек из листовой пластинки 1×1 см², листовых черешков – 3–5 мм.

Успех регенерации нередко зависит и от положения эксплантата на материнском растении. Апексы, вычлененные из терминальных почек, обладают большим морфогенным потенциалом, чем апексы латеральных почек.

Основания луковичных чешуи и цветоноса у некоторых растений из семейства амариллисовых обладают более высокой регенерационной способностью, чем остальные части растений.

У многих растений морфогенная способность в культуре ткани ограничена периодом вегетативного роста, возрастает во время бутонизации и цветения и снижается в период покоя. Ткани, взятые в период покоя, интенсивнее образуют корни. Тогда как эксплантаты, вычлененные в период активного роста материнских растений, пролиферируют почки и побеги.

Отмечено, что ткани, выделенные весной, дают наибольший процент регенерированных растений. Эксплантаты чешуи луковиц *Lilium* sp., вычлененные весной или летом, пролиферируют каллус на питательной среде без добавления ауксинов, в другое время года индуцировать образование каллуса можно только при добавлении регуляторов роста.

В основе изменений морфогенетического потенциала, связанного с временем года, лежат преобразования физиологического состояния растений в процессе вегетации, накопление эндогенных регуляторов роста в его тканях. Многолетние растения, так же как и однолетние снижают тотипотентность в зависимости от времени года.

Большое значение имеет возраст материнского растения, чем моложе интактное растение, тем выше его морфогенный потенциал. Поэтому для введения в культуру часто используют ювенильные растения. У древесных наилучший результат дают эксплантаты, взятые от сеянцев.

Физиологический возраст эксплантата также влияет на его регенерационную способность. Так, эксплантаты молодых листьев эхеверии иницируют только корни, листья среднего возраста – стебли и корни, а старые листья регенерируют стеблевые почки. Только молодые листья антуриума способны к пролиферации каллуса и морфогенезу растений. Эксплантаты старых листьев темнеют и погибают.

Способность эксплантатов к регенерации зависит от вида растения. Замечено, что виды растений, хорошо размножающихся вегетативно, обычно проявляют высокую регенерационную способность в культуре *in vitro*. Среди видов, обладающих значительным морфогенетическим потенциалом, представители семейств Solanaceae, Umbelliferae, Cruciferae, Compositae трудно регенерируют растения из семейства Gramineae.

Генотип материнского растения значительно влияет на ход клонального размножения. В пределах вида некоторые генотипы размножаются легче, чем другие. Влияние генотипа на регенерационные процессы растений проявляется на протяжении всех этапов микроразмножения. Исследования Ю. Г. Попова с изолированными апексами малины и земляники показали, что в зависимости от сорта процент образующихся регенерантов колеблется от 15 до 90 %. Сортową специфичность к составу питательной среды проявляют эксплантаты винограда, орхидей, гвоздики и многих других растений.

Например, на этапе введения в культуру *in vitro* эксплантов винограда сорта Regent и Агат донской проявляли большую активность к регенерационным процессам (рис. 11).

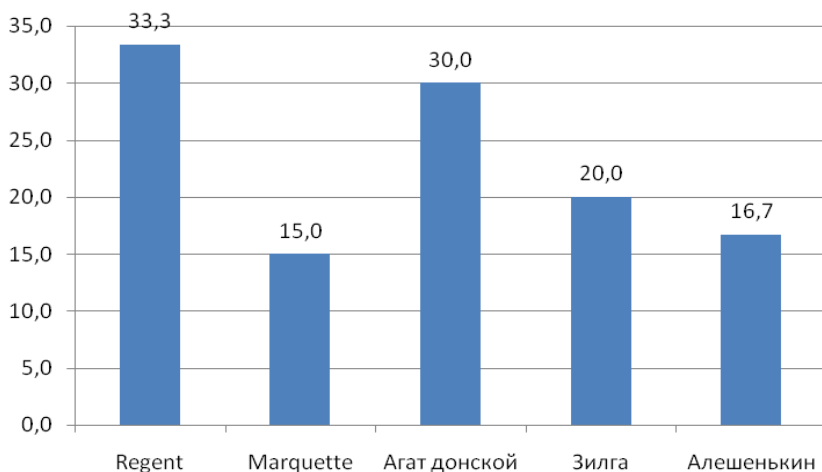


Рис. 11. Доля нормально развитых эксплантов в зависимости от генотипа растений сортов винограда

На этапе укоренения в условиях *in vitro* активность корнеобразования и рост корневой системы с высокой степенью достоверности ($p < 0,001$) определялся также генотипом растения (табл. 1).

Таблица 1

Влияние генотипа растений сортов винограда на эффективность ризогенеза в условиях *ex vitro*

Сорт	Доля укорененных растений, % $p < 0,001$	Средняя длина стебля, см $p < 0,001$	Средняя длина максимального корня, см $p < 0,001$	Средняя длина основной массы корней, см $p < 0,001$
Bianca	61,1b	4,4c	14,4b	9,7a
Агат донской	91,7a	7,9a	19,9a	8,5c
Зилга	90,7a	6,0b	19,9a	7,2b

Морфогенетический потенциал изолированных тканей зависит от продолжительности культивирования.

В процессе культивирования могут возникать нежелательные явления в культуре *in vitro*: выделение фенолов на этапе введения как реакция на стрессовые условия (рис. 12) витрификация растений-регенерантов (оводнение клеток) (рис. 13).



Рис. 12. Витрификация растений-регенерантов сорта Mars на питательной среде с тидиазуроном

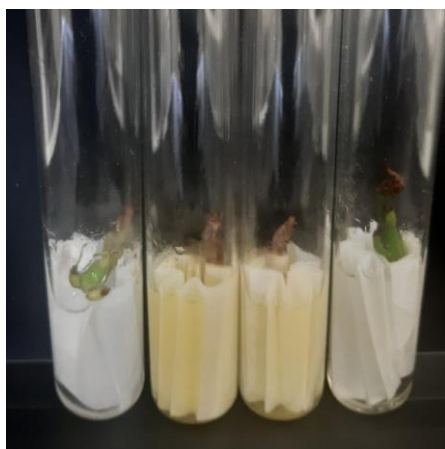


Рис. 13. Выделение фенолов эксплантами яблони на жидкой питательной среде

Задание 1. Ввести в культуру *in vitro* экспланты растений:

1. Срезать экспланты (листовые пластинки) с маточного растения.
2. Под проточной водой помыть срезанные части растений (листья или стебли). Положить полученные экспланты в подготовленный марлевый мешочек и закрепить его, чтобы экспланты при стерилизации не выпали в стерилизующий раствор.

3. Простерилизовать растительный материал.

Схема стерилизации:

1. Работа выполняется в ламинарном боксе. Поместить растительный материал в стерильную колбу для дальнейшей стерилизации.
2. Схема стерилизации в ламинарном боксе:
 - Этиловый спирт 70 % 5 с,
 - Перекись водорода 50 % экспозицией 7 и 10 мин,

- Стерильная дистиллированная вода 10 мин по 3 раза.

3. Разрезать лист фиалки на маленькие кусочки, размером 0,5 см на 0,5 см. Манипуляции с растительным объектом проводят на стерильном коврике, сделанном из нарезанной бумаги, либо на стерильных чашках Петри. Срезы эксплантов хризантем - междоузлия с почками – обновить с помощью скальпеля, чтобы удалить ткань, которая контактировала со стерилизующими агентами.

4. С помощью стерильного пинцета поместить экспланты на питательную среду Мурасиге – Скуга. Ввести в культуру *in vitro* 30 и более эксплантов.

Задание 2. Рассмотреть виды эксплантов, используемые для введения в культуру *in vitro*:

- апикальная меристема,
- почка,
- щиток,
- листовые пластины,
- микрочеренки: междоузлие с почкой и листовым черешком.

Задание 3. Анализ результатов работы проводим через 4 недели культивирования эксплантов. Результаты вносим в таблицу.

Генотип растения	Экспозиция перекиси водорода, мин	Количество посаженных эксплантов, шт.	Доля некроза, %	Доля инфицированных эксплантов, %	Доля жизнеспособных эксплантов, %
Фиалка узумбарская	7				
	10				
Хризантема корейская	7				
	10				

Сделать вывод о влиянии длительности воздействия основного стерилизующего агента (перекиси водорода) и генотипа растений на показатели развития эксплантов на этапе введения в культуру *in vitro*: доля некротизированных эксплантов, доля инфицированных эксплантов и доля жизнеспособных и стерильных эксплантов.

Лабораторная работа 3

Методы криоконсервации растительного материала. Криоконсервация гермоплазм как способ сохранения генетических ресурсов. Метод инкапсуляции-дегидратации

Цель работы – ознакомиться с одним из методов криосохранения геноресурсов растений.

Оборудование и реактивы для работы:

1. Объекты для работы – растения-регенеранты яблони или винограда для выделения меристем, которые культивировались в течение 1–4 недель в культуре *in vitro*.
2. Чашки Петри с агаризованной средой Мурасиге – Скуга (MS) для временного содержания меристем.
3. Жидкая среда MS с 0,75 М сахарозой для дегидратации инкапсулированных меристем (табл. 1).

Таблица 1

Состав жидкой среды MS с 0,75 М сахарозой
для дегидратации инкапсулированных меристем

Компоненты питательной среды		Концентрация мг/л
Макросоли	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	KH_2PO_4	170
Хелат железа	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
	$\text{Na}_2 \text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
Микросоли	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
	H_3BO_3	6,2
	KI	0,83
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Хлорид кальция		332 мг
Витамины	B1	0,5
	B6	0,5
	PP	0,1
Сахароза		312,3 г
pH		5,7

4. Жидкая среда MS без кальция, с 3%-ным альгинатом и 0,75 М сахарозой (табл. 2).

Таблица 2

Состав жидкой среды MS без кальция,
с 3% альгинатом и 0,75 М сахарозой

Компоненты питательной среды		Концентрация мг/л
Макросоли	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	KH_2PO_4	170
Хелат железа	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
	$\text{Na}_2 \text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
Микросоли	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
	H_3BO_3	6,2
	KI	0,83
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Сахароза		256,8 г
pH		5,7
Альгинат натрия		30 г

5. Жидкая среда MS с 100 мМ хлоридом кальция для формирования альгинатных шариков (табл. 3).

Таблица 3

Состав жидкой среды MS с 100 мМ хлоридом кальция
для формирования альгинатных шариков

Компоненты питательной среды		Концентрация мг/л
Макросоли	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	KH_2PO_4	170
Хелат же- ле- за	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
	$\text{Na}_2 \text{ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
Микросоли	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
	H_3BO_3	6,2
	KI	0,83
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025

Компоненты питательной среды		Концентрация мг/л
Хлорид кальция		14,8 г
Витамины	B1	0,5
	B6	0,5
	PP	0,1
Сахароза		30 г
pH		5,7

6. Жидкая среда MS для регидратации шариков после оттаивания (табл. 4).

Таблица 4

Состав жидкой среды MS для регидратации шариков после оттаивания

Компоненты питательной среды		Концентрация мг/л
Макро-соли	NH_4NO_3	1650
	KNO_3	1900
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
	KH_2PO_4	170
Хелат железа	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,8
	$\text{Na}_2 \text{ ЭДТА} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	37,3
Микро-соли	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
	H_3BO_3	6,2
	KI	0,83
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
Хлорид кальция		332 мг
Витамины	B1	0,5
	B6	0,5
	PP	0,1
Сахароза		30 г
pH		5,7

7. Стерильные стаканчики объемом 50 мл для формирования альгинатных шариков.

8. Стерильные пипетки (пипетки Пастера) для формирования альгинатных шариков

9. Стерильное сито (стерильная марля) для удаления альгинатных шариков из раствора.

10. Стерильная чашка Петри со стерильной фильтровальной бумагой для подсушивания инкапсулированных меристем.

11. Среда MS для регенерации меристем в чашках Петри или планшетах.

12. Стерильные криопробирки (2 шт.).

13. Скальпели и пинцеты стерильные.

14. Спиртовка.

Задачи:

1. Познакомиться с методом инкапсуляции-дегидротации как с одним из принципов криосохранения растительных клеток и тканей.

2. Отработать алгоритм работы в стерильных условиях с живыми объектами.

В мировой практике в дополнение к традиционным методам сохранения генетических ресурсов широко используются различные методы криоконсервации образцов гермоплазмы в условиях *in vitro*.

В настоящее время для криосохранения растений используют жидкий азот (-196 °C) и его пары (-183–185 °C).

Для оценки эффективности криоконсервации эксплантов оценивают их жизнеспособность и регенерационную способность после оттаивания.

Криоповреждение клеток обусловлены двумя факторами:

1. Формирование и рост внутриклеточных кристаллов льда (при быстром замораживании) или образованием кристаллов льда в межклеточном пространстве (при медленном замораживании).

2. Процесс рекристаллизации при последующем оттаивании.

Для успешного замораживания растительной ткани и органов содержание свободной воды в клетках должно быть снижено до 20–30 %, так как при этом повышается вязкость цитозоля, которая препятствует образованию кристаллов льда, способных вызывать необратимые повреждения внутриклеточных мембран.

Криосохранение апикальных меристем – это процесс, состоящий из нескольких этапов:

1. Подготовка растительного материала

1.1. Введение растительного материала в культуру *in vitro* и получение асептической культуры

1.2. Микроклональное микроразмножение для получения достаточного количества асептического растительного материала

2. Изолирование апикальных меристем из растений, культивируемых в условиях *in vitro*.

3. Криосохранение апикальных меристем при температуре -196 °C с использованием криопротекторов (инкапсуляция-дегидротация, витрификация, медленное программируемое замораживание)

4. Длительное хранение растительного материала в жидком азоте.
5. Контроль жизнеспособности и регенерационной способности сохраняемого материала.

Для успешного криосохранения требуется достаточное количество стерильного и жизнеспособного материала.

Процесс криосохранения включает 4 основных этапа.

1. Введение в культуру *in vitro* (см. Лабораторная работа 2).
2. Микрклональное размножение для получения достаточного количества асептического растительного материала.
3. Изолирование апикальных меристем.
4. Криосохранение апикальных меристем.

Апексы побегов размером 0,8–1,0 мм изолируют из асептических растений-регенерантов, культивируемых в течение 3–4 недель. Апексы побегов состоят из непосредственно апикальной меристемы (4–5 слоев клеток) и 2–3 листовых примордиев. Для удобства изложения в дальнейшем мы будем использовать термин апикальные меристемы.

Изолирование апикальных меристем проводят в асептических условиях ламинарного бокса с использованием бинокулярного микроскопа и специальных инструментов для выделения.

Для предотвращения пересыхания растительных тканей изолирование меристем осуществляют на бумаге, смоченной стерильной дистиллированной водой.

Криосохранение апикальных меристем

Выделяют три типа криопротекторов по проникающей способности и функциям:

1. **Непроникающие через клеточную стенку** (ПЭГ₆₀₀₀, ПВП, полисахариды и белки) – создают защиту от механических повреждений, так как концентрируются в межклеточном пространстве и снижают скорость роста кристаллов льда;

2. **Проникающие только через клеточную стенку** (олигосахариды, пролин, ПЭГ₁₀₀₀) – предотвращают повреждения мембраны растущими кристаллами льда и защищают цитоплазму от излишней дегидратации;

3. **Проникающие через клеточную стенку и мембрану клетки** (ДМСО, глицерол, этиленгликоль) – оказывают влияние на точку замерзания цитозоля, выравнивают осмотическое давление и таким образом оказывают стабилизирующее действие на клетки.

Холодовая акклиматизация растений *in vitro*. Одним из способов повышения эффективности криосохранения является холодовая акклиматизация (закаливание) растений *in vitro*, обычно заключающаяся в культивировании их в течение одной или нескольких недель при

положительной низкой температуре в темноте или условиях короткого дня.

Для холодовой акклиматизации плодовых культур в условиях *in vitro* в основном применяют постоянную температуру +5 °С с 8-часовым освещением или + 4 °С при культивировании в темноте. Однако сравнение различных температурных режимов закаливания показало, что использование переменных в течение суток температур (+22°/-1 °С) значительно увеличивало процент выживаемости меристем после замораживания в жидком азоте.

Группы исследователей рекомендуют проводить холодовое закаливание побегов *in vitro* в климатической камере при переменных температурах (8 час при 22 °С освещенность 10 мкмол*м⁻²*с⁻¹/16 час, в темноте при -1 °С). Оптимальная длительность закаливания для различных культур варьирует от 1 до 4 недель. Для смородины достаточно 1–2 недель, для малины необходимо 2–3 недели, для яблони – 3–4 недели закаливания.

Методы криосохранения апикальных меристем. В настоящее время глубокое замораживание клеток тканей и органов получило широкое распространение в медицине и животноводстве. Трудности криосохранения гермоплазмы растений связаны с особенностями строения их клеток, отличающихся большими размерами, сильной вакуолизацией и, следовательно, большим содержанием воды.

В связи с этим, развитие криогенного способа хранения растительного материала было связано, прежде всего, с разработкой методов, позволяющих избежать механического повреждения мембран внутриклеточными кристаллами льда и чрезмерного обезвоживания клеток, возникающих при формировании льда.

Основные методы криоконсервации:

- Медленное замораживание.
- Методы быстрого замораживания.
- Метод инкапсуляции-дегидратации.
- Метод витрификации.
- Дроплет-метод (дропплет-замораживание).
- Дроплет-витрификация.
- Метод Cryo-plate.

Практическая часть

Метод инкапсуляции-дегидратации

Метод инкапсуляции-дегидратации основан на технологии, используемой для получения искусственных семян. Апикальные меристемы заключают в альгинатный гель, что позволяет обезвоживать и подсушивать ткани, тем самым предотвращается образование кристаллов льда

внутри клеток. После частичной дегидратации инкапсулированные в альгинат апикальные меристемы помещают в криопробирки и быстро погружают в жидкий азот. Данный метод применяют для криоконсервации апексов плодовых культур.

Ход работы

Протокол метода инкапсуляции-дегидратации рассчитан на 2 дня.

1-ый день (1 этап работы). Выделение меристем и формирование альгинатных шариков.

1. Приготовить растения-регенеранты, культивируемые в условиях *in vitro*.

2. Выделить 25 меристем и для временного содержания поместить их в чашки Петри на твердую среду MS без гормонов (рис. 1).



Рис. 1. Выделение меристемы растений под микроскопом

3. В ламинаре подготовить следующие растворы:

15–20 мл жидкой среды MS с альгинатом в стаканчике объемом 50 мл;

25–30 мл жидкой среды MS с хлоридом кальция в стаканчике объемом 50 мл;

колбу со средой MS с 0,75 М сахарозой.

4. Стерильным шприцем или скальпелем перенести меристемы в раствор с альгинатом.

5. Стерильной пипеткой собрать меристемы из раствора альгината (не допускать пузырей) и переносить по каплям в жидкую среду с хлоридом кальция, формируя альгинатные шарики. Пипетку держать строго вертикально, чтобы образующиеся шарики были одинаковые по размеру и форме.

6. Оставить шарики в растворе хлорида кальция на 15–20 мин для за-
твердевания.

7. С помощью сита или стерильной марли собрать шарики и пере-
нести их в колбу со средой MS с 0,75 М сахарозой (рис. 2).



Рис. 2. Альгинатные шарики с меристемой внутри

8. Поставить колбу на качалку на 18 ч. В обучающем протоколе по-
ставим колбу электрическую мешалку на 30 мин.

**2-ой день (2 этап работы). Высушивание шариков и криосохране-
ние.**

1. С помощью сита собрать шарики и слегка подсушить их в чашке
Петри на стерильной фильтровальной бумаге в ламинарном боксе.

2. Разложить шарики по дну стерильной чашки Петри и оставить их
в ламинарном боксе для высушивания в потоке стерильного воздуха на
4 ч. Шарики не должны соприкасаться. Чашку Петри поставить ближе
к фильтру и не закрывать. В чашке Петри не должно быть излишней
влаги, при необходимости влагу убрать с помощью стерильной фильтро-
вальной бумаги.

3. После высушивания поместить 20 шариков в криопробирки (по
10 шт в каждую), криопробирки закрепить в держатели и погрузить в со-
суд Дьюара с жидким азотом минимально на 5-10 мин или оставить на
более длительный срок (рис. 3).



Рис. 3. Криопробирки с альгинатными шариками

4. Налить жидкую среду MS в маленькую стерильную чашку Петри, погрузить в нее 5 контрольных шариков на 5 мин для регидратации.

5. Поместить шарики в чашки Петри или планшеты на среду MS для регенерации так, чтобы меристемы соприкасались со средой.

6. После жидкого азота криопробирки оттаиваем в ламинарном боксе при комнатной температуре в течение 15 мин. Для опытных вариантов меристем повторить этапы 4 и 5.

7. В лаборатории криосохранения в течение 6 недель еженедельно следует проводить учет количества выживших меристем и регенерации растений. Данные следует заносить в таблицу каждую неделю.

Примечание: Успех метода инкапсуляции-дегидратации в значительной степени зависит от температуры в лабораторном помещении. Если температура в помещении выше или ниже рекомендованной (23–25 °C), то необходимо подбирать длительность культивирования альгинатных шариков на качалке и время их высушивания опытным путем, с учетом того, что оптимальное содержание воды в шариках для криосохранения должно быть около 20 %.

Методика определения содержания воды в альгинатных шариках

Приготовить по 10 альгинатных шариков без меристем для расчета относительной влажности после высушивания в течение 3, 4 и 5 часов (30 шариков)

1. Определить массу шариков (сырой вес).

2. Определить массу шариков через 3; 4 и 5 час высушивания в ламинар-боксе.

3. Определить сухой вес шариков (16 час в термостате при 103 °С). Шарика взвешивают в алюминиевых или стеклянных бюксах с крышкой. После нагревания в термостате охлаждают в эксикаторе с прокаленным силикагелем. Регенерировать силикагель при 160 °С в течение 6 час.

4. Содержание воды в тканях определяют как разницу между сырым весом (СырВ) и сухим весом (СухВ). Относительную влажность рассчитывают по формуле:

$$[(\text{СырВ} - \text{СухВ})/\text{СырВ}] \times 100 \text{ \%}.$$

Подобрать время высушивания альгинатных шариков, при котором относительная влажность будет около 20 %.

Вопросы для самоконтроля

1. Основная цель криосохранения – это....
2. Какие части живых организмов (микроорганизмов, растений, животных, человека) используют для криосохранения?
3. Какие проблемы необходимо обойти при подготовке клеток растений и животных к криосохранению, позволяющие повысить долю регенерирующих клеток? Какие способы используются для предотвращения проблем при криосохранении?

Рекомендуемая литература

1. Калинин, Ф. Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений / Ф. Л. Калинин, В. В. Сарнацкая, В. Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
2. Anis, M., Ahmad, N. Plant tissue culture: Propagation, conservation and crop improvement. Springer Singapore, 2016. 621 p.
3. Молканова О. И., Васильева О. Г., Коновалова Л. Н. Научные основы сохранения и устойчивого воспроизводства генофонда растений в культуре *in vitro* // Вестник Удмуртского университета. Биология. Науки о земле. – 2015. – Т. 25, № 2. – С. 95–100.
4. Engelmann F. Plant cryopreservation: progress and prospects // *In vitro Cell Dev Biol Plant*. – 2004. – N. 40. – P. 427–433
5. Reed B.M., Kovalchuk I., Kushnarenko S., Meier-Dinkel A., Schoenweiss K., Pluta S., Straczynska K., Benson E. E. Evaluation of critical points in technology transfer of cryopreservation protocols to international plant conservation laboratories // *Cryo Letters* – 2004. – V. 25, No. 5. – P. 341–352.
6. Engelmann F Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity // *Vitro Cell Dev Biol Plant*. – 2011. –N 47 (1). – P. 5–16.
7. Кушнарченко С. В., Ковальчук И. Ю., Ромаданова Н. В., Турдиев Т. Т., Рид Б. М., Рахимбаев И. Р. Криосохранение апикальных меристем плодовых и ягодных культур: метод. рек. – Алматы, 2008. – 58 с.
8. Panis, B. Cryopreservation of *Musa* germplasm. – 2009. – 49 p.

Содержание

Введение.....	3
Лабораторная работа 1. Питательные среды для культивирования клеток и тканей растений. Требования к средам	4
Лабораторная работа 2. Клональное микроразмножение растений. Введение в культуру <i>in vitro</i> фиалки узумбарской.....	19
Лабораторная работа 3. Методы криоконсервации растительного материала. Криоконсервация гермоплазм как способ сохранения генетических ресурсов. Метод инкапсуляции-дегидратации.....	36
Рекомендуемая литература	46

Учебное издание

Красинская Татьяна Анатольевна

КЛЕТОЧНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

Методические указания

Редактор *Л. М. Корневская*

Компьютерная верстка *М. Ю. Мошкова*

Техническое редактирование *М. Ю. Мошкова*

Подписано в печать

Формат 60×90 1/16. Бумага офсетная.

Усл. печ. л. 3,05. Уч.-изд. л. 1,7.

Тираж 100 экз. Заказ №

Республиканское унитарное предприятие

«Информационно-вычислительный центр

Министерства финансов Республики Беларусь».

Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий

№ 1/161 от 27.01.2014, № 2/41 от 29.01.2014,

ул. Кальварийская, 17, 220004, г. Минск.