Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«КАЛИНИНГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ»

А. И. Юсов

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ для студентов, обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки 35.03.04 Агрономия

Калининград
Издательство ФГБОУ ВО «КГТУ»
2023

УДК 575

Рецензент

кандидат биологических наук, доцент кафедры агрономии и агроэкологии
института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «КГТУ»
Е. А. Барановская

Юсов, А. И.

Основы биотехнологии: учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ для студентов, обучающихся в бакалавриате по направлению подготовки 35.03.04 «Агрономия» / А.И. Юсов. – Калининград: Изд-во ФГБОУ ВО «КГТУ», 2023. – 37 с.

В учебно-методическом пособии по выполнению лабораторных работ по дисциплине «Основы биотехнологии» представлены учебно-методические материалы по выполнению лабораторных работ, включающие цели лабораторного занятия, план его проведения, перечень используемых материалов и оборудования, алгоритм проведения опыта для направления подготовки 35.03.04 – Агрономия, форма обучения очная, заочная.

Табл. 1, список лит. – 13 наименований

Учебно-методическое пособие рассмотрено и рекомендовано к изданию в качестве локального электронного методического материала кафедрой агрономии и агроэкологии 12 октября 2023 г., протокол № 3

Учебно-методическое пособие по выполнению лабораторных работ рекомендовано к изданию в качестве локального электронного методического материала методической комиссией института агроинженерии и пищевых систем ФГБОУ ВО «Калининградский государственный технический университет» 31 октября 2023 г., протокол № 8

УДК 575

© Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Калининградский государственный технический университет», 2023 г.
© Юсов А. И., 2023 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…… 4
1 СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ И МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИХ ВЫПОЛНЕНИЮ…… 5
2 ТРЕБОВАНИЯ К ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ…… 33
3 МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ К ТЕКУЩЕЙ АТТЕСТАЦИИ…… 34
4 СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ОБУЧАЮЩЕГОСЯ …….... 36

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина изучается: по очной форме обучения – на четвертом (в восьмом семестре) курсе ОП, по заочной форме обучения – на пятом курсе (в десятом семестре). При ее изучении используются базовые знания, умения и навыки, полученные при освоении всех предшествующих дисциплин ОП ВО по направлению.

Результаты освоения дисциплины используются на государственной итоговой аттестации, при обучении на следующей ступени высшего образования и в будущей профессиональной деятельности.

Целью освоения дисциплины «Основы биотехнологии» является формирование у студента способности к самостоятельному использованию биотехнологических методов и приемов при производстве целевой продукции растениеводства высокого качества.

Освоение дисциплины предполагает:

– изучение перспектив и возможностей производства высококачественной растениеводческой продукции благодаря внедрению биотехнологических методов и подходов;

– изучение и характеристика перспективных биотехнологий растениеводства, разрабатываемых в России и зарубежных странах;

– рассмотрение базовых теоретических принципов, лежащих в основе этих биотехнологий;

– ознакомление с новейшими биотехнологическими приемами и перспективами их внедрения в сельскохозяйственную практику.

В результате изучения дисциплины обучающийся должен:

знать:

– биотехнологические термины и понятия;

–возможность использования биотехнологий для получения целевого конечного продукта высокого качества;

– научно-обоснованные принципы, методы и приемы современных агробиотехнологий;

– особенности физиолого-биохимических процессов, происходящих в сельскохозяйственных растениях, при использовании биотехнологий;

уметь:

– изучать современную информацию, отечественный и зарубежный опыт по применению биотехнологий в растениеводстве;

– применять современные методы научных биотехнологических исследований согласно утвержденным планам и методикам;

– определять факторы и выбирать научно-обоснованные приемы оптимизации биотехнологических процессов в растениеводстве;

– давать научное обоснование агробиотехнологическим мероприятиям для получения целевого продукта хорошего качества;

– консультировать по производству конкурентоспособной продукции растениеводства с использованием агробиотехнологий;

владеть:

– навыками обработки и анализа экспериментальных данных, систематизации результатов агробиотехнологических исследований;

– базовыми навыками применения современных агробиотехнологических приемов (или их элементов) в научной и технологической деятельности.

1. СОДЕРЖАНИЕ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ И МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИХ ВЫПОЛНЕНИЮ

Лабораторные работы предназначены для формирования систематизированных знаний и получения практических навыков в области основ биотехнологии, являющихся основой для решения профессиональных задач агрономии.

Отчет по выполнению лабораторной работы должен содержать краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторной работы и вывод.

При подготовке к защите лабораторной работы по данной теме следует ответить на контрольные вопросы. Оценка результатов выполнения задания по каждой лабораторной работе производится при представлении студентом отчета о работе и на основании ответов студента на вопросы по теме лабораторной работы.

Защита результатов лабораторных работ является формой контроля текущей успеваемости студента.

Тематический план лабораторных работ (ЛР) представлен в таблице.

Таблица – Объем (трудоёмкость освоения) и структура ЛР

Номер лабораторной работы	Содержание лабораторной работы	Количество часов ЛР	
		очная форма	заочная форма
1	Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений	2	2
2	Получение стерильных эксплантов из семян огурца	2	2
3	Пассирование каллусной ткани огурца на свежую питательную среду	2	2
4	Получение и культивирование суспензии	2	
5	Индукция органогенеза и соматического эмбриогенеза в каллусной ткани огурца под действием фитогормонов	2	2

Номер лабораторной работы	Содержание лабораторной работы	Количество часов ЛР	
		очная форма	заочная форма
6	Изолирование и культивирование апикальных меристем картофеля	2	
7	Культура изолированных зародышей	2	
Итого		14	8

Содержание лабораторных работ

Лабораторная работа 1. Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений

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

Задание. Выполнение лабораторной работы включает в себя краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания и вывод. При подготовке к защите лабораторной работы следует ответить на контрольные вопросы.

Оборудование и материалы. Письменные и чертежные принадлежности, пробирки диаметром 15–25мм, пипетки стеклянные объемом 1–25мл, мерные цилиндры объемом 25–1000мл, мерные стаканы на 50–1000 мл, химические стаканы, автоматические пипетки, весы аналитические, электроплитка, водяная баня, магнитная мешалка, фарфоровые стаканы объемом 200–500мл, конические колбы на 250–500мл, чашки Петри диаметром 40–90мм, предметные стекла, скальпель, пинцет, тонкая фольга, пергаментная бумага, соли, фитогормоны, витамины, этиловый спирт, 1Н раствор NaOH или KOH, автоклав, сушильный шкаф, моющие средства.

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

фитогормоны. Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина, определенные аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, повышающие доступность железа для клеток в широких пределах pH. Углеводы выступают необходимым компонентом питательных сред при культивировании изолированных клеток и тканей, так как они не способны к автотрофному питанию. Обычно в качестве источника углеводов используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 20–40 г/л. Опухолевые ткани, в которых много активных гидролитических ферментов, могут расти на средах с растворенным крахмалом. Регуляторы роста необходимы для дифференцировки клеток и для индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны входить ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление дедифференцированных клеток. В случае индукции стеблевого морфогенеза можно снизить содержание ауксинов в среде или исключить их из питательной среды. На средах без гормонов растут опухолевые и «привыкшие» к таким условиям ткани. Автономность по отношению к гормонам того и другого типа или к одному из них связана со способностью клеток синтезировать гормоны. В качестве источников ауксинов в питательных средах обычно используют 2,4- дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д)- 1–10 мг/л, а также индолилуксусную кислоту (ИУК) – 1–30 мг/л, и -нафтилуксусную кислоту (НУК) – 0,1–2 мг/л. ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д. Для индукции образования каллуса обычно применяют высокие концентрации ауксинов, а при последующих пересадках ткань может расти, если содержание ауксинов в среде уменьшено в несколько раз. В качестве источника цитокининов в искусственных питательных смесях используют кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), зеатин (0,001-10 мг/л). Зеатин и БАП более активны в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза, чем кинетин. В состав некоторых питательных смесей входит аденин. Отдельные питательные среды включают кроме ауксинов и цитокининов гиббереллловую кислоту (ГК). Иногда к питательной среде добавляют растительные экстракты или соки. Наибольшей рост активирующей способностью обладает кокосовое молоко-жидкий эндосперм кокосового ореха. Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар-полисахарид, получаемый из морских водорослей. Наименьшее количество нежелательных примесей содержат бактериальный агар отечественного производства, его можно применять без предварительной промывки. Обычно для получения твердой питательной смеси к среде добавляют 5–8 % агара. Растворы макросолей, микросолей и витаминов удобно готовить концентрированными. Маточные растворы хранят в холодильнике, витамины при отрицательной температуре. В 10–20 раз более концентрированными, чем нужно, готовят растворы макросолей, в 100–1000 раз более концентрированными-растворы микросолей, в 1000 раз-растворы витаминов. Для культивирования клеток, тканей и органов тех или иных растений используют питательные среды различного состава. Наиболее широко применяются среда Мурасиге-Скуга, среда Уайта, среда Гамборга, или В-5.

Ход работы. Перед выполнением лабораторной работы необходимо изучить теоретический материал темы.

Выполнение лабораторной работы включает в себя следующие этапы

1. Посуду тщательно вымыть в растворах детергентов (стиральный порошок, мыльная вода).

2. Отмыть от детергентов 8–10-ти порциях проточной воды.

3. Поместить на 1–6 ч в хромпик, в 10-ти повторностях промыть теплой водопроводной водой, затем 5 раз всполоснуть дистиллированной водой.

4. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 2 ч при температуре 130-170°С.

5. Металлические инструменты завернуть в плотную бумагу и поместить в сушильный шкаф для стерилизации сухим жаром при температуре 170–200 °С в течение 2 ч.

6. Сухую посуду, инструменты обернуть бумагой или целлофаном и хранить в стеклянных шкафах или в выдвижных полках лабораторных столов.

7. Приготовить маточный раствор микроэлементов. Для этого взять 10-кратную навеску каждой соли, растворить при слабом нагревании в небольшом объеме дистиллированной воды, охладить до комнатной температуры, слить растворы в мерный цилиндр и довести водой до 200 мл. Раствор хлористого кальция ($CaCl_2$) готовить и хранить отдельно. На 1 л среды брать 20 мл маточного раствора.

8. Приготовить маточный раствор микроэлементов. Для этого взять 100-кратную навеску каждой соли, растворить при слабом нагревании в небольшом объеме дистиллированной воды, охладить до комнатной температуры, слить растворы в мерный цилиндр и довести дистиллированной водой до 200 мл. На 1 л среды брать 2 мл маточного раствора.

9. Приготовить маточный раствор хелата железа. Приготовление 20- кратного концентрата хелата железа (Fe-хелата) 557 мг FeSO4 7H2O и 745 мг Na2ЭДТА 2H2O растворяют по отдельности при нагревании (не доводя до кипения) в 30–40 мл дистиллированной воды. Затем растворы объединяют и доводят до общего объема –100мл. На 1 л литр среды брать 5 мл раствора.

10. Приготовить концентрированные растворы ауксинов. Для этого 100 мг вещества (ИУК, 2,4-Д, НУК) растворить в 1,2 мл этилового спирта (каждый в отдельности), подогреть, довести дистиллированной водой до 100 мл. 1 мл раствора будет содержать 1 мг вещества.

11. Приготовить концентрированные растворы цитокининов. Для этого 100 мг вещества (кинетин, зеатин, БАП) растворить в небольшом объеме 0,5-1Р раствора NaOH (KOH) при слабом нагревании, довести дистиллированной водой до 100 мл. 1 мл раствора будет содержать 1 мг вещества.

12. Приготовить маточные растворы витаминов. Для этого ампулу (аптечную), содержащую (1 или 5 %) раствора витамина довести до 100 мл дистиллированной водой. 1 мл раствора будет содержать соответственно 0,1 или 0,5мг витамина.

13. На сосудах с маточными растворами обязательно указать название среды, концентрацию раствора. Дату приготовления и помесить в холодильник. Хранить при температуре 4–7 °С в течение месяца.

Выводы. Выводы к лабораторной работе должны основываться на результатах проведенных исследований и соответствовать теме и цели лабораторной работы.

Форма отчета по лабораторной работе. Отчет по лабораторной работе должен включать в себя: номер и название лабораторной работы, цель работы, краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания в соответствие с ходом выполнения работы и вывод.

Контрольные вопросы

1. На чём основывается клеточная инженерия?
2. Что такое тотипотентность?
3. Назовите основные компоненты питательных сред
4. Какие вещества используют для управления процессами формообразования в культуре тканей?
5. Как готовят маточные растворы для питательных сред?

Лабораторная работа 2. Получение стерильных эксплантов из семян огурца

Цель работы. Формирование знаний о получении стерильных эксплантов из семян огурца

Задание. Выполнение лабораторной работы включает в себя краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания и вывод. При подготовке к защите лабораторной работы следует ответить на контрольные вопросы.

Оборудование и материалы. Письменные и чертежные принадлежности, семена огурца по 10 шт., стерильные чашки Петри с 1–2 слоями фильтровальной бумаги, химические стаканы, пробирки, пинцеты, ножницы, марлевые мешочки, колбы на 250 мл со стерильной дистиллированной водой, коническая колба на 300–500 мл, дно которой покрыто ватой или фильтровальной бумагой, пробирки с питательной средой МС (1/2 нормы) без гормонов, 10%-ный раствор хлорамина, 70%-ный этиловый спирт, спиртовка, спички.

Теоретические сведения. Стерилизация растительного материала. Для стерилизации семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют следующие растворы: 13–20%-ного пероксида водорода, 10%-ного хлорамина, 8%-ного гипохлорита натрия или кальция. Перед стерилизацией ткань растения предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щёткой с мылом в тёплой проточной воде, снимают кожуру (у корней и корнеплодов), кроющие чешуи (у листьев), промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд (семена на 1–2 мин) в 70%-ный этиловый спирт. Затем растительные объекты многократно прополаскивают в стерильной воде. Пероксид водорода рекомен-

дуется использовать для фасоли, люпина, подсолнечника, сулему – для томатов, тыквы. Продолжительность стерилизации семян, пероксидом водорода составляет 30 мин, для меристем и кусочков тканей требуется примерно в 2 раза меньше времени.

Стерилизация питательных сред. Разлитые в пробирки или стеклянные колбы питательные среды закрывают ватными пробками или фольгой, завёртывают в целлофан и автоклавируют при 120 °С и давлении 1 атм в течение 20 мин.

Холодная стерилизация. Если в состав питательной среды входят вещества, разрушающиеся при высокой температуре, то их подвергают холодной стерилизации, пропуская через бактериальные фильтры. Органические жидкости, не поддающиеся тепловой обработке, гормоны также пропускают через бактериальные фильтры.

Получить стерильный материал из семян огурца селекционных образцов часто бывает достаточно трудно, что связано с необходимостью правильного выбора стерилизующего агента. Как правило, стерилизующее вещество должно обеспечивать наибольший процент неповреждённых тканей под семенной оболочкой, способных к росту и новообразованиям при наименьшем проценте инфекции. Перед стерилизацией семена промывают на сите тёплой проточной водой, затем помещают в марлевые мешочки, в которые кладут этикетки с указанием номера генотипа. После этого марлевые мешочки вносят в стерильный бокс, где последовательно проводят все операции по стерилизации.

Ход работы. Перед выполнением лабораторной работы необходимо изучить теоретический материал темы.

Выполнение лабораторной работы включает в себя:

1. Отобрать по 10 семян огурца, тщательно промыть в мыльном растворе, а затем под проточной водой.

2. Поместить семена в марлевые мешочки и погрузить на 10 с в 70%-ный этиловый спирт.

3. Поместить семена в раствор хлорамина (10%-ный) или перекиси водорода (13–18%-ный) на 10–15 мин.

4. Промыть семена в 3–5 объёмах стерильной дистиллированной воды и слегка подсушить.

5. Пинцетом разложить по 10 семян в чашки Петри на 1–2 слоя фильтровальной бумаги и добавить по 10–15 мл стерильной воды, закрыть крышками.

6. Подготовленные в чашках Петри семена проращивают в термостате при 25 °С или в световой комнате в течение 2–3 сут.

7. В рабочей тетради зарисовать схему процесса стерилизации, работу оформить в виде таблицы, с указанием стерилизующего агента, его концентрации и экспозиции для стерилизации семян огурца.

Выводы. Выводы к лабораторной работе должны основываться на результатах проведенных исследований и соответствовать теме и цели лабораторной работы.

Форма отчета по лабораторной работе. Отчет по лабораторной работе должен включать в себя: номер и название лабораторной работы, цель работы, краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания в соответствие с ходом выполнения работы и вывод.

Контрольные вопросы

1. Как простерилизовать посуду, дистиллированную воду, инструменты, помещение лаборатории?
2. Как стерилизуют питательные среды?
3. Для чего предназначены ламинар-боксы?
4. Какие стерилизующие растворы используют для растительных эксплантов?
5. Как получают стерильные проростки и для чего их используют?

Лабораторная работа 3. Пассирование каллусной ткани огурца на свежую питательную среду

Цель работы. Формирование знаний о пассировании каллусной ткани огурца на свежую питательную среду.

Задание. Выполнение лабораторной работы включает в себя краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания и вывод. При подготовке к защите лабораторной работы следует ответить на контрольные вопросы.

Оборудование и материалы. Письменные и чертежные принадлежности, Культура каллусной ткани в чашках Петри из предыдущей работы, чашки Петри со стерильной агаризованной средой МС для пересадки каллусной ткани с добавлением сахарозы 30000 мг/л, 6-бензиламинопурин 0,8 мг/л, НУК 1,0 мг/л, гидролизат казеина 200 мг/л, глицин 100 мг/л, стерильные чашки Петри, пинцеты, скальпели, бумажный матрасик, спиртовка, спички, 70%-ный и 96%-ный этанол, торсионные весы.

Теоретические сведения. Для каллусогенеза пригодны все части растения, но ткани стебля наиболее легко образуют каллус и их значительно легче ввести в стерильную культуру. Культивирование фрагментов семядолей, листьев и гипокотилей огурца на питательных средах определённого состава приводит к следующим морфогенетическим процессам: образованию эксплантом первичного каллуса с последующей регенерацией адвентивных почек; к образованию меристематических очагов в первичной и пересадочной каллусной ткани. Каллусная ткань огурца, образованная в условиях in vitro обычно имеет тёмно-зелёный, тёмно-жёлтый или жёлто-зелёный оттенок. По консистенции каллус огуречного растения близок к желеобразному и рыхлому.

После того как на сегменте экспланта образовался хороший каллус, его изолируют и переносят на свежую питательную среду для самостоятельного роста в культуре. У огурца этот процесс продолжается 2–3 недели. Первичные каллусы в стерильных условиях делят скальпелем на кубики массой 100 мг. Частота дальнейших пассажей зависит от скорости роста каллусной ткани, диа-

метра культурального сосуда и количества питательной среды. Обычно при пассировании культуры огурца ткань часто погибает после 3–4 пассажей. Чтобы этого не происходило, к питательной среде с минеральной основой МС добавляют витамины, ауксины и растительные экстракты

Ход работы. Перед выполнением лабораторной работы необходимо изучить теоретический материал темы.

Выполнение лабораторной работы включает в себя следующие этапы:

1. Чашку Петри с каллусной культурой открыть и стерильным пинцетом извлечь каллус.

2. На стерильной чашке Петри его разделить скальпелем на кусочки массой до 100 мг и поместить на поверхность агаризованной питательной среды МС (по 5 шт. в каждой).

3. Закрыть крышками и поставить в световую комнату.

4. Результаты работы оформить в виде таблицы.

Выводы. Выводы к лабораторной работе должны основываться на результатах проведенных исследований и соответствовать теме и цели лабораторной работы.

Форма отчета по лабораторной работе. Отчет по лабораторной работе должен включать в себя: номер и название лабораторной работы, цель работы, краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания в соответствие с ходом выполнения работы и вывод.

Контрольные вопросы

1. Что такое каллусная ткань?

2. Как получить каллусную ткань и каковы возможности её использования в биотехнологии?

3. Что такое дедифференцировка клеток и почему она является обязательным условием перехода специализированных клеток к делению и каллусообразованию?

4. Какие гормоны являются индукторами дедифференцировки?

5. Почему каллусную ткань необходимо пассировать на свежие питательные среды?

Лабораторная работа 4. Получение и культивирование суспензии

Цель работы. Формирование знаний о получении суспензии из рыхлых каллусов табака и ее культивировании.

Задание. Выполнение лабораторной работы включает в себя краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания и вывод. При подготовке к защите лабораторной работы следует ответить на контрольные вопросы.

Оборудование и материалы. Письменные принадлежности; ламинар-бокс, пробирки с рыхлыми каллусами табака (среда МС+2,4-Д 2 мг/л), колбы с

питательной средой для инициаций суспензии, магнитные мешалки, стерильные инструменты, флакон с 96%-ным спиртом.

Теоретические сведения. Культуры клеток растений, выращиваемые в жидкой питательной среде, обычно называют суспензионными культурами. Отдельные клетки, небольшие группы или достаточно крупные агрегаты (более 50 клеток) выращивают во взвешенном состоянии в жидкой среде. Применяют различные аппараты и способы поддержания их в таком состоянии. Начальные момент получения суспензионной клеточной культуры является событием рандомическим. Это означает, что только клетки, которые по ряду причин способны к перестройке метаболизма и размножению с высоким коэффициентом в конкретных условиях суспензионного культивирования, образуют «хорошие» линии. Важными характеристиками таких линий является высокая степень дезагрегации (5–10 клеток в группе), морфологическая выравненность клеток (небольшие размеры, сферическая или слегка овальная форма). Выращивание клеточных суспензий в жидкой питательной среде имеет ряд преимуществ перед выращиванием каллусных тканей поверхностным способом. Эти культуры представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, поэтому можно получать хорошо воспроизводимые результаты по влиянию экзогенных факторов на метаболизм и рост клеточных популяций. Суспензионные культуры клеток широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма, индукции ферментов и связи их с событиями клеточного цикла, экспрессии и репрессии отдельных генов, деградации чужеродных соединений, а также как исходный материал для очистки ферментов. Важным их преимуществом при выделении ферментов или продуктов вторичного метаболизма является отсутствие у большинства суспензионных культур хлорофилла и каротиноидных пигментов.

Суспензию клеток можно получить из каллуса, поместив его в жидкую питательную среду. Используя фермент, например пектиназу, получаем суспензионную культуру непосредственно из ткани экспланта (лист, стебель, корень). Вначале на поверхности экспланта образуется каллусная ткань, а затем уже от неё отделяются клетки, в результате чего получается клеточная суспензия. Для получения 100 мл клеточной суспензии необходимо 2–3 г свежей каллусной ткани. Необходимым условием культивирования клеточных суспензий является постоянное перемешивание или встряхивание среды. Если клеточная суспензия находится в неподвижном состоянии, то деление суспензионных клеток приводит к образованию каллусной ткани. Деление суспензионных клеток поддерживается при наличии ауксинов и цитокининов. Таким образом, суспензионные культуры представлены типичными каллусными клетками, обладающими всеми свойствами, характерными для клеток такого рода. Суспензии лучше образуются из рыхлой каллусной ткани, получаемой на средах с 2,4-Д. Ещё более интенсивно этот процесс идёт при добавлении в среду фермента пектиназы. Клеточные суспензии в биотехнологии используются для получения вторичных метаболитов, многие из которых являются ценными лекарственными препаратами. Наряду с этим, суспензии клеток можно применять в качестве исходного материала для получения изолированных протопластов. Для генетических и физио-

логических исследований, а также для практического использования в клеточной селекции очень ценным является культивирование отдельных клеток. Одиночная гибридная клетка, выделенная из культуры изолированных протопластов, при дальнейшем её делении позволяет получить клон, состоящий из гибридных клеток. Это намного облегчает работу исследователя, так как устраняет необходимость отбора потомства в культуре изолированных протопластов от негибридных, что представляет значительные трудности. Кроме того, сам процесс соматической гибридизации лучше наблюдать, если работа ведётся с одиночными протопластами. Трудности культивирования одиночных клеток связаны с тем, что отдельная клетка не делится в тех условиях, в которых хорошо растёт каллусная ткань. Для того чтобы заставить их делиться, разработаны специальные методы, один из них метод «няньки», предложенный в 1960 г. Джонсоном, при котором функцию «няньки», стимулирующей деление одиночной клетки, выполняют кусочки каллусной ткани, отделённые от неё фильтровальной бумагой. В присутствии их одиночная клетка делится и даёт индивидуальную колонию клеток – клон. Для клеточных делений у одиночной клетки можно использовать также «кормящий слой» (активно делящиеся клетки суспензионной культуры того же вида растения, что и одиночная клетка).

Стимулирует клеточное деление и кондиционирование среды, для чего в неё добавляют питательную среду от интенсивно делящейся культуры клеток. Кондиционирующий фактор получают при фильтровании клеточной суспензии в экспоненциальной фазе роста через бактериальный фильтр. Выделяют одиночные клетки из клеточных суспензий, из тканей растений, например, из мезофилла листа после его мацерации ферментами, из 36 культуры изолированных протопластов после восстановления клеточной стенки. Для получения одноклеточной фракции суспензионной культуры иногда достаточно простого отстаивания в колбе в течение 15–30 мин. При этом крупные агрегаты оседают на дно, а надосадочная фракция содержит только одиночные клетки или мелкие агрегаты. Если при отстаивании не удаётся получить одноклеточную фракцию, то применяют мацерирующие ферменты (целлюлаза, амилаза, протеаза) или фильтрование через сита нейлоновые или металлические.

Для инициации суспензионной культуры необходимо 2–3 г свежей рыхлой массы каллусных клеток на 60–100 мл жидкой питательной среды. Первичную суспензию культивируют в колбах с жидкой питательной средой на круговых качалках со скоростью 100–120 об./мин. Модельная кривая роста суспензии имеет S-образную форму и включает: лаг-фазу, экспоненциальную фазу, стационарную фазу и фазу деградации. Форма реальных ростовых кривых отличается продолжительностью фаз. Это зависит от генетики популяции, количества инокулюма и состава питательной среды. Скорость нарастания биомассы колеблется от 15 до 70 сут.

Ход работы. Перед выполнением лабораторной работы необходимо изучить теоретический материал темы.

Выполнение лабораторной работы включает в себя следующие этапы:

1. В асептических условиях извлечь каллус из пробирки и поместить в колбу с питательной средой, из расчета 2–3 г на 100 мл среды: 1) МС+2,4-Д, 2) МС+ИУК, 3)МС+ИУК+6-бензиламинопурина (БАП), 4) МС без гормонов.

2. Колбы с суспензией поместить на круговые качалки при 100–120 об. /мин. и оставить на 2 недели.

3. Результаты культивирования суспензии на различных по составу средах зарисовать и сделать выводы.

4. Приготовить препарат суспензии: встряхнуть суспензию в колбе, пипеткой отобрать небольшое количество суспензии, поместить каплю суспензии на предметное стекло, добавить каплю красителя, накрыть покровным стеклом, излишки жидкости убрать фильтровальной бумагой.

5. Поместить препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива и подсчитать клетки и агрегаты в 3-х полях зрения (просмотреть не менее трех препаратов).

6. Результаты оформить в виде таблицы.

7. Один препарат зарисовать, описать морфологию клеток суспензии (форму, величину).

8. Сделать вывод о степени агрегированности суспензий (какие фракции преобладают) и жизнеспособности суспензии (неокрашенных клеток).

Выводы. Выводы к лабораторной работе должны основываться на результатах проведенных исследований и соответствовать теме и цели лабораторной работы.

Форма отчета по лабораторной работе. Отчет по лабораторной работе должен включать в себя: номер и название лабораторной работы, цель работы, краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания в соответствие с ходом выполнения работы и вывод.

Контрольные вопросы

1. Как получить суспензионную культуру?
2. Для чего используются суспензионные культуры в биотехнологии?
3. В чём заключается трудность культивирования одиночных клеток?
4. Как подсчитать плотность суспензии?
5. Как определить жизнеспособность суспензии?

Лабораторная работа 5. Индукция органогенеза и соматического эмбриогенеза в каллусной ткани огурца под действием фитогормонов

Цель работы. Формирование знаний о индукции органогенеза и соматического эмбриогенеза в каллусной ткани огурца под действием фитогормонов.

Задание. Выполнение лабораторной работы включает в себя краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания и вывод. При подготовке к защите лабораторной работы следует ответить на контрольные вопросы.

Оборудование и материалы. Письменные принадлежности; Пробирки с каллусами огурца, колбы на 50 мл со стерильной питательной средой (МС без

гормонов), колбы со средами для стеблевого органогенеза и соматического эмбриогенеза и индукции ризогенеза, флаконы с 96%-ным спиртом, стерильные пинцеты и препарировальные иглы, спиртовка, ламинар-бокс.

Теоретический материал. Существует несколько путей, по которым может идти развитие клетки после её дедифференцировки.

1) это вторичная регенерация целого растения, возможна дифференцировка на уровне клеток, тканей и органов.

2) это утрата клеткой способности к вторичной дифференцировке и регенерации растения, стойкая дедифференцировка, приобретение способности расти на среде без гормонов, т. е. превращение в опухолевую. Такими свойствами часто характеризуются клетки старых пересадочных культур.

3) это нормальный цикл развития каллусной клетки, заканчивающийся её старением и отмиранием. В этом случае клетка претерпевает вторичную дифференцировку и прекращает делиться (стационарная фаза роста). Но такая дифференцировка не ведёт к морфогенезу, а закрепляет за ней свойства старой каллусной клетки.

Наибольший интерес представляет регенерация в культуре тканей из отдельной клетки целого растения. В культуре каллусных тканей морфогенезом называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток. Существует два основных типа морфогенеза. В культуре тканей он может проявляться в виде органогенеза (образование отдельных органов): корневого, стеблевого, реже флорального (цветочного) или листового – 1 тип. В этом случае сначала регенерируют отдельные органы, а затем уже из них целые растения. 2 тип – в виде соматического эмбриогенеза (образования биполярных зародышеподобных структур из соматических клеток), здесь сразу образуется зародыш, имеющий как меристему корня, так и меристему верхушечной почки, из которого потом развивается целое растение. Морфогенезом в культуре каллусных тканей можно управлять. На способность изолированных растительных клеток к морфогенезу оказывают влияние как внутренние, так и внешние факторы. К внутренним относятся: видовая принадлежность исходного растения, орган, из которого взят эксплант, возраст экспланта. К внешним факторам относятся состав питательной среды, температура, интенсивность света. При преобладании цитокининов над ауксинами часто начинается стеблевой органогенез, а в случае преобладания ауксинов над цитокининами – корневой. Также из образующихся в культуре каллусной ткани корней почти никогда не регенерируется целое растение, а при стеблевом органогенезе сначала образуется побег, который затем при пересадке на среду с преобладанием ауксинов укореняется и даёт начало целому растению. Следовательно, ауксины и цитокинины, вызывающие в зависимости от соотношения либо дедифференцировку и переход к каллусному росту, либо дифференцировку и морфогенез в культуре каллусных тканей, являются не только регуляторами роста, но и регуляторами дифференцировки. Если органогенез можно индуцировать с помощью фитогормонов, то соматический эмбриогенез фактически независим от них. Обычно эмбриогенные зоны возникают в каллусной ткани на той же питательной среде, которая использовалась для каллусообразования. Независимость соматического эм-

бриогенеза от гормонов является аргументом того, что сам процесс изолирования клетки стимулирует реализацию тотипотентности, т. е. переход к морфогенезу. Следовательно, основными стимулами морфогенеза являются изменения соотношения гормонов в питательной среде, а также сам процесс изоляции растительной клетки от организма. Дополнительными стимулами морфогенеза в культуре каллусных тканей является присутствие в питательной среде нитрата аммония, аминокислот таких как тирозин, серин.

Фитогормоны влияют на деление и рост клеток растяжением, состояние покоя, созревание, старение, формирование пола, устойчивость к стрессу, тропизмы, транспирацию; обеспечивают функциональную целостность растительного организма, закономерную последовательность фаз индивидуального развития. По химической природе гормоны растений четко подразделяются на две группы: производные мевалоновой кислоты (гиббереллины, абсцизины, брассины, фузикокцин, цитокинины), производные аминокислот (ауксины – из триптофана, этилен – из метионина и аланина). Биосинтез фитогормонов происходит в определенных частях растений: в апексах побегов образуется ИУК – индолил-3-уксусная кислота, лист служит донором ключевого продукта синтеза гиббереллинов – каурена, а также абсцизовой кислоты, в апексах корней синтезируется кинетин, а в зоне растяжения корня – гиббереллины, источником зеатина является эндосперм проростающих семян. По функциональному действию различают 5 основных групп фитогормонов: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизины и этилен. Ауксины в культуре тканей вызывают рост клеток растяжением, в больших концентрациях – деление клеток, в сочетании с цитокининами – органогенез. В биотехнологии применяют как природные ауксины (ИУК), так и синтетические [ИМК (индолил-3-масляная кислота), ИПК (индолил-3-пропионовая кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), НУК (нафтилуксусная кислота)]. Цитокинины в сочетании с ауксинами индуцируют митозы, пролиферацию клеток, почек и побегов. К природным цитокининам относятся: зеатин, кинетин (6-фурфуриламинопурин), NN-дифенилмочевина (кокосовое молоко); к синтетическим – 6-БАП (6-бензиламинопурин). 44 Гиббереллины стимулируют рост клеток растяжением, а также синтез ауксинов и цитокининов. Сейчас известно около 60 видов гиббереллинов. В культуре ткани используется гибберелловая кислота. Абсцизины (АБК – абсцизовая кислота) и этилен ингибируют ростовые процессы, деление клеток, в сочетании с цитокининами и хлорхолинхлоридом индуцируют органогенез (образование микроклубней). Гормональная система тесно связана с генетическим аппаратом клетки. Фитогормоны не только влияют на степень метилирования ДНК и таким образом регулируют экспрессию генов, но и связываются с белками – репрессорами на опероне, что приводит к активации структурных генов и синтезу определенных ферментов. Следовательно, изменяя соотношение гормонов в питательных средах, можно в какой-то степени изменять и генетические программы клеток и тканей. Эти процессы известны как дедифференциация, редифференциация и дифференциация клеток и тканей.

Ход работы. Перед выполнением лабораторной работы необходимо изучить теоретический материал темы.

Выполнение лабораторной работы включает в себя следующие этапы:

1. Стерильным пинцетом переложить каллусы на стерильную поверхность стола ламинар-бокса, разделить на кусочки 5х5 мм, и поместить в колбы с питательными средами, содержащими различные наборы фитогормонов.

2. Колбы перенести в культуральную комнату с температурой 25 ± 2 °С, влажностью воздуха 70 % и интенсивностью освещения 5клк.

3. Результаты эксперимента зарисовать через 2–4–6–8 недель.

Выводы. Выводы к лабораторной работе должны основываться на результатах проведенных исследований и соответствовать теме и цели лабораторной работы.

Форма отчета по лабораторной работе. Отчет по лабораторной работе должен включать в себя: номер и название лабораторной работы, цель работы, краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания в соответствие с ходом выполнения работы и вывод.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные типы морфогенеза в культуре каллусной ткани.
2. Основные этапы соматического эмбриогенеза.
3. Что такое фитогормоны и в чем заключается их действие на клетки, ткани и органы растений?
4. Назовите основные группы фитогормонов и их функции.

Лабораторная работа 6. Изолирование и культивирование апикальных меристем картофеля

Цель работы. Формирование знаний об изолировании и культивировании апикальных меристем картофеля

Задание. Выполнение лабораторной работы включает в себя краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания и вывод. При подготовке к защите лабораторной работы следует ответить на контрольные вопросы.

Оборудование и материалы. Письменные принадлежности; клубни картофеля, лупа, стерильные скальпели, иглы, чашки Петри, пробирки со стерильной питательной средой МС с добавлением сахарозы, глюкозы по 20000 мг/л, гидролизата казеина 1000 мг/л, мезоинозита 100 мг/л, тиамина, пиридоксина по 1 мг/л, аденина 40 мг/л, витамина В12 0,015 мг/л, гиббереллловой кислоты и биотина по 1 мг/л, никотиновой кислоты 2 мг/л, фолиевой кислоты, рибофлавина и кинетина по 0,5 мг/л, стерилизующие растворы, спиртовка, спички.

Теоретический материал. Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения – клонального микроразмножения (получение в условиях in vitro, т. е. в пробирке неполовым путём растений, генетически идентичных экземпляру).

Этот метод имеет ряд преимуществ:

1) получение генетически однородного посадочного материала;

2) освобождение растений от вирусов за счёт использования меристемной культуры;

3) высокий коэффициент размножения;

4) сокращение продолжительности селекционного процесса;

5) размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;

6) возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала.

Первые успехи в клональном микроразмножении связаны с культивированием апикальных меристем травянистых растений на соответствующих питательных средах, обеспечивающих в конечном итоге получение растений-регенерантов. Однако область применения микроразмножения разнообразна и имеет тенденцию к постоянному расширению. Это в первую очередь относится к размножению in vitro взрослых древесных пород, особенно хвойных, и использование техники in vitro для сохранения редких и исчезающих видов лекарственных растений. В настоящее время в этом направлении наметился положительный сдвиг.

Этапы и методы клонального микроразмножения. Процесс клонального микроразмножения можно разделить на четыре этапа:

- выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества мериклонов;
- укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+ 2 °С, + 10 °С);
- выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Существует несколько методов клонального микроразмножения. Основной метод, применяемый при клональном микроразмножении растений – это активация развития уже существующих в растении меристем, основывающийся на снятии апикального доминирования. Это может быть достигнуто двумя путями:

- удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега in vitro на безгормональной среде;
- добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов.

Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин), а также 2-изопентениладенин (2ip) и зеатин. 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. В настоящее время этот метод широко ис-

пользуется в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур как технических (сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стахис), так и овощных (томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.). А также для размножения культур промышленного цветоводства (гвоздика, хризантема, роза, гербера), тропических и субтропических растений (рододендрон, азалия, камелия, чай и др.), плодовых и ягодных культур (земляника, яблоня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, крыжовник и др.) и древесных растений (тополь, ива, ольха, береза, рябина, секвойя, туя, можжевельник и др.).

Для некоторых сельскохозяйственных культур, таких как картофель, технология клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. Применение метода активации развития существующих в растении меристем позволяет получать из одной меристемы картофеля более 105 растений в год, причем технология предусматривает получение в пробирках микроклубней – ценного, безвирусного семенного материала.

Второй метод – это индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта. Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и, таким образом, регенерировать целые растения. Образования адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий), если их удается получить свободными от инфекции. Этот процесс, как правило, происходит на питательных средах, содержащих один цитокинин или в сочетании с ауксином, находящихся в соотношении 10:1 или 100:1 в качестве ауксина в этом случае наиболее часто используют бета-индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) или альфа-нафтилуксусную кислоту (НУК). Это наиболее распространенный метод микроразмножения высших растений, которым были размножены многие луковичные цветочные растения (нарциссы, лилии, гиацинт, гладиолусы, тюльпаны) из луковичных чешуи, сегментов базальной части донца луковиц, эксплантов листьев; представители рода Brassica (капуста цветная, кочанная, брюссельская, листовая, брокколи – из сегментов гипокотиля, семядолей, листьев; лук, чеснок – из верхушечной меристемы, ткани донца луковиц; томаты – из апикальных или пазушных меристем; салат цикорный – из сегментов листовых пластинок. Достаточно хорошо разработана технология клонального микроразмножения земляники, основанная на культивировании апикальных меристем. Меристематические верхушки изолируют из молодых, свободных от вирусных болезней, растений и выращивают на модифицированной питательной среде. Через 3–4 недели культивирования меристема развивается в самостоятельное растение, в основании которого формируются адвентивные почки, которые быстро растут и дают начало новым почкам. В течение 6–8 недель образуется конгломерат почек, связанных между собой соединительной тканью и находящихся на разной стадии развития. Появляются листья на коротких черешках, в нижней части которых формируются новые адвентивные почки. Эти почки разделяют, и пересаживают на свежую питательную среду. На среде с цитокинином продол-

жается пролиферация придаточных побегов, а на среде без регуляторов роста в течение 4–6 недель формируются нормальные растения с корнями и листьями. Морфогенетическая активность экспланта сохраняется в течение 3–4 лет. Таким образом, от одного материнского растения можно получать несколько миллионов растений-регенерантов в год.

Третий метод, практикуемый при клональном микроразмножении, основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему внешнему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название – соматический эмбриогенез. Формирование эмбриоидов в культуре тканей происходит в два этапа. На первом этапе клетки экспланта дифференцируются за счет добавления в питательную среду ауксинов, как правило, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и превращаются в эмбриональные. На следующей стадии необходимо заставить сформировавшиеся клетки развиваться в эмбриоиды, что достигается уменьшением концентрации ауксина или полного его исключения из состава питательной среды. Соматический эмбриогенез возможно наблюдать непосредственно в тканях первичного экспланта, а также в каллусной культуре. Причем последний способ менее пригодный при клональном микроразмножении, так как посадочный материал, полученный таким методом, будет генетически нестабилен по отношению к растению-донору. Как правило, соматический эмбриогенез происходит при культивировании каллусных клеток в жидкой питательной среде (суспензия) и является наиболее трудоемкой операцией, так как не всегда удается реализовывать свойственную клеткам тотипотентность.

Четвёртый метод клонального микроразмножения – дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани. Он мало используется для получения посадочного материала in vitro. Это связано с тем, что при периодическом пересаживании каллусной ткани на свежую питательную среду часто наблюдаются явления, нежелательные при микроразмножении: изменение плоидности культивируемых клеток, структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций, потеря морфогенетического потенциала культивируемыми клетками. Наряду с генетическими изменениями растений наблюдаются и морфологические: низкорослость, неправильное жилкование листьев и их расположение по стеблю, образование укороченных, утолщенных междоузлий, уродливость, пониженная устойчивость к болезням и вредителям. Причем длительное культивирование каллусных клеток усугубляет эти изменения, поэтому период неорганизованного роста при микроразмножении должен быть сведен к минимуму. Однако, несмотря на некоторые недостатки, данный метод имеет положительные стороны и преимущества. Во-первых, он является эффективным и экономически выгодным, так как в процессе размножения из каждой индивидуальной каллусной клетки при благоприятных условиях культивирования может сформироваться адвентивная почка, дающая начало новому растению. Во-вторых, в ряде случаев он является единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. В-третьих, представляет большой интерес для селекционеров, так как растения, полученные данным методом, различаются генетически и морфофизиологически. Это дает возможность

селекционерам проводить отбор растений по хозяйственно-важным признакам и оценивать их поведение в полевых условиях. Этот метод целесообразно применять лишь к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, а вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. К таким растениям можно отнести амариллис, томаты, спаржу, некоторые древесные породы и другие культуры. Через каллусную культуру были размножены: сахарная свекла, некоторые представители рода Brassica, кукуруза, рис, пшеница и другие злаковые, подсолнечник, лен, разработаны условия, способствующие регенерации растений из каллуса огурца, картофеля, томатов.

Техника культивирования растительных тканей на разных этапах клонального микроразмножения. Для культивирования тканей на каждом из четырёх этапов требуется применение определенного состава питательной среды.

Первый этап. На этом этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Это осуществляется путем стерилизации растительных тканей ртутьсодержащими растворами (сулема, или диацид, 0,1–0,2%-ная) или хлорсодержащими (хлорамин 10–15%-ный, гипохлорит натрия или кальция 5–10%-ный) в течение 5–10 мин для нежных, легко повреждаемых тканей растений и 10–12 мин – для тканей, имеющих более плотную оболочку. После этого растительные ткани необходимо тщательно промыть в стерильной дистиллированной воде, как правило, в трех порциях и перенести на заранее приготовленную стерильную питательную среду. Если исходную стерильную культуру экспланта получить трудно, рекомендуется вводить в состав питательной среды антибиотики (тетрациклин, бензилпенициллин и др.) в концентрации 100–200 мг/л. Это в первую очередь относится к древесным растениям, у которых наблюдается тенденция к накоплению внутренней инфекции. На первом этапе, как правило, используют среду, содержащую минеральные соли по рецепту Мурасига и Скуга, а также различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. В случае, когда наблюдается ингибирование роста первичного экспланта за счет выделения им в питательную среду токсичных веществ (фенолов, терпенов и других вторичных соединений), усилить его рост можно, используя антиоксиданты. Это возможно двумя способами: омывкой экспланта слабым раствором антиоксиданта в течение 4–24 ч; непосредственным добавлением антиоксиданта в питательную среду. В качестве антиоксидантов используют: аскорбиновую кислоту (1–60 мг/л), глютатион (4–5 мг/л), дитиотриэтол (1–3 мг/л), диэтилдитиокарбамат (2–5 мг/л), поливинилпирролидон (5000–10 000 мг/л). В некоторых случаях целесообразно добавлять в питательную среду адсорбент – древесный активированный уголь в концентрации 0,5–1 %. Продолжительность первого этапа – от 1 до 2 месяцев, в результате которого наблюдается рост меристематических тканей и формирование первичных побегов. Второй этап – собственно микроразмножение. На этом этапе необходимо добиться получения максимального количества мериклонов, учитывая при этом, что с увеличением субкультивирований увеличивается число растений-регенерантов с ненормальной морфологией и возможно образование расте-

ний-мутантов. Как и на первом этапе, используют питательную среду по рецепту Мурасига и Скуга, содержащую различные биологически активные вещества, а также регуляторы роста.

Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. Из цитокининов наиболее часто используют БАП в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов – ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л. При долгом культивировании растительных тканей на питательных средах с повышенным содержанием цитокининов (5–10 мг/л) происходит постепенное накопление их в тканях выше необходимого физиологического уровня, что приводит к появлению токсического действия и формированию растений с измененной морфологией. Вместе с тем, возможно, наблюдать такие нежелательные для клонального микроразмножения эффекты, как подавление пролиферации пазушных меристем, образование витрифицированных (оводненных) побегов и уменьшение способности растений к укоренению. Отрицательное действие цитокининов возможно преодолеть используя питательные среды с минимальной концентрацией цитокининов, обеспечивающих стабильный коэффициент микроразмножения, или чередованием циклов культивирования на средах с низким и высоким уровнем фитогормонов.

3–4 этапы – укоренение микропобегов, их последующая адаптация к почвенным условиям и высадка в поле являются наиболее трудоемкими этапами, от которых зависит успех клонального микроразмножения. На третьем этапе, как правило, меняют основной состав среды: уменьшают в два, а иногда и в четыре раза концентрацию минеральных солей по рецепту Мурасига и Скуга или заменяют её средой Уайта, уменьшают количество сахара до 0,5–1 % и полностью исключают цитокинины, оставляя один лишь ауксин. В качестве стимулятора корнеобразования используют бета-индолил-3-масляную кислоту (ИМК), ИУК или НУК. Укоренение микропобегов проводят двумя способами:

1) выдерживание микропобегов в течение нескольких 55 часов (2–24 ч) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20–50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка);

2) непосредственное культивирование микропобегов в течение 3–4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1–5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта).

Предложен метод укоренения пробирочных растений в условиях гидропоники. Этот метод позволяет значительно упростить этап укоренения и одновременно получать растения, адаптированные к естественным условиям. Для картофеля возможно использовать бессубстратную гидропонику для получения миниклубней. Затенение нижней части культуральных сосудов плотной чёрной материей или добавление в питательную среду активированного угля способствует укоренению микропобегов. Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений – весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо разви-

той корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом с длинными концами или специальным крючком. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85–90 °С в течение 1–2 ч. Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1). Исключение составляют семейство орхидных, для которых готовят субстрат, состоящий из сфагнового мха, смеси торфа, листьев бука или дуба, сосновой коры (1:1:1). Приготовленным заранее почвенным субстратом заполняют пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20–22 °С), освещенностью не более 5 тыс. лк и влажностью 65–90 %. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают до полной адаптации растений. Через 20–30 дней после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают растворами минеральных солей Кнудсона, Мурасига и Скуга, Чеснокова, Кнопа (в зависимости от вида растений) или комплексным минеральным удобрением. По мере роста растений их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений соответствует принятой агротехнике выращивания для каждого индивидуального вида растений. Процесс адаптации пробирочных растений к почвенным условиям является наиболее дорогостоящей и трудоемкой операцией.

Нередко после пересадки растений в почву наблюдается остановка в росте, опадение листьев и гибель растений. Это связано, в первую очередь, с тем, что у пробирочных растений нарушена деятельность устичного аппарата, вследствие чего происходит потеря большого количества воды. Во-вторых, у некоторых растений в условиях in vitro не происходит образования корневых волосков, что приводит, в свою очередь, к нарушению поглощения воды и минеральных солей из почвы. Поэтому целесообразно на третьем или четвёртом этапах клонального микроразмножения применять искусственную микоризацию растений (для микотрофных), учитывая их положительную роль в снабжении растений минеральными и органическими питательными веществами, водой, биологически активными веществами, а также в защите растений от патогенов. Существует два способа заражения растений микоризообразующими грибами:

1) in vitro (в стерильных условиях);

2) in vivo (в естественных условиях).

Первый способ более благоприятен, так как в этом случае исключается возможность загрязнений почвы другими микроорганизмами. Кроме того, в условиях in vitro есть возможность контролировать условия культивирования (свет, температура, влажность) и подбирать субстрат (pH, аэрация), обеспечивающий нормальное формирование микоризы. Растения, размноженные in vitro, развиваются значительно лучше, если их корневая система находилась в контакте с микоризообразующими грибами. В этом случае улучшалось снабжение

их азотом, увеличилась в 1,5–2 раза приживаемость растений при их пересадке в почву, а также повышался прирост надземной биомассы. Такие работы были проведены с березой, эвкалиптом, каштаном, сосной, лохом и разными клонами ольхи. На эффективность микроклонального размножения влияет масса факторов различной природы. Это физиологические особенности вводимого в культуру растения, химические и физические условия культивирования. Наиболее важным моментом является выбор материнского растения и экспланта. При выборе материнского растения необходимо учитывать его физиологические, сортовые и видовые особенности. Исходные растения должны быть здоровы, не поражены грибными, бактериальными и вирусными болезнями. Кроме того, они должны находиться в состоянии интенсивного роста. Луковицы, корневища и клубни в состоянии покоя непригодны, перед введением в культуру их предварительно обрабатывают высокими или низкими температурами. Способность к размножению также детерминирована генетически. Например, земляника размножается всеми способами, облепиха – ни одним, хотя в природе черенкуется. Двудольные обладают большей регенерационной способностью, чем однодольные и древесные. При выборе экспланта необходимо учитывать его возраст, строение и происхождение. Для обеспечения максимальной стабильности клонируемого материала, во избежание появления аномальных растений в качестве экспланта желательно использовать молодые, слабо-дифференцированные ткани. Кроме того, экспланты от молодых растений лучше укореняются, чем от зрелых, особенно это касается древесных пород. Лучше всего использовать кончики стеблей, пазушные почки, зародыши, молодые листья, черенки, соцветия, чешую луковиц, то есть экспланты, содержащие меристемы. Размер экспланта является ещё одним фактором, определяющим успех микроразмножения. Чем меньше размер экспланта, тем меньше его регенерационная способность и наоборот. С другой стороны, в крупном экспланте увеличивается возможность появления в его клетках вирусов и других патогенов, что препятствует оздоровлению тканей.

Успех введения в культуру часто определяется эффективностью стерилизации. Выбор стерилизующего агента определяется особенностями экспланта. Для нежных тканей концентрация стерилизующего агента должна быть снижена, чтобы сохранить жизнеспособность экспланта. Часто внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное, поэтому экспланты предварительно обрабатывают фунгицидами и антибиотиками против грибной и бактериальной инфекций. Хорошие результаты дает обработка растений бензоатом натрия. Немаловажный фактор, влияющий на успех клонального микроразмножения – гормональный баланс питательной среды. При высоком соотношении гормонов цитокинин – ауксин происходит развитие пазушных меристем, при низком – индуцируется корнеобразование, а при среднем – наблюдается образование каллуса. Кроме цитокининов и ауксинов в питательную среду иногда добавляют гиббереллловую кислоту, которая стимулирует рост и вытягивание сформировавшихся почек и способствует получению растений с хорошо развитой надземной частью. К физическим факторам относится консистенция среды, кислотность, интенсивность освещения и температура. В

зависимости от вида растений необходимо учитывать консистенцию питательной среды. При культивировании эксплантов верхушки побегов в жидких питательных средах значительно стимулируется их рост, сокращается период выращивания и количество пересадок. Но, с другой стороны, в этих условиях возрастает возможность образования аномальных побегов. Использование твёрдых агаризованных сред способствует преодалению возникновения аномалий, но этот способ выращивания ухудшает условия питания эксплантов и препятствует удалению продуктов метаболизма. Состав питательной среды необходимо подбирать для каждого вида растений. На клональное микроразмножение и рост растений также влияет и кислотность среды, определяющая доступность для растений питательных веществ. Известно, что сильно кислые или щелочные среды лимитируют поступление фосфора и железа, делая их относительно нерастворимыми и этим ограничивая рост растений. Как правило, ткани и органы растений культивируют на питательной среде с pH 5,2–5,8. К физическим факторам выращивания относятся температура и условия освещения. Высокая интенсивность света может вызывать хлорозы и задерживать развитие, но при переносе в почву эти растения чувствуют себя лучше и растут энергичнее. Спектральный состав также играет немаловажную роль. Например, синий свет является основным компонентом морфогенеза. Красный свет стимулирует образование почек у табака, у салата – образование побегов, у березы – укоренение.

Температура культивирования оказывает значительное влияние на рост и регенерацию изолированных тканей растений. Для большинства растительных тканей температурный оптимум обычно варьирует в интервале 22–26 °С днем и 18–22 °С ночью. Для повышения коэффициента размножения необходимо каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания подбирать индивидуальные условия культивирования.

Культуру изолированных апикальных меристем используют для получения свободного от вирусов посадочного материала и для микроклонального размножения растений. Апикальная меристема обычно свободна от вирусов, она представляет собой конус активно делящихся клеток высотой 0,1 мм и шириной 0,25 мм. Поскольку меристему бывает трудно изолировать без повреждения, её часто отделяют с 1–2 листовыми зачатками. Для повышения эффективности оздоровления картофеля метод верхушечной меристемы сочетают с термо- и химиотерапией. Безвирусные растения размножают in vitro и высаживают в теплицы для получения безвирусных клубней.

Ход работы. Перед выполнением лабораторной работы необходимо изучить теоретический материал темы.

Выполнение лабораторной работы включает в себя следующие этапы:

1. Прорастить клубни картофеля в темноте при 20–22 °С.

2. Рабочее место, инструменты и пробирки протереть спиртом.

3. Пинцеты, скальпели, иглы стерилизовать перед каждой манипуляцией, погружая их в спирт и обжигая над пламенем спиртовки.

4. Ростки картофеля опустить в химический стакан и залить 1–6%-ным раствором гипохлорита кальция или натрия.

5. Затем не менее 3 раз промыть стерильной водой, поместить в стерильную чашку Петри и добавить несколько капель стерильной воды для предупреждения подсыхания.

6. Перед изолированием меристем с помощью препаровальной иглы под бинокулярной лупой с верхушки ростка удалить покровные листочки, последовательно обнажая боковые и верхушечные меристемы с примордиальными листочками.

7. Меристему, включающую кусочек ткани без листовых зачатков, изолировать обычной тонкой иглой.

8. Каждую операцию проводить отдельным простерилизованным инструментом.

9. Меристему на острие иглы перенести на поверхность питательной среды в пробирку, которую закрывают пробкой над пламенем горелки и поставить в штатив.

10. Штатив с пробирками закрыть целлофаном для предупреждения подсыхания среды и поставить в световую комнату.

11. Через 2, 3, 4 недели провести наблюдения за развитием побега из меристем и зарисовать этапы этого процесса.

Выводы. Выводы к лабораторной работе должны основываться на результатах проведенных исследований и соответствовать теме и цели лабораторной работы.

Форма отчета по лабораторной работе. Отчет по лабораторной работе должен включать в себя: номер и название лабораторной работы, цель работы, краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания в соответствие с ходом выполнения работы и вывод.

Контрольные вопросы

1. Что такое микроклональное размножение растений: основные этапы?
2. Каковы основные способы микроклонального размножения?
3. Как получить безвирусный посадочный материал?
4. Какой из способов получения безвирусного посадочного материала Вы бы предпочли в своей работе?
5. Чем отличаются питательные среды для пролиферации побегов, индукции корнеобразования, культивирования меристем, получения микроклубней?

Лабораторная работа 7. Культура изолированных зародышей

Цель работы. Формирование знаний о культуре изолированных зародышей зерновки пшеницы

Задание. Выполнение лабораторной работы включает в себя краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания и вывод. При подготовке к защите лабораторной работы следует ответить на контрольные вопросы.

Оборудование и материалы. Письменные и чертежные принадлежности; зрелые зерновки пшеницы, замоченные в воде за сутки до занятия, пробирки со стерильной агаризованной питательной средой МС с добавлением сахарозы 15000 мг/л, стерильный пинцет, скальпель, матрасики или чашки Петри, спиртовка, спирт, спички.

Теоретический материал. Одно из направлений клеточных технологий – использование их в селекции. Достоинство этого направления заключается в том, что при создании новых форм, сортов и гибридов растений облегчается и ускоряется традиционный селекционный процесс. Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей in vitro следующие.

Оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости) проводится в том случае, когда невозможно осуществить оплодотворение между выбранными парами в естественных условиях. Это вызвано несколькими причинами:

1) физиологические (несоответствие во времени созревания пыльцы и т. д.);

2) морфологические (короткая пыльцевая трубка или блокирование роста ее на разных этапах развития и т. д.).

Оплодотворение *in vitro* можно осуществить двумя способами:

а) культивирование на искусственной агаризованной питательной среде завязи с нанесенной на нее готовой пыльцой;

б) завязь вскрывается и на питательную среду переносятся кусочки плаценты с семяпочками, вблизи которых или непосредственно на ткани плаценты культивируется готовая пыльца.

Визуально определить, прошло оплодотворение *in vitro* или нет, можно по быстро увеличивающимся в размерах семяпочкам. Сформировавшийся зародыш, как правило, не переходит в состояние покоя, а сразу прорастает и дает начало гибридному поколению.

Постгамная несовместимость при отдаленной гибридизации возникает после оплодотворения. Часто при этом образуются щуплые невсхожие семена. В таких случаях из зрелой щуплой зерновки изолируют зародыш и выращивают его в питательной среде.

Выращивание зародышей в искусственной питательной среде называется эмбриокультурой. Среда для выращивания зрелого зародыша может быть простой, без добавок физиологически активных веществ (например, среда Уайта) или любая другая, содержащая минеральные соли и сахарозу. Эмбриокультура даёт возможность вырастить гибридные растения из неполноценных зародышей, но выход гибридных растений мал и гибриды часто бывают стерильны.

Получение гаплоидов *in vitro***.** Роль гаплоидных растений в селекции очень велика. Применение их позволяет быстрее найти нужную комбинацию, сокращает время для создания сорта. Искусственным путём с использованием методов in vitro удаётся получить большие количества гаплоидных растений тремя способами:

1) андрогенез – получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор;

2) гиногенез – андрогенез – получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семяпочек;

3) партеногенез – получение гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы.

Криосохранение растений**.** Криосохранение соматических клеток растений в жидком азоте (температура 196 градусов) – новое направление в биотехнологии, которое широко стало развиваться с начала 70-х годов 20 столетия. Цель данной технологии заключается в сохранении в культуре in vitro генофонда, а также в обеспечении селекционеров в любое время генотипом, имеющим искомые признаки.

Для проведения работ по клеточной селекции растений в условиях *in vitro* в качестве объекта исследования могут быть использованы каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты. Выбор объекта зависит от наличия разработанных технологий применительно к различным видам растений, а также от конечных целей исследования. Каллусная ткань представляет собой легкодоступный материал, который наиболее часто используют для клеточной селекции. Как правило, работу проводят на первичной или пересадочной каллусной ткани.

Однако при работе с каллусными культурами многие исследователи отмечают существенные недостатки данного объекта: медленный рост ткани, неравноценное для всех клеток действие токсических веществ, которые применяются в качестве селективного фактора, а также потеря регенерационной способности в процессе культивирования каллусных клеток. Несомненно, проводить селекцию целесообразно на уровне одиночных клеток (суспензионная культура, протопласты). Однако для многих видов растений не разработаны эффективные технологии и способы культивирования одиночных клеток. Поэтому, несмотря на перечисленные выше недостатки использования каллусных культур, этот способ селекции остается для некоторых видов растений пока единственным.

Получение стабильно устойчивых линий – процесс длительный. Как правило, селекция начинается с получения достаточного количества каллусной массы из изолированных растительных эксплантов, использующейся в дальнейшем для определения концентрации селективного фактора (построение дозовой кривой), при которой наблюдается одновременно рост каллусной ткани, и в то же время часть каллусных колоний погибает. Выбранная концентрация селективного фактора признается оптимальной и используется в дальнейших экспериментах. Так как первично полученные на средах с селективными факторами колонии клеток могли возникнуть вследствие физиологической адаптации или определенного состояния дифференцировки клеток и не быть генетически устойчивыми, то в течение последующих 4–6 субкультивирований на селективной среде проверяется стабильность устойчивости полученных клонов. Затем их переносят на среду без селективного фактора и субкультивируют еще 2–3 пассажа. И только после повторного возвращения в селективные условия отбирают стабильные клоны, из которых пытаются получить растения-

регенеранты. Большое число работ по культивированию каллуса, с целью получения нового селекционного материала, проведено на пшенице, ячмене, рисе, сорго, а также на картофеле, томатах, люцерне и, крайне редко, на древесных. Таким образом, использование каллусной культуры в селекционных целях открывает огромные возможности в создании новых форм растений, несущих ценные признаки, необходимые для человечества.

Культивирование растительных клеток in vitro представляет универсальную экспериментальную модель для получения и изучения биохимических растительных мутантов. Условно мутагенез делят на индуцированный и спонтанный. Подразумевается, что в первом случае мутации обусловлены действием известных и осознанно применяемых мутагенных факторов, а во втором случае природа мутаций случайна и не поддается конкретизации.

Индуцируемый мутагенез широко и давно применяется в генетике и селекции для получения истинных мутантов. Установлено, что вызвать мутации могут некоторые химические соединения, определенные электромагнитные излучения, а также некоторые вирусы и плазмиды. В клеточной селекции используются прежде всего химические и физические мутагены (УФ-излучение, рентгеновское излучение). При обработке исходного материала мутагеном значение имеет зависимость выживаемости клеток от дозы мутагена. Выживаемость может зависеть также от того, на какой стадии развития культуры применяется обработка мутагеном, поэтому мутагенез нужно проводить либо сразу после выделения протопластов, либо на следующий день.

Обладают токсическими свойствами и физические, и химические мутагены, но токсичность химических мутагенов несравнимо выше. Так, если даже высокие дозы облучения подавляют только репродуктивную и регенерационную способность клетки, сохраняя ее метаболическую активность, то при работе с химическими мутагенами наблюдается высокий процент летальности клеток, а иногда и гибель всей клеточной популяции. Поэтому, применяя химические мутагены, используют невысокие их дозы. Выживаемость зависит и от плоидности клеток. Так, гаплоидные протопласты более чувствительны к мутагенам, чем диплоидные.

Значение растительных белков в пище человека и животных невозможно переоценить, поскольку именно белки содержат незаменимые аминокислоты, которых нет в животных продуктах и которые люди неспособны синтезировать. Такими аминокислотами являются триптофан, лизин, треонин, метионин. Однако и у растений их недостаточно. Например, злаки имеют низкий уровень лизина, кукуруза – триптофана, бобовые – метионина. Поэтому данный признак в настоящее время включен во многие селекционные программы.

Одним из подходов к решению этой задачи является получение мутантов с нарушенной регуляцией биосинтеза аминокислот. Отбор таких мутантов проводят in vitro на средах с повышенным содержанием аминокислот или их аналогов.

Современные гербициды обладают селективным действием, т. е. при их применении гибнут только сорняки и остаются незатронутыми культурные растения. В основе такого дифференциального действия гербицидов лежит спо-

собность растений выводить или разлагать их до нетоксичных соединений. Традиционно из популяции растений выявляют устойчивые формы и вовлекают их в скрещивание. Однако, как правило, устойчивость характерна для дикорастущих видов и при скрещивании их с культурными формами может наблюдаться гибридологическая несовместимость. Иногда для получения гербицид устойчивых растений применяют мутагенез, но это требует анализа большого количества материала, т.к. частота мутаций низкая. Выделенные путем клеточной селекции линии, устойчивые к гербицидам, находят все большее применение в качестве исходного материала для исследований по генной инженерии растений.

Наиболее простой подход в селекции in vitro на устойчивость к болезням связан с культивированием клеток непосредственно в присутствии культурального фильтрата патогена. Для выбора правильной схемы селекции, прежде всего, необходимо знание жизненного цикла патогена. Многие патогены, например, грибы имеют различные стадии жизненного цикла, несколько стадий спороношения, в зависимости от которых могут изменяться выживаемость, рост и эпидемиология. Исследования по культивированию растительных клеток в присутствии патогена были начаты с 1965 г. и направлены на изучение корреляции устойчивости / чувствительности к патогену.

Следующий метод клеточной селекции – создание неполовых гибридов путём слияния изолированных протопластов, полученных из соматических клеток. Этот метод позволяет скрещивать отдалённые виды растений, которые невозможно скрестить обычным путём. Гибридизация соматических клеток даёт возможность соединить в одном ядре гены далёких видов растений и сочетать гены. В настоящее время продолжается разработка и совершенствование методов выделения и культивирования протопластов на искусственных питательных средах. Для культивирования протопластов применяют те же питательные среды, что и для культуры изолированных клеток и тканей. Отличительной чертой сред для протопластов является повышенное осмотическое давление на начальных этапах культивирования, которое обеспечивается высокой концентрацией хлорида кальция.

В процессе культивирования изолированные протопласты регенерируют новую клеточную стенку и превращаются в клетки, способные делиться и давать начало образованию каллусной ткани. Дальнейшая задача – получение из каллусной ткани растений-регенерантов. Протопласты выделяют из каллусных, суспензионных клеток или из клеток листьев, меристем, стеблей.

При выделении протопластов из листьев сначала удаляют эпидермис, лист нарезают на сегменты и затем подвергают обработке пектиназой или целлюлозой.

Использование изолированных протопластов в селекции растений не ограничивается возможностью их индуцированного слияния и получения соматических гибридов. Изолированные протопласты способны поглощать из окружающей среды макромолекулы и органеллы, т. е. в них можно вводить чужеродную информацию, не пересаживая ДНК или органеллы других клеток. Однако эти работы только начинают развиваться.

При отдалённой гибридизации наблюдается так называемая постгамная несовместимость, в результате чего зародыш остаётся недоразвитым, он неспособен к нормальному прорастанию. При более отдалённых скрещиваниях нарушения в развитии зародыша иногда наблюдаются уже на ранних этапах, что выражается в замедлении темпов роста, отсутствии дифференцировки. Процесс культивирования такого зародыша состоит из 2 этапов – эмбрионального роста, во время которого продолжается дифференциация, и его прорастания.

Ход работы. Перед выполнением лабораторной работы необходимо изучить теоретический материал темы.

Выполнение лабораторной работы включает в себя следующие этапы:

1. Предварительно замоченные семена стерилизовать спиртом в течение 2–3 мин.

2. Поместить по 10–20 шт. семян в марлевые мешочки и стерилизовать в растворе диацида или сулемы 15 мин.

3. Раствор слить во флакон для повторной стерилизации.

4. Промыть семена 3–5 раз стерильной дистиллированной водой в том же стакане, в котором проводили стерилизацию.

5. Пинцетом перенести зерновки на стерильный матрасик или в чашку Петри.

6. Положить зерновку бороздкой вниз и, придерживая пинцетом, скальпелем или иглой рассечь оболочку и выделить зародыш.

7. Зародыш, повёрнутый щитком вниз, перенести в пробирку или чашку Петри со средой МС без гормонов.

8. Через 2–3 недели зарисовать проростки, образовавшиеся из зародышей.

Выводы. Выводы к лабораторной работе должны основываться на результатах проведенных исследований и соответствовать теме и цели лабораторной работы.

Форма отчета по лабораторной работе. Отчет по лабораторной работе должен включать в себя: номер и название лабораторной работы, цель работы, краткий конспект теоретического материала по теме работы, результаты выполнения лабораторного задания в соответствие с ходом выполнения работы и вывод.

Контрольные вопросы

1. Что такое клеточная селекция и каковы её возможности?

2. Назовите биотехнологические методы ускорения селекционного процесса.

3. Что такое протопласты и как их используют в селекции?

4. Что такое криосохранение и его практическое применение в клеточных технологиях?

5. Что такое постгамная несовместимость и каковы пути её преодоления?

2. ТРЕБОВАНИЯ К ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

Студент обязан соблюдать действующие в университете правила внутреннего распорядка. Соблюдать действующие Правила пожарной безопасности.

Перед началом лабораторной работы студент должен занять место в аудитории согласно расписанию занятий, на столе должны находиться только предметы необходимые для выполнения лабораторной работы.

Во время выполнения лабораторной работы студент должен находиться на своем месте, не допускается хождение по аудитории. Запрещено заниматься посторонними делами, не связанными с учебным процессом (разговаривать, принимать пищу).

При выполнении лабораторной работы пользоваться только исправными приборами, материалами и электроарматурой; не оставлять без присмотра включенное оборудование и электроприборы.

При выполнении лабораторных работ с использованием химических реактивов студент обязан соблюдать правила безопасности: при работе с лабораторной посудой; при работе со спиртовкой и сухим горючим; при работе с химическими реактивами. Выполнение лабораторных исследований проводится в точном соответствии с утвержденными методиками.

При работе с химическими реактивами студент должен обязательно пользоваться индивидуальными средствами защиты (халат, резиновые перчатки, защитные очки).

При обнаружении неисправного лабораторного оборудования, химических реактивов с истекшим сроком годности и (или) получения травмы в ходе выполнения лабораторной работы студент обязан немедленно сообщить об этом преподавателю.

В случае нарушения требований техники безопасности студент отстраняется от выполнения лабораторной работы.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ К ТЕКУЩЕЙ АТТЕСТАЦИИ

Лабораторные работы предусмотрены для оценивания поэтапного формирования результатов освоения дисциплины.

Целью лабораторных работ является формирование умений и навыков по освоению методик работы по общей генетике.

В ходе выполнения лабораторных работ у обучающихся должны сформироваться практические умения и навыки, которые могут составлять часть профессиональной подготовки. По результатам выполнения лабораторной работы студент должен защитить свои теоретические и практические знания.

Критерии оценки устного ответа на контрольные вопросы следующие.

«5» (отлично): обучающийся демонстрирует системные теоретические знания, владеет терминологией, делает аргументированные выводы и обобщения, приводит примеры, показывает свободное владение монологической речью и способность быстро реагировать на уточняющие вопросы.

Обучающийся:

– на высоком уровне способен организовать свою работу ради достижения поставленных целей;

– на высоком уровне способен работать самостоятельно;

– на высоком уровне способен к познавательной деятельности;

– на высоком уровне способен применять на практике навыки проведения и описания исследований, в том числе экспериментальных;

– на высоком уровне способен проводить исследования в области основ биотехнологии, обрабатывать полученные результаты;

– на высоком уровне способен ориентироваться в основных проблемах основ биотехнологии.

«4» (хорошо): обучающийся демонстрирует системные теоретические знания, владеет терминологией, делает аргументированные выводы и обобщения, приводит примеры, показывает свободное владение монологической речью, но при этом делает несущественные ошибки, которые быстро исправляет самостоятельно или при незначительной коррекции преподавателем.

Обучающийся:

– на базовом уровне способен организовать свою работу ради достижения поставленных целей;

– на базовом уровне способен работать самостоятельно;

– на базовом уровне способен к познавательной деятельности;

– на базовом уровне способен применять на практике навыки проведения и описания исследований, в том числе экспериментальных;

– на базовом уровне способен проводить исследования в области основ биотехнологии, обрабатывать полученные результаты;

– на базовом уровне способен ориентироваться в основных проблемах основ биотехнологии.

«3» (удовлетворительно): обучающийся демонстрирует неглубокие теоретические знания, проявляет слабо сформированные навыки анализа явлений и процессов, недостаточное умение делать аргументированные выводы и приводить примеры, показывает недостаточно свободное владение монологической речью, терминологией, логичностью и последовательностью изложения, делает ошибки, которые может исправить только при коррекции преподавателем.

Обучающийся:

– на пороговом уровне способен организовать свою работу ради достижения поставленных целей;

– на пороговом уровне способен работать самостоятельно;

– на пороговом уровне способен к познавательной деятельности;

– на пороговом уровне способен применять на практике навыки проведения и описания исследований, в том числе экспериментальных;

– на пороговом уровне способен проводить исследования в области основ биотехнологии, обрабатывать полученные результаты;

– на пороговом уровне способен ориентироваться в основных проблемах основ биотехнологии.

«2» (неудовлетворительно): обучающийся демонстрирует незнание теоретических основ предмета, не умеет делать аргументированные выводы и приводить примеры, показывает слабое владение монологической речью, не владеет терминологией, проявляет отсутствие логичности и последовательностью изложения, делает ошибки, которые не может исправить, даже при коррекции преподавателем. Отказывается отвечать на поставленные вопросы.

Обучающийся:

– на низком уровне способен организовать свою работу ради достижения поставленных целей;

– на низком уровне способен работать самостоятельно;

– на низком уровне способен к познавательной деятельности;

– на низком уровне способен проводить исследования в области основ биотехнологии, обрабатывать полученные результаты;

– на низком уровне способен проводить исследования в области основ биотехнологии, обрабатывать полученные результаты;

– на низком уровне способен ориентироваться в основных проблемах основ биотехнологии.

4. СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ ОБУЧАЮЩЕГОСЯ

Основная литература

1. Биотехнология в растениеводстве: курс лекций / Т. В. Никонович, А. Н. Иванистов, В. В. Французёнок. – Горки: БГСХА, 2017. – 84 с.

2. Биологические препараты. Сельское хозяйство. Экология: Практика применения / ООО «ЭМ-Кооперация» / сост.: Т. А. Костенко, В. К. Костенко; под ред. П. А. Кожевина. – Саранск: ГУП РМ «Республиканская типография «Красный Октябрь»», 2008. – 296 с.

3. Блинов, В. А. Биотехнология (некоторые проблемы сельскохозяйственной биотехнологии) / В. А. Блинов. – Саратов: ОГУП «РИК «Полиграфия Поволжья», 2003. – 196 с.

Дополнительная литература

1. Блинов, В. А. Общая биотехнология: Курс лекций. В 2-х частях.– Саратов: ФГОУ ВПО «Саратовский СГАУ», 2004. – Ч. 2. – 144 с.

2. Блинов, В. А. Пробиотики в пищевой промышленности и сельском хозяйстве / В. А. Блинов, С. В. Ковалева, С. Н. Буршина. – Саратов: ИЦ «Наука», 2011. – 171 с.

3. Блинов, В. А. ЭМ-технология – сельскому хозяйству / В. А. Блинов. – Саратов, 2003. – 205 с.

4. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. Пер. с англ. / Б. Глик, Дж. Пастернак. – Москва: Мир, 2002. – 589 с.

5. Елинов, Н.П. Основы биотехнологии / Н.П. Елинов. – Санкт-Петербург: Наука, 1995. – 600 с.

6. Клунова, С. М. Биотехнология: учебник / С. М. Клунова, Т. А. Егорова, Е. А. Живухина. – Москва: Академия, 2010. – 256 с.

7. Мотовилов, К. Я. Экспертиза кормов и кормовых добавок: учебно-справочное пособие / К. Я. Мотовилов, А. П. Булато, В. М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2004. – 336 с.

8. Никульников, В. С. Биотехнология в животноводстве: учеб. пособие / В. С. Никульников, В. К. Кретинин. – Москва: Колос, 2007. – 544 с.

9. Сельскохозяйственная биотехнология / В. С. Шевелуха [и др.]. – Москва: Высшая школа, 2003. – 427 с.

10. «Биотехнология. Теория и практика» [Электронный ресурс] Биотехнология. – Режим доступа: http://www.biotechlink.org

Локальный электронный методический материал

Александр Иванович Юсов

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

Редактор С. Кондрашова
Корректор Т. Звада

Уч.-изд. л. 3,0. Печ. л. 2,3.

Федеральное государственное
бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Калининградский государственный технический университет»,
236022, Калининград, Советский проспект, 1