

**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**  
**БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ**  
**Кафедра физиологии и биохимии растений**

**Т. И. Дитченко**

**КУЛЬТУРА КЛЕТОК,  
ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ  
РАСТЕНИЙ**

**Методические рекомендации к лабораторным занятиям,  
задания для самостоятельной работы  
и контроля знаний студентов**

**МИНСК**  
**2007**

УДК  
ББК  
Д 49

Рекомендовано Ученым советом биологического факультета  
Белорусского государственного университета  
11 мая 2007 г., протокол №8

Рецензенты:

Ведущий научный сотрудник Отдела биохимии и биотехнологии растений Центрального ботанического сада НАН Беларуси,  
кандидат биологических наук *Е.В. Спиридович*;  
доцент кафедры микробиологии,  
кандидат биологических наук *О.В. Блажевич*

**Дитченко, Т. И.**

Д 49 Культура клеток, тканей и органов растений: Метод. рекомендации к лабораторным занятиям, задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов / Т. И. Дитченко. – Минск: БГУ, 2007. – 25 с.

Пособие включает ряд лабораторных работ, охватывающих основные разделы специального курса “Культура клеток, тканей и органов растений”, а также задания для самостоятельной работы и контроля знаний студентов. Цель пособия – закрепить знания, полученные студентами в лекционном курсе, активизировать самостоятельную работу студентов.

Пособие предназначено для студентов биологического факультета специальности 1-31 01 01 “Биология” направления 1-31 01 01-03 “Биотехнология”.

УДК  
ББК

© Дитченко Т. И., 2007  
© БГУ, 2007

## **Тема 1. ТЕХНИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ НА ИСКУССТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ**

### ***Лабораторная работа №1***

#### **Приготовление питательных сред для культивирования растительных клеток и тканей *in vitro***

Компоненты питательной среды для выращивания растительных клеток и тканей можно разделить на 6 основных групп, что обычно отражает порядок приготовления концентрированных маточных растворов: макроэлементы, микроэлементы, источник железа, витамины, источник углерода, регуляторы роста.

Основой всех питательных сред для культивирования растительных эксплантов является смесь минеральных солей. Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора – в виде фосфатов; серы – в виде сульфатов; а также растворимые соли  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ . Железо используется в виде хелатов (например,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  + этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или её натриевая соль Na ЭДТА (трилон Б)) – наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями.

В качестве источника углерода при выращивании гетеротрофных культур (калусов и суспензий) в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 20–60 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза) либо моносахариды (глюкоза, фруктоза, 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.

Для стимуляции биохимических реакций в культивируемых клетках используют витамины группы В ( $B_1$ ,  $B_6$ ,  $B_{12}$ ), С (аскорбиновая кислота), РР (никотиновая кислота), мезоинозит.

Для индукции каллусогенеза в состав питательных сред должны обязательно входить ауксины (вызывают клеточную дедифференцировку) и цитокинины (индуцируют деление дедифференцированных клеток). В случае индукции стеблевого морфогенеза содержание ауксинов может быть снижено или они могут быть полностью исключены. На средах без гормонов растут опухолевые и “привыкшие” ткани. Автономность по отношению к обоим классам экзогенных гормонов или к одному из них связана со способностью этих клеток продуцировать эндогенные гормоны.

В качестве ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д) в концентрациях 0,1-1,0 мг/л, нафтилуксусную кислоту (НУК) – 0,1-2 мг/л, индолилуксусную кислоту (ИУК) – 1-30 мг/л. Для индукции каллуса обычно необходимы высокие концентрации ауксинов (чаще это 2,4-Д), но при последующих пересадках их уменьшают.

В качестве цитокининов искусственные питательные среды могут содержать кинетин, бензиламинопурин (БАП), зеатин в концентрациях 0,001-10 мг/л. БАП и зеатин более активны по сравнению с кинетином в отношении поддержания роста изолированных тканей и индукции органогенеза.

Кроме ауксинов и цитокининов, отдельные питательные среды включают гибберелловую кислоту (ГК). Присутствие ГК в среде не является обязательным, но в некоторых случаях она стимулирует рост изолированной ткани.

В качестве биологических добавок для получения первичного каллуса можно использовать растительные экстракты (10-15% от общего объема среды): кокосовое молоко (жидкий эндосперм кокосового ореха), вытяжки из незрелых зерновок кукурузы (лучше в период молочной спелости), которые содержат цитокинины – зеатин и его производные, а также соединения с цитокининовой активностью (NN-дифенилмочевина).

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 рН 5,6-6,0. Обычно к среде добавляют 0,7-0,8% агара. В качестве уплотнителя и заменителя агар-агара используют полиакриламидные гели (биогели).

Разработано много питательных сред, но большинство из них представляют модификации основных: Мурасиге-Скуга (МС), Уайта, Шенка-Хильдебрандта, Гамборга (В5), Линсмайера-Скуга, Хеллера, Чапека и др.

Для искусственных питательных сред растворы макро- и микросолей готовят заранее и используют многократно. Это маточные (концентрированные) растворы. Их хранят в специальных условиях: макро- и микро-соли в холодильнике в сосудах с притертыми пробками при 0...+4°C. Витамины, фитогормоны, ферменты, растительные экстракты лучше хранить при –20°C в небольших по 5-10 мл сосудах с пробками. Маточные растворы макросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 10-40 раз, микросолей – в 100-1000 раз, витаминов – в 1000 раз.

Для приготовления маточного раствора макро- и микросолей каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, затем смешивают и доводят до нужного объема. В охлажденную смесь микросолей последним добавляют раствор солей молибдена, а в макросоли – раствор солей магния (для предотвращения выпадения осадка).

Маточный раствор хелата железа готовят и хранят отдельно от других солей. 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) спирта (ауксины, гиббереллины), 0,5-1 н HCl или KOH (цитокинины), затем подогревают до полного растворения (кроме абсцизовой кислоты и кинетина) и доводят до 10 мл объема (1 мл содержит 1 мг гормона). В холодильнике их можно хранить при температуре 4°C не более 1 мес.

Цель работы – на основе маточных растворов макросолей, микросолей, витаминов приготовить питательную среду Мурасиге-Скуга.

**Материалы и оборудование.** Химические стаканы, колбы, мерные цилиндры от 10 мл до 1 л, пробирки, пипетки от 0,01 мл до 10 мл или дозаторы, весы аналитические, пинцеты, ножницы, шпатели, электроплитка, магнитная мешалка, маточные растворы макро- и микросолей, витаминов, мезоинозит, глицин, сахароза, агар-агар.

## Ход работы

### Протокол приготовления питательной среды:

1. Для приготовления 1 л жидкой среды в стакан объемом 1 л помещают 30 г сахарозы, доливают дистиллированной водой примерно до 400 мл.

2. После растворения сахарозы добавляют необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей, мезоинозита, глицина, витаминов (таблица).

Таблица

**Питательная среда Мурасиге и Скуга**

Состав	Молярность в среде	Концентрация хранящегося раствора, мг/л	Объем хранящегося раствора на 1 л среды, мл	Условия хранения маточного раствора, °С
<b>Макроэлементы</b>				
KNO <sub>3</sub>	$1,88 \cdot 10^{-2}$	19 000	100	+4
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	$2,06 \cdot 10^{-2}$	16 500		
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	$1,50 \cdot 10^{-3}$	3 700		
CaCl <sub>2</sub>	$3,00 \cdot 10^{-3}$	4 400		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	$1,25 \cdot 10^{-3}$	1 700		
<b>Микроэлементы</b>				
MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	$9,99 \cdot 10^{-5}$	2 230	10	+4
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	$2,99 \cdot 10^{-5}$	860		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	$1,00 \cdot 10^{-4}$	620		
KJ	$5,00 \cdot 10^{-6}$	83		
<b>Микроэлементы</b>				
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	$1,00 \cdot 10^{-7}$	25	1	+4
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	$1,00 \cdot 10^{-6}$	250		
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	$1,00 \cdot 10^{-7}$	25		
<b>Источник железа</b>				
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	$1,00 \cdot 10^{-4}$	2 780	10	+4
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	$1,00 \cdot 10^{-4}$	3 730		
<b>Источник углерода</b>				
Сахароза	$8,80 \cdot 10^{-2}$	-	30 г/л	-
<b>Витамины и органические добавки</b>				
Мезоинозит	$4,90 \cdot 10^{-4}$	10 000	10	-20
Глицин	$3,00 \cdot 10^{-5}$	200		
Тиамин-НСI	$3,00 \cdot 10^{-7}$	500	1	
Пиридоксин-НСI	$2,40 \cdot 10^{-6}$	500		
Никотиновая кислота	$4,66 \cdot 10^{-6}$	500		

3. Дистиллированной водой доводят объем до 950 мл.

4. Измеряют рН раствора. С помощью 0,1 н NaOH или HCl доводят его до уровня 5,7–5,8.

5. Переносят среду в мерный цилиндр или колбу объемом 1 л и доводят объем до метки дистиллированной водой.

6. Разливают среду порциями (100–250 мл) в чистые конические колбы, добавляют агар, закрывают сверху алюминиевой фольгой и автоклавируют.

**Контрольные вопросы.**

1. Какие вещества входят в состав питательных сред, и какие функции они выполняют в культуре клеток и тканей растений *in vitro*?
2. Каковы особенности приготовления и хранения маточных растворов основных компонентов питательных сред?
3. В чем заключается порядок приготовления культуральных сред?

***Лабораторная работа № 2***

**Методы стерилизации при проведении работ с культурой  
изолированных клеток и тканей растений**

Одним из условий успешного культивирования изолированных органов, тканей, клеток и протопластов растений является соблюдение строгой стерильности, поскольку на искусственных питательных средах хорошо развиваются микроорганизмы, что представляет двойную опасность. Во-первых, в результате жизнедеятельности микроорганизмов может существенно измениться состав питательных сред, во-вторых, изолированные от растения ткани, клетки и в особенности протопласты легко повреждаются микроорганизмами. Поэтому все опыты проводят в стерильных условиях – ламинар-боксах. Стерилизации подвергается ламинар-бокс, инструменты, посуда, питательные среды, растительный материал.

***Стерилизация ламинар-бокса.*** Ламинар-боксы предназначены для культуры изолированных клеток, тканей и некоторых других работ, требующих стерильности. Стерильность обеспечивается с помощью бактериальных фильтров, через которые нагнетается воздух. За 20 мин до начала работы внутренний объем ламинар-бокса облучают ультрафиолетовыми лампами. Предварительно в ламинаре размещают спиртовую горелку, фарфоровый стакан с 96%-ным спиртом, колбы либо пробирки с питательной средой, которые протирают 70%-ным спиртом. Через 20 минут выключают УФ и включают биофильтры. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный халат, руки обрабатывают 70%-ным спиртом.

***Стерилизация посуды.*** Вначале посуду тщательно моют с использованием детергентов либо раствора двухромовокислого калия в серной кислоте. Вымытую посуду ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения простерили-

зованных предметов из воздуха, перед стерилизацией их заворачивают в оберточную бумагу (у стаканов и колб достаточно обернуть алюминиевой фольгой только горлышко). Затем посуду помещают в сушильный шкаф и прогревают при 160°С в течение 2 ч (с момента установки нужной температуры). За это время погибают не только бактерии, но и их споры. Еще более строгой стерилизации можно добиться под давлением в автоклаве, поскольку влажный жар более губителен для микроорганизмов и спор. Автоклавирование проводят под давлением 2 атм в течение 25-30 мин.

**Стерилизация инструментов.** Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл и т.д.) заключается в нагревании сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при 140°С. Металлические предметы нельзя автоклавировать: под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в ее процессе инструменты (пинцеты, скальпели, микробиологические петли) еще раз стерилизуют в ламинар-боксе, помещая их в фарфоровый стакан с 96%-ным этиловым спиртом и обжигая в пламени спиртовки. **Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции.** Перед повторным применением его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь.

**Стерилизация питательных сред.** Питательные среды, не содержащие термолабильные компоненты, стерилизуют автоклавированием либо путем двукратного кипячения с интервалом в несколько часов. Органические жидкости, не выносящие нагревания, освобождаются от бактерий при пропускании через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

**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 спирт (70%-ный раствор на 1 мин). Предварительная стерилизация семян – более длительная процедура, зависящая от степени их загрязненности. Выделяют три группы семян: 1 – с очень незначительной зараженностью поверхности микроорганизмами, 2 – с зараженностью только наружной поверхности семян, 3 – с присутствием микроорганизмов на поверхности и внутри семени.

Первую группу легко обеззаразить любой стерилизующей обработкой. Чаще всего это семена пшеницы, сорго, капусты. Вторая группа



требует более тщательной поверхностной очистки. Семена промывают в мыльной воде, в растворе  $\text{KMnO}_4$ , 70%-ном спирте; некоторые семена обрабатывают гипохлоритом натрия или кальция с последующей отмывкой стерильной водой. Эта группа включает латук, шпинат, редис, томат, кукурузу, морковь и др. Наконец, третья группа не может быть очищена до тех пор, пока внутренние ткани не будут обеззаражены. Это семена риса, подсолнечника, соевых бобов, сосны и некоторые другие. Процент семян с внутренним заражением микроорганизмами варьирует в зависимости от вида растения, продолжительности и условий хранения семян.

*Второй этап* – стерилизация. Предварительно простерилизованные ткани или органы 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 концентрация активного хлора составляет 0,5-1%). Наряду с ними применяют также 2-10%-ные растворы хлорамина; 0,1-1%-ные растворы сулемы; 5%-ный раствор формалина; 10%-ный раствор  $\text{CuSO}_4$ ; 5%-ный раствор фенола; 13–18%-ные растворы перекиси водорода; 70%-ный раствор этанола и т.п. Для стерилизации можно также использовать хлорсодержащие растворы отбеливателей, например, средство “Белизна” (разведение 1:2, 1:3) или дезинфицирующее средство “Domestos”. Антибиотики применяют для стерилизации растительного материала, внутренние ткани которого инфицированы бактериями. Наиболее часто применяют стрептомицин и тетрацилин в концентрациях 10-80 мг/л, ампициллин – 200-400 мг/л, левомецитин, каномецин и другие.

*Третий этап* – отмывание объекта от стерилизующего раствора (постстерилизация). При этом растительный материал промывают 3-4 порциями стерильной дистиллированной воды, выдерживая его в каждой порции в течение 10-15 мин.

Цель работы – освоить правила поддержания асептики при проведении работ с культурой изолированных клеток и тканей растений, получить стерильные семена и вырастить из них асептические проростки.

**Материалы и оборудование.** Семена моркови, ламинар-бокс, сушильный шкаф, пробирки с питательной средой МС, пинцеты, скальпели, флаконы с 96%-ным и 70%-ным этиловым спиртом, спиртовка, стерильная вата, колбы объемом 200-300 мл, чашки Петри, стаканчики на 100 мл, дистиллированная вода, гипохлорит натрия, хлорамин, дезинфицирующее средство “Domestos”.

## Ход работы

**Задание 1.** Простерилизовать инструменты, посуду и питательные среды, необходимые для проведения работ по выращиванию стерильных проростков.

1. Посуду тщательно отмыть в растворах детергентов, промыть 8-10 раз проточной водой. При необходимости поместить на несколько часов в хромпик (смесь серной кислоты с бихроматом калия), промыть теплой водой, затем дважды дистиллированной водой.

2. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 1 час при температуре 100-130°C.

3. Сухую посуду для хранения закрыть ватными пробками, фольгой, либо завернуть в бумагу.

4. Металлические инструменты, а также чашки Петри, завернутые в плотную бумагу, поместить в сушильный шкаф для стерилизации сухим жаром при температуре 160°C в течение 2 часов.

5. Штативы с пробирками или колбы, заполненные питательной средой, колбы с дистиллированной водой (закрытые фольгой), поместить в автоклав, автоклавируют 20 минут при давлении в стерилизационной камере 0,5 атм.

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

**Задание 2.** Освоить технику работы в ламинар-боксе.

Перед началом работы поместить в ламинар-бокс инструменты, посуду и материалы, необходимые для работы. Включить УФ-лампу. Через 20 минут выключить УФ и включить биофильтры. Зажечь спиртовку. Протереть руки и рабочую поверхность ламинар-бокса 70%-ным раствором спирта. При работе со стерильной посудой и материалом необходимо помнить о том, что **нельзя проносить руки над открытой стерильной поверхностью.**

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 в пламени спиртовки его горло, стерильным пинцетом берут крышку из фольги, обжигают с двух сторон и закрывают горло колбы. Когда фольга остынет, прижимают ее плотно к горлу сосуда. После

этого сосуд можно вынести из ламинар-бокса, сверху покрыть фольгу бумагой.

**Задание 3.** Провести стерилизацию семян для получения асептических проростков.

Семена моркови промыть мыльной водой, воду слить, а семена поместить в светло-розовый раствор  $\text{KMnO}_4$ . Через 20 мин слить раствор и залить семена 70%-ным этанолом на 1 мин. Все последующие процедуры проводят в ламинар-боксе.

Предварительно простерилизованные семена поместить в стаканчики, содержащие по 30 мл различных стерилизующих растворов (3% -ного гипохлорита натрия, 10%-ного хлорамина, дезинфицирующего средства “Domestos” разведение 1:2). Продолжительность стерилизации – 15 мин. По истечении указанного времени слить стерилизующие растворы, налить в стаканчики немного стерильной воды. Затем слить воду и налить новую ее порцию. Промывание водой продолжается в течение 1 ч со сменой через каждые 15 мин.

Проращивание семян может осуществляться двумя способами:

1. Семена прорастают на питательной среде. В этом случае работу выполняют следующим образом. Пинцет прокалить в пламени спиртовки, остудить и с его помощью перенести по 4-5 штук простерилизованных семян в пробирки, содержащие агаризованную среду МС без гормонов. Стерильно закрыть пробирки алюминиевой фольгой и поместить в термостат при температуре  $25^{\circ}\text{C}$ . Через 4-6 суток проверить чистоту посева и всхожесть семян. После прорастания семян перенести пробирки в условия фитостата с освещением 1000 лк и комнатной температурой.

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, разместить их равномерно, закрыть чашку и герметизировать ее клейкой лентой для уменьшения испарения. Чашку с семенами поместить в термостат при температуре  $25^{\circ}\text{C}$ . Через 4-5 сут после прорастания перенести семена стерильным пинцетом в пробирки или колбы с агаризованной питательной средой МС без гормонов и поместить в фитостат.

Сравнить эффективность разных способов стерилизации и проращивания семян. Определить процент инфицирования в результате неудовлетворительной стерилизации и процент прорастания семян.

Результаты оформить в виде таблицы.

Таблица

№	Стерилизующий агент	Способ проращивания семян	Эффективность стерилизации			Эффективность проращивания		
			Общее кол-во семян, шт	Кол-во стерильных семян, шт	% инфицирования	Кол-во стерильных семян, шт	Кол-во проросших семян, шт	% прорастания

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

**Контрольные вопросы.**

1. Каким образом осуществляется стерилизация посуды и инструментов для работы с растительными объектами в условиях *in vitro*?
2. Перечислите способы стерилизации питательных сред, содержащих и не содержащих термолабильные компоненты.
3. Каким образом осуществляется подготовка к работе ламинар-бокса?
4. Назовите основные правила работы в условиях ламинар-бокса.
5. Охарактеризуйте основные этапы проведения стерилизации растительных объектов.

**Тема 2. КУЛЬТУРА КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ**

***Лабораторная работа № 3***

**Получение каллусной ткани и ее субкультивирование**

Культура каллусных тканей представляет собой выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов растений. Образование и рост каллусной ткани контролируются фитогормонами из группы ауксинов и цитокининов. Под действием ауксинов происходит дедифференцировка, а под влиянием цитокининов – интенсивное деление, в результате которого образуется каллус. Каллусную культуру можно инициировать из разных частей растения: стеблей, корней, тканей клубня, листьев, зародышей и др. Такие фрагменты называются эксплантами. При полу-

чении каллусов из листовых эксплантов наиболее активное каллусообразование наблюдается у основания листьев, особенно в зоне, примыкающей к средней жилке.

Кривая роста каллусной ткани, также как и суспензионной культуры, имеет S-образный характер. Она состоит из следующих фаз: начальной (лаг-фазы), фазы логарифмического роста, во время которой идет активное деление клеток, замедления роста, стационарной и деградации. Для того чтобы сохранить способность к делению и дальнейшему росту, кусочки каллусной ткани переносят на свежую питательную среду. Этот прием носит название *пассирования* или *субкультивирования* тканей. Пассировать ткань можно неограниченное число раз. Однако при многократном его повторении возможно “привыкание”, которое выражается в приобретении автономности по отношению к гормонам и к значительному ослаблению способности каллусных клеток к регенерации целого растения.

Цель работы – освоить технику получения каллусных тканей и их субкультивирования.

**Материалы и оборудование.** Асептические растения табака, каллусная культура табака, стерильные чашки Петри, скальпель, пинцет, ножницы, спиртовка, спички, флаконы с 96%-ным и 70%-ным этанолом, чашки Петри со стерильной питательной средой МС, содержащей 2,4-Д (0,2 мг/л) и кинетин (0,2 мг/л) или ИУК (2 мг/л) и кинетин (0,2 мг/л), стерильная вода.

### Ход работы

В условиях ламинар-бокса необходимо с помощью стерильных ножниц отпрепарировать листья асептического растения табака и поместить их в стерильную чашку Петри. Для предотвращения подвядания листьев при последующей изоляции эксплантов рекомендуется добавить в чашку Петри небольшое количество стерильной воды. Простерилизованным скальпелем вырезать фрагменты у основания листьев, прилегающие к средней жилке, длиной 1,5-2 см, шириной 1 см. Для лучшего каллусообразования сделать надсечки (поранения) по всей поверхности листовых сегментов. Перенести подготовленные листовые экспланты в чашки Петри с питательными средами, содержащими в качестве ауксина 2,4-Д или ИУК. Чашки Петри запечатать парафином и поместить их в термостат при температуре 25°C. Через 4 недели рассмотреть результаты, сравнивая каллус, полученный на среде с 2,4-Д и на среде с ИУК. Результаты записать и зарисовать в тетради.

Для пересадки первичного каллуса или поддержания культуры используют скальпель, с помощью которого в чашке Петри необходимо отделить старые некротизированные участки. Затем разделить каллусную ткань на равные кусочки размером примерно 1×1 см и перенести их в чашки Петри со свежей питательной средой, соблюдая строгую стерильность. В каждую чашку поместить 5-7 кусочков каллуса.

Чашки Петри заклеить парафином или пищевой пленкой и поместить в термостат при температуре 25°C на 3-4 недели. В конце этого срока провести наблюдения и зарисовать чашки Петри с каллусной тканью.

#### **Контрольные вопросы.**

1. Дайте определение понятия “калусная ткань”?
2. Перечислите основные факторы необходимые для индукции процесса каллусогенеза?
3. Что такое дедифференциация? Какую роль играют ауксины и цитокинины в данном процессе?
4. Какое из соединений с ауксиновой активностью 2,4-Д или ИУК в большей степени способствует образованию каллуса?
5. Чем обусловлена необходимость пассирования каллусной культуры на свежую питательную среду?
6. С какой частотой обычно осуществляется субкультивирование каллусов?
7. Какие правила необходимо соблюдать при пересадке каллусной ткани на свежую питательную среду?

### ***Лабораторная работа № 4***

#### **Определение морфологических и ростовых показателей каллусных культур**

Каллусная ткань, выращиваемая поверхностным способом на агаре, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющих строго определенной анатомической структуры. Цвет ткани может быть белым, желтоватым, зеленым, красным и др. В зависимости от происхождения и условий выращивания каллусные ткани бывают рыхлые с сильно оводненными, легко отделяющимися друг от друга клетками; средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами; плотные, с зонами редуцированного камбия и сосудов. Как правило, в длительной культуре на средах, содержащих ауксины, каллусные ткани теряют пигментацию и становятся рыхлыми.

Рост каллусных культур можно охарактеризовать с помощью следующих показателей: индекс роста, удельная скорость и время удвоения биомассы.

Индекс роста определяют по формуле:

$$I = \frac{W_t - W_0}{W_0}$$

где  $W_0$  – начальная масса каллуса, г;

$W_t$  – масса каллуса в конце цикла выращивания, г.

Удельная скорость роста определяется согласно выражению:

$$V = \frac{W_t - W_0}{W_0 \cdot t}$$

где  $t$  – продолжительность культивирования, сут.

Время удвоения биомассы рассчитывают по формуле:

$$m = \frac{\ln 2}{V}$$

Цель работы – охарактеризовать каллусные культуры разных видов растений по морфологическим признакам и показателям роста.

**Материалы и оборудование.** Каллусные культуры разных видов растений в конце цикла выращивания, для которых известна начальная масса каллусов, весы, скальпель, пинцет.

### Ход работы

**Задание 1.** Охарактеризовать каллусные культуры различных видов растений с учетом таких признаков как цвет, возраст, плотность. Результаты представить в виде таблицы.

Таблица

Объект	Характеристики каллусов		
	цвет	Возраст (количество пассажей)	плотность

Проанализировать взаимосвязь между плотностью каллусов и продолжительностью их субкультивирований.

**Задание 2.** Произвести учет показателей роста каллусных культур.

Для этого необходимо определить массу каллусов в конце цикла выращивания. На основании имеющихся данных о начальной и конечной массе каллусных тканей произвести расчет индекса роста, удельной скорости роста и времени удвоения биомассы.

Результаты оформить в виде таблицы.

*Таблица*

Объект	Начальная масса каллуса, г	Масса каллуса в конце цикла выращивания, г	Продолжительность культивирования, сут	Индекс роста	Удельная скорость роста, сут <sup>-1</sup>	Время удвоения биомассы, сут

Сделать вывод о скорости ростовых процессов разных каллусных культур.

**Контрольные вопросы.**

1. Как определяется индекс роста, удельная скорость роста и время удвоения биомассы каллусных культур?
2. Какие преимущества имеет использование удельной скорости роста для характеристики ростовой активности каллусных тканей по сравнению с учетом индекса роста?
3. Как взаимосвязаны удельная скорость роста и время удвоения биомассы каллусов?

### **Тема 3. КУЛЬТУРА КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ**

#### ***Лабораторная работа №5***

#### **Получение и субкультивирование суспензионной культуры**

Суспензионные культуры получают из рыхлой каллусной ткани, помещая ее в жидкую питательную среду того же состава, что и для каллуса, и выращивают в колбах на качалке (100-120 оборотов/мин). Рекомендуется использовать жизнеспособную, интенсивно пролиферирующую каллусную культуру, которая легко распадается на небольшие клеточные агрегаты и отдельные клетки.

Максимальный объем инокулята (критическая концентрация клеток в суспензии), обеспечивающий клеточное размножение в суспензии,



обычно составляет 10-20% от общего объема суспензии в начале культивирования. Повышенные количества инокулята приводят к угнетению роста клеточной популяции вследствие недостатка кислорода и накопления в среде токсических продуктов метаболизма.

Длительность первого цикла выращивания суспензии обычно равна 15-20 дней в зависимости от вида растения, из которого она была получена, состава среды, скорости ее перемешивания. В течение этого времени часть клеток отмирает, происходит дезагрегация каллуса и интенсивное деление живых клеток. Последующие циклы сокращаются до 2 недель. Суспензию рекомендуется пересаживать после появления на стенках колбы ободка из живых клеток.

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 стационарной фазе роста, ламинар-бокс, стерильные колбы с жидкой средой МС, содержащей ИУК, 2,4-Д и кинетин, скальпель, пинцет, стерильные стаканы объемом 50-100 мл, воронка, сито с диаметром пор 500 мкм.

### Ход работы

Работу проводят в асептических условиях. Для получения первичной суспензии кусочки каллуса переносят прокаленной и остуженной лопаткой в колбу с жидкой средой МС из расчета 3-5 г ткани на 50-100 мл среды. Необходимо использовать только молодой, активно растущий, светлый каллус, отбрасывая побуревшие старые участки. Объем суспензии должен составлять 10-20% объема колбы (например, в колбу объемом 500 мл наливают 50-100 мл среды).

Колбу после переноса каллуса закрывают предварительно обожженной крышкой из фольги, а сверху крышкой из целлофана или бумаги, помещают на качалку со скоростью перемешивания 120 об/мин в термостат с температурой 25°C. Если в течение первых нескольких суток среда становится мутной, это признак бактериального заражения во время инокуляции.

Пересев суспензии можно осуществлять одним из следующих способов.

1. Дать отстояться суспензии 2-3 мин (для осаждения крупных агрегатов) и перенести определенный ее объем (в зависимости от объема приготовленной питательной среды) в колбу со свежей средой.

2. Профильтровать суспензию через сито с диаметром пор 500 мкм. После полного оседания клеток слить надосадочную жидкость, а к оставшейся суспензии добавить свежую питательную среду.

Пересадив суспензию одним из указанных способов, обжечь горлышко колбы, закрыть ее предварительно обожженной фольгой, а сверху бумагой и поставить колбу на качалку до следующей пересадки.

#### **Контрольные вопросы.**

1. Назовите основные способы получения суспензионных культур.
2. Какие требования предъявляются к каллусным тканям, используемым для инициирования суспензионных культур растительных клеток?
3. Какова средняя продолжительность ростового цикла суспензионных культур?
4. Каким образом осуществляется субкультивирование клеточных суспензий?

### ***Лабораторная работа №6***

#### **Оценка жизнеспособности клеток и степени агрегированности суспензионных культур**

При работе с культурами растительных клеток и тканей необходимо учитывать их жизнеспособность. О жизнеспособности клеток можно судить по движению цитоплазмы, по степени проницаемости плазматической мембраны для красителей, по активности ферментов и др.

Цитологические способы окрашивания клеток основаны главным образом на оценке нативности и проницаемости плазмалеммы. Прижизненные красители, такие как метиленовый синий, клетки не убивают и через оболочки живых клеток в цитоплазму не проникают. Метод основан на том, что при кратковременном воздействии раствора красителя на растительные клетки у живых клеток окрашиваются только наружные слои клеточной стенки, а у погибших краситель проникает внутрь клетки, окрашивая цитоплазму и ее компоненты.

При определении жизнеспособности клеток с помощью нейтрального красного происходит окрашивание живых клеток в розовый либо красный цвет. Мертвые клетки при этом имеют оранжевую окраску аналогично фону среды, к которой предварительно добавляют небольшое количество слабого раствора щелочи. Метод основан на том, что метаболизирующие клетки растений характеризуются наличием градиента рН между вакуолью и цитоплазмой, при этом содержимое вакуоли имеет кислую реакцию (рН 5,5 или ниже). Нейтральный красный является кислотно-основным индикатором, у которого изменение цвета (от интенсивно красного до бледно желтого) происходит при сдвиге рН в пределах

значений от 6,8 до 8,0. Неионизированные молекулы нейтрального красного, преобладающие в слабощелочных растворах, легко проникают через биологические мембраны. В жизнеспособных клетках растений, помещенных в раствор красителя (рН ~ 8,0), нейтральный красный аккумуляется в вакуолях, что проявляется в интенсивной окраске клеток в красный цвет.

Для количественного определения жизнеспособности суспензии также используют вещества, участвующие в метаболизме клетки: флуоресцеиндиацетат расщепляется в клетке эстеразами с образованием флуоресцеина, дающего флуоресценцию цитоплазмы живых клеток. Активность эстеразы определяют на спектрофотометре. Окрашивание солями тетразолия позволяет определить интенсивность дыхания клеток.

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

Цель работы – определить жизнеспособность клеток и степень агрегированности суспензионных культур.

**Материалы и оборудование:** суспензионная культура, 0,025%-ный раствор метиленового синего, 0,1%-ный раствор нейтрального красного, пипетка, стеклянная палочка, камера Горяева, микроскоп.

## Ход работы

### **Задание 1.** Определение жизнеспособности клеток.

Для определения жизнеспособности клеток суспензионной культуры с помощью метиленового синего определенную навеску клеток (0,1 г) переносят в пробирку и добавляют 3 мл 3%-го раствора сахарозы и 0,5 мл 0,025% метиленового синего. Образцы инкубируют 3 мин при комнатной температуре. Затем отмывают клетки дистиллированной водой от избыточного и несвязанного красителя до прозрачного раствора путем центрифугирования. С помощью пипетки переносят небольшое количество суспензии на предметное стекло и рассматривают под микроскопом.

Для определения жизнеспособности клеток суспензионной культуры с помощью нейтрального красного определенную навеску клеток (0,1 г)

переносят в химический стаканчик и добавляют 2 мл 3%-го раствора сахарозы, 0,8 мл 0,1%-ного нейтрального красного и 1,2 мл 0,01 М NaOH до получения желтоватой окраски раствора. Через 20 мин пробу переносят на предметное стекло и рассматривают под микроскопом для определения соотношения окрашенных и неокрашенных клеток. Живыми считаются клетки, цитоплазма которых прокрасилась в течение 20 мин.

**Задание 2.** Определение степени агрегированности суспензионной культур.

Приготовить препарат суспензии, клетки которой предварительно были окрашены нейтральным красным (см. задание 1). Для этого автоматической пипеткой поместить каплю суспензии в счетную камеру либо на предметное стекло, накрыть покровным стеклом, излишки жидкости убрать фильтровальной бумагой. Поместить препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива и подсчитать клетки и агрегаты в 3-х полях зрения (просмотреть не менее трех препаратов).

Результаты записать в таблицу.

Таблица

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

Примечание: о – окрашенные клетки и агрегаты,  
н – неокрашенные клетки и агрегаты.

Один препарат зарисовать, описать морфологию клеток суспензии (форму, величину). Сделать вывод о степени агрегированности суспензии (какие фракции преобладают, %) и жизнеспособности клеток.

### Контрольные вопросы.

1. Каким образом можно определить жизнеспособности растительных клеток?
2. Назовите типы суспензионных культур в зависимости от степени их агрегированности.
3. Какие факторы оказывают влияние на степень агрегированности суспензионных культур?

## Тема 4. ДИФФЕРЕНЦИРОВКА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ

### *Лабораторная работа №7*

#### **Влияние фитогормонов на направление морфогенеза**

Существуют различные типы морфогенеза: соматический эмбриогенез и органогенез, который, в свою очередь, подразделяется на стеблевой, корневой и флоральный. При соматическом эмбриогенезе из клеток каллусной и суспензионной культур формируются биполярные зародышеподобные структуры, у которых развиваются стебелек и корешок. В случае стеблевого органогенеза образовавшийся побег пересаживают на среду с повышенным содержанием ауксинов. Если же морфогенез пошел по типу корневого органогенеза, то получить из корней побеги не удастся.

Индуктировать морфогенез в культуре каллусной ткани можно с помощью различных факторов: света, температуры, изменения состава питательной среды, и в первую очередь – изменения соотношения фитогормонов. В 1955 г. Скуг и Миллер предложили гипотезу гормональной регуляции в культуре клеток и тканей, которая сейчас известна, как ***правило Скуга-Миллера***: если концентрация ауксинов и цитокининов в питательной среде практически равны или концентрация ауксинов незначительно превосходит концентрацию цитокининов, то образуется каллус; если концентрация ауксинов значительно превосходит концентрацию цитокининов, то формируются корни; если концентрация ауксинов значительно меньше концентрации цитокининов, то образуются почки, побеги.

Каллусы с высоким морфогенетическим потенциалом обычно матовые, компактные, структурированные, имеют зеленые хлорофиллсодержащие участки, которые представляют собой зоны морфогенеза. Впоследствии там формируются побеги или растения-регенеранты. Рыхлые каллусы либо совсем не способны к органогенезу, либо формируют только корни. Появление корней свидетельствует о сдвиге гормонально-

го 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 клеток табака.

**Материалы и оборудование:** асептически выращенные растения и каллусная культура табака, ламинар-бокс, стерильные чашки Петри с питательными средами МС, содержащими ИУК (2 мг/л) и БАП (0,1 мг/л), а также ИУК (0,1 мг/л) и БАП (2,0 мг/л), пинцеты, скальпели, флаконы с 96%-ным и 70%-ным этиловым спиртом, спиртовка, стерильная вата.

### Ход работы

Работа проводится в асептических условиях. Производят изоляцию эксплантов из листьев стерильных растений табака и асептически переносят их на чашки Петри с агаризованными средами МС, различающимися по содержанию ауксинов и цитокининов. Аналогичные варианты питательных сред также используют для субкультивирования каллусных тканей табака, различающихся по возрасту.

Чашки Петри заклеивают, подписывают и помещают в термостат, в котором поддерживается температура 25°C, инкубируют в течение 4-5 недель. По истечении указанного времени проводят анализ различных морфогенетических реакций, обусловленных разным соотношением гормонов с ауксиновой и цитокининовой активностью в питательной среде. Результаты оформить в виде таблицы.

Таблица

№	Концентрация фитогормонов в питательной среде МС, мг/л		Морфогенетическая реакция
	ИУК	БАП	

Сделать вывод о влиянии фитогормонов на направление морфогенеза в культуре клеток табака, а также морфогенетической способности каллусных тканей в зависимости от продолжительности культивирования.

#### **Контрольные вопросы.**

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

## **МЕТОДИЧЕСКАЯ ЛИТЕРАТУРА**

- Кузьмина, Н. А.* Основы биотехнологии: учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. [www.biotechnolog.ru](http://www.biotechnolog.ru)  
Лабораторно-практические занятия по сельскохозяйственной биотехнологии. Методические 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.
- Сорокина, И. К.* Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: Учебное пособие / И.К. Сорокина, Н.И. Старичкова, Т.Б. Решетникова, Н.А. Гринь. 2002. 45 с.

## Содержание

<b>Тема 1. Техника культивирования изолированных клеток и тканей растений на искусственных питательных средах .....</b>	<b>3</b>
Лабораторная работа № 1. Приготовление питательных сред для культивирования растительных клеток и тканей <i>in vitro</i> .....	3
Лабораторная работа № 2. Методы стерилизации при проведении работ с культурой изолированных клеток и тканей растений .....	7
<b>Тема 2. Культура каллусной ткани .....</b>	<b>12</b>
Лабораторная работа № 3. Получение каллусной ткани и ее субкультивирование .....	12
Лабораторная работа № 4. Определение морфологических и ростовых показателей каллусных культур .....	14
<b>Тема 3. Культура клеточных суспензий .....</b>	<b>16</b>
Лабораторная работа №5. Получение и субкультивирование суспензионной культуры .....	16
Лабораторная работа № 6. Оценка жизнеспособности клеток и степени агрегированности суспензионных культур .....	18
<b>Тема 4. Дифференцировка в культуре клеток растений .....</b>	<b>21</b>
Лабораторная работа № 7. Влияние фитогормонов на направление морфогенеза .....	21
Методическая литература .....	23



Учебное издание

**Дитченко** Татьяна Ивановна

**КУЛЬТУРА КЛЕТОК,  
ТКАНЕЙ И ОРГАНОВ РАСТЕНИЙ.**

**Методические рекомендации  
к лабораторным занятиям,  
задания для самостоятельной работы  
и контроля знаний студентов**

В авторской редакции

Ответственный за выпуск *Т. И. Дитченко*

Подписано в печать . Формат 60/84/16.  
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс.  
Усл. печ. л. 2,56 . Уч.-изд. л. 2,33 .  
Тираж 60 экз. Зак.

Белорусский государственный университет.  
Лицензия ЛВ № 315 от 14.07.98.  
220050, Минск, проспект Независимости, 4

Отпечатано с оригинал-макета заказчика.