

Генетичні основи біотехнології

Лабораторне заняття № 10-11

Аналіз впливу стерилізуючих речовин та компонентів середовища на ріст і розвиток експлантів. Види морфогенезу *in vitro*.

Мета: проаналізувати вплив стерилізуючих речовин та компонентів середовища на ріст і розвиток експлантів, ознайомитися з видами морфогенезу *in vitro*.

Матеріали та обладнання: асептичні рослини сенполії, калусних культур сенполії, стерильні чашки Петрі, скальпель, пінцет, ножиці, спиртівка, сірники, флакони з 96% -ним і 70% -ним етанолом, чашки Петрі зі стерильним живильним середовищем МС, що містить 2,4-Д (0,2 мг/л) і кінетин (0,2 мг / л) або ІУК (2 мг / л) або кінетин (0,2 мг/л), стерильна вода.

Питання для самостійної підготовки

1. Дайте визначення поняття "калусних тканин".
2. Перелічіть основні фактори необхідні для індукції процесу калусогенезу?
3. Що таке дедиференціація? Яку роль відіграють ауксини і цитокініни в даному процесі?
4. Яка з сполук з ауксиноюю активністю 2,4-Д або ІУК в більшій мірі сприяє утворенню калусу?
5. Чим обумовлена необхідність пасажування калусних культур на свіже поживне середовище?
6. З якою частотою зазвичай здійснюється субкультивування калусів?
7. Яких правил необхідно дотримуватися при пересадці калусних тканини на свіже поживне середовище?

Теоретичні відомості

У тих випадках, коли спостерігається інгібування росту первинного експлантів, за рахунок виділення їм в живильне середовище токсичних речовин (фенолів, терпенів і інших вторинних з'єднань), зняти його можна, використовуючи антиоксиданти. Це можливо двома способами: або омивкою експлантів слабким його розчином протягом 4-24 год, або безпосереднім додаванням в живильне середовище. В якості антиоксидантів використовують: аскорбінову кислоту (1 мг / л), глутатіон (4-5 мг / л), дітіотріетол (1-3 мг / л), діетілдітіокарбомат (2-5 мг / л), полівінілпіролідон (5000-10000 мг / л). У деяких випадках доцільно додавати в живильне середовище адсорбент - деревне активоване вугілля в концентрації 0,5-1%. Тривалість першого етапу може коливатися від 1 до 2 місяців, в результаті якого спостерігається зростання меристематичних тканин і формування первинних пагонів.

При довгому культивуванні рослинних тканин на поживних середовищах з підвищеним вмістом цитокінінів (5-10 мг / л) відбувається поступове накопичення їх в тканинах вище необхідного фізіологічного рівня, що призводить до появи токсичної дії і формування рослин із зміненою морфологією. Разом з тим, можливо спостерігати такі небажані для клонального мікророзмноження ефекти, як придушення проліферації пазушних меристем, освіту вітріфікованих (оводнених) пагонів і зменшення здатності рослин до вкорінення. Негативну дію цитокінінів можливо подолати, за даними Н.В. Катаевой і Р.Г. Бутенко, шляхом використання поживних середовищ з мінімальною концентрацією цитокінінів, що забезпечують стабільний коефіцієнт мікророзмноження, або шляхом чергування циклів культивування на середовищах з низьким і високим рівнем фітогормонів.

Калусогенез в культурі рослинних клітин і тканин

Калусна тканина - один з видів клітинного диференціювання, виникає шляхом неорганізованої проліферації дедиференційованих клітин органів рослини. У рослин в природі калусна тканина виникає в виняткових обставинах (наприклад, при травмах) і функціонує нетривалий час. Ця тканина захищає місце поранення, може накопичувати поживні речовини для анатомічної регенерації або регенерації втраченого органу. Освіта калуса не завжди пов'язане з травматичним впливом. Калус може виникнути і в результаті проліферації внутрішніх тканин експлантів без зв'язку з поверхнею зрізу через порушення гормонального балансу. Зростаючий калус розриває шари тканини і розвивається на поверхні.

Для отримання культивованих калусних клітин фрагменти тканин різних органів вищих рослин - коренів, листя, стебел, пиляків, зародків (експланти) поміщають на штучне середовище, що містить ауксини, в пробірки, колби, чашки Петрі (in vitro). Одними з найважливіших гормонів, що застосовуються при культивуванні in vitro, є ауксини, які активують розподіл і розтягнення клітин. Проникаючи в клітини, ІУК зв'язується зі специфічними рецепторами, впливаючи на функціональну активність мембран, рибосом і роботу ядерного апарату. Як ауксини використовують 2,4-діхлорфеноксіацетичну кислоту (2,4-Д), нафтілаацетичну кислоту (НАА), індоліл-масляну кислоту (ІМК), індолілаацетичну кислоту (ІУА) в концентрації 0,5 - 10 мг / л, в залежності від виду експлантів. Для регенерації рослини з калуса або експлантів використовують середовища з більш високим вмістом цитокінінів. До найбільш вживаною відносяться: 6-бензіламінопурин (БАП), зеатин, 6-фурфуріламінопурин (Кінетин). Процесу освіти калуса передують дедиференціювання тканин експлантів. При дедиференціюванні тканини втрачають структуру, характерну для їх специфічних функцій в рослині, і повертаються до станом клітин, які діляться. Якщо експлантів, який використовується для отримання калуса, є фрагментом органу, то має в своєму складі епідермальні клітини, клітини

камбію, судинної системи, серцевиною і первинної короною паренхіми. Переважно проліферують клітини камбію, кори, серцевинною паренхіми.

Клітини в культурі можуть існувати в двох видах: у вигляді суспензії в рідкому поживному середовищі і на поверхні твердої живильного середовища в вигляді калусу. Поверхнєве культивування здійснюють на твердій агаризованому середовищі. Калусна тканина, яку вирощують поверхневим способом, являє собою аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин, які не має чітко визначеної анатомічної структури. колір маси може бути білим, жовтуватим, зеленим, червоним. Залежно від походження і умов вирощування калусних тканини бувають: - пухкі, сильно оводненості, легко розпадаються на окремі клітини; - середньої щільності, з добре вираженими меристематичними вогнищами; - щільні, з зонами скороченої камбію і судин.

Як правило, в тривалій культурі на середовищах, що містять ауксини, калусні тканини втрачають пігментацію і стають пухкими. У циклі вирощування калусних тканини клітини після ряду поділів приступають до зростання розтягуванням, диференціюються як зріла калусна тканина і деградує. Для того, щоб не відбулося старіння, втрати здатності до поділу і подальшого зростання, а також відмирання калусних клітин, первинний калус переносять на свіже живильне середовище через 28 - 30 днів, тобто проводять пасажування або субкультивування калусних тканини.

Виникнення фізіологічних і структурних відмінностей між клітинами і тканинами рослин, пов'язане з їх функціональної спеціалізацією, називають процесом диференціації. поняття «Диференціація» відображає перетворення ембріональної, меристематичної клітини в спеціалізовані меристематичні клітини, однотипні за структурою і функціями, починають розвиватися різними шляхами, створюючи тканини різних органів.

Виконання роботи

Завдання 1. Ознайомитися за теоретичним описом та візуально як стерилізатори впливають на розвиток експлантів.

Завдання 2. Порівняти стан рослинних експлантів після хімічної стерилізації з різним режимом.

Завдання 3. Дати оцінку розвитку експлантів різного типу на різних середовищах.

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.