

# Генетичні основи біотехнології

## Лабораторне заняття № 4-6

### Поживні середовища для культивування клітин та тканин рослин. Поживне середовище Мурашіге-Скуга. Поживне середовище Гамборга-Евелега.

*Мета:* ознайомитися з основними типами поживних середовищ для культивування клітин та тканин. Навчитись готувати поживне середовище Мурашіге-Скуга та поживне середовище Гамборга-Евелега.

*Матеріали та обладнання:* Хімічні склянки, колби, мірні циліндри від 10 мл до 1 л, пробірки, піпетки від 0,01 мл до 10 мл або дозатори, ваги аналітичні, пінцети, рН-метр, ножиці, шпателі, електроплитка, магнітна мішалка, макро- і мікросолі, вітаміни, гормони, сахароза, агар-агар.

#### *Питання для самостійної підготовки*

1. Які речовини входять до складу поживних середовищ? Які функції вони виконують в культурі клітин і тканин рослин *in vitro*?
2. Які особливості приготування і зберігання маточних розчинів основних компонентів поживних середовищ?
3. У чому полягає порядок приготування культуральних середовищ?

### 3. Теоретичні відомості

Компоненти поживного середовища для вирощування рослинних клітин і тканин можна розділити на 6 основних груп, що зазвичай відображає порядок приготування концентрованих маткових розчинів: макроелементи, мікроелементи, джерело заліза, вітаміни, джерело вуглецю, регулятори росту.

Основою всіх поживних середовищ для культивування рослинних експлантів є суміш мінеральних солей. Це сполуки азоту в вигляді нітратів, нітритів, солей амонію; фосфору - у вигляді фосфатів; сірки - у вигляді сульфатів; а також розчинні солі  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ .

Залізо використовується у вигляді хелатів (наприклад,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  + етилендіамінтетраоцтової кислоти (ЕДТА) або її натрієва сіль  $Na$  ЕДТА (Трилон Б)) - найбільш доступній формі для засвоєння рослинними тканинами.

Як джерело вуглецю при вирощуванні гетеротрофних культур (калусов і суспензій) в поживні середовища додають вуглеводи в концентрації 20-60 г / л. Зазвичай це дисахариди (сахароза) або моносахариди (глюкоза, фруктоза, ксилоза та ін.). Полісахариди в поживних середовищах практично не використовуються. Тільки деякі типи тканин (пухлинні), що містять гідролітичні ферменти, вирощують на середовищах з крохмалем або іншими полісахаридами.

Для стимуляції біохімічних реакцій в культивованих клітинах використовують вітаміни групи В (В1, В6, В12), С (аскорбінова кислота), РР (нікотинова кислота), мезоінозит.

Для індукції калусогенеза до складу поживних середовищ повинні обов'язково входити ауксини (викликають клітинну дедифференціровку) і цитокініни (індукують поділ дедифференційованих клітин). В випадку індукції стеблового морфогенезу зміст ауксинов може бути знижено або вони можуть бути повністю виключені. На середовищах без гормонів ростуть пухлинні і "звичли" тканини. автономність по відношенню до обох класів екзогенних гормонів або до одного з них пов'язана зі здатністю цих клітин продукувати ендогенні гормони.

Як ауксинов в поживних середовищах використовують 2,4-діхлорфеноксиуксусная кислоту (2,4-Д) в концентраціях 0,1-1,0 мг / л, нафтілуксусная кислоту (НУК) - 0,1-2 мг / л, індолілуксусная кислоту (ІУК) - 1-30 мг / л. Для індукції калуса зазвичай необхідні високі концентрації ауксинів (частіше це 2,4-Д), але при подальших пересадках їх зменшують.

Як цитокінін штучні поживні середовища можуть містити кинетин, бензіламінопурин (БАП), зеатин в концентраціях 0,001-10 мг / л. БАП і зеатин активніші в порівнянні з кинетином в щодо підтримки зростання ізолюваних тканин і індукції органогенезу.

Крім ауксинов і цитокінінів, окремі поживні середовища включають гіберелова кислоту (ГК). Присутність ГК в середовищі не є обов'язковим, але в деяких випадках вона стимулює зростання ізолюваною тканини.

Як біологічних добавок для отримання первинного калуса можна використовувати рослинні екстракти (10-15% від загального обсягу середовища): кокосове молоко (рідкий ендосперм кокосового горіха), витяжки з незрілих зернівок кукурудзи (краще в період молочної стиглості), які містять цитокініни - зеатин і його похідні, а також сполуки з цитокініновою активністю (NN-діфенілмочевина).

Для культивування рослинних клітин і тканин *in vitro* застосовують рідкі і щільних (тверді) середовища. Щільних середовища готують на основі агар-агар - полісахариду, що входить до складу морських водоростей, який утворює з водою гель при рН 5,6-6,0. зазвичай до середовищі додають 0,7-0,8% агару. В якості ущільнювача і заміника агар-агар використовують поліакриламідні гелі (біогелі).

Розроблено багато поживних середовищ, але більшість з них представляють модифікації основних: Мурасіге-Скуга (МС), Уайта, ШенкаХільдебрандта, Гамборга (В5), Лінсмайера-Скуга, Хеллера, Чапека та ін.

Для штучних поживних середовищ розчини макро- і мікросолей готують заздалегідь і використовують багаторазово. Це маточні (концентровані) розчини. Їх зберігають у спеціальних умовах: макро- і мікросолі в холодильнику в судинах з притертими пробками при 0 ... + 4 ° С.

Вітаміни, фітогормони, ферменти, рослинні екстракти краще зберігати при 20оС в невеликих по 5-10 мл судинах з пробками. Маточні розчини макросолей

зазвичай перевершують робочі по концентрації в 10-40 разів, мікросолей - в 100-1000 разів, вітамінів - в 1000 разів.

Для приготування маточного розчину макро- і мікросолей кожен сіль розчиняють в окремому стаканчику при нагріванні, потім змішують і доводять до потрібного обсягу. В охолоджену суміш мікросолей останнім додають розчин солей молібдену, а в макросолі – розчин солей магнію (для запобігання випаданню осаду).

Маточний розчин хелату заліза готують і зберігають окремо від інших солей. Неправильне приготування хелатного заліза може призвести до випадання в осад після автоклавування фосфатів кальцію і магнію.

Концентровані розчини вітамінів готують кожен окремо шляхом розчинення відповідних наважок в дистильованій воді.

Фітогормони, як правило, погано розчиняються у воді. Тому попередньо 10 мг речовини розчиняють в невеликих кількостях (0,5-1 мл) спирту (ауксини, гібереліни), 0,5-1 н HCl або KOH (цитокініни), потім підігривають до повного розчинення (крім абсцизової кислоти і кинетина) і доводять до 10 мл об'єму (1 мл містить 1 мг гормону). У холодильнику їх можна зберігати при температурі 4°C не більше 1 міс.

### **Виконання роботи**

**Завдання 1.** Ознайомитися за теоретичним описом складу поживних середовищ.

**Завдання 2.** Приготувати маточні розчини основних груп елементів поживних середовищ.

**Завдання 3.** В порядку, визначеному прописом складу поживних середовищ, приготувати поживні середовища.

**Завдання 4.** Простерилізувати поживні середовища та розлити їх у відповідні культуральні ємкості.

### **Контрольні заходи**

Поточний контроль здійснюється після виконання кожної лабораторної роботи у вигляді захисту протоколу лабораторного заняття з максимальною оцінкою 5 балів. Протокол має містити: титульну сторінку, мету роботи, основну частину (об'єкт, методика, розрахунки), висновки.