

Лекція 7-8. Вплив умов культивування.

Поживні середовища для культивування клітин, тканин та органів рослин

Поживні середовища, компоненти, які входять до їх складу, їх фізичні і хімічні властивості є однією із важливих умов успішного вирощування ізольованих клітин, тканин та органів рослин. Основою для підбору поживних середовищ слугували поживні розчини, які використовувались для вирощування цілих рослин. Основоположники методу *in vitro* Уайт і Готре користувались спочатку, перший – фізіологічною сумішшю для вирощування рослин Кноппа, а другий – розчином Успенських, розведеними в два рази. В середовищах, розроблених для культур тканин і органів рослин Уайтом (1946 р.) і Хеллером (1953 р.) вміст елементів мінерального живлення був значно вищим, але як було встановлено пізніше, явно недостатнім для підтримання максимального росту калусних і суспензійних культур. Середовища, які були розроблені протягом 70 – 80 років нашого століття, містять в 10 разів більше калію, натрію і фосфору. Загальна концентрація всіх мінеральних елементів найбільш висока в середовищах Мурасіге і Скуга (1962 р.), Ніча (1969 р.), Гамборга (1968 р.), Шенка (1972 р.).

На сучасному етапі для культивування клітин, тканин і органів використовують різноманітні модифікації цих середовищ стосовно до окремих випадків культивування тканин і органів різних видів рослин.

Середовище Мурасіге і Скуга – найбільш універсальне і багатоцільове середовище, яке сприятливе для рослинних клітин багатьох видів рослин. Дає позитивні результати при калусоутворенні та підтриманні неорганізованого калусного росту клітин і викликає індукцію морфогенезу у більшості дводольних видів.

Середовище Гамборга і Евеленга (середовище В-5) використовується при культивуванні клітин і тканин бобових рослин і злаків.

Середовище Уайта – для укорінення пагонів і нормального росту стеблової частини після регенерації.

Середовище Нічей та китайські середовища – рекомендують для індукції андрогенезу в культурі пиляків., а також для індукції морфогенезу у злаків.

Середовище Као і Михайлюка – для культивування одиничних (або з малою густиною висіву) ізольованих протопластів і клітин.

Будь-яке поживне середовище для вирощування культури ізольованих рослинних тканин включає до свого складу наступні компоненти:

- макроелементи
- мікроелементи
- вуглеводи
- амінокислоти
- вітаміни
- стимулятори росту синтетичного і природного походження
- агар (у випадку вирощування тканин на твердому поживному середовищі)
- воду.

Розглянемо кожний компонент поживного середовища окремо.

1. **Макроелементи**, які входять до складу більшості середовищ, представлені наступними елементами: азот, фосфор, калій, кальцій, магній, натрій, залізо, сірка, хлор.

Азот. Рослинні тканини, що ростуть в ізольованій культурі, автотрофні у відношенні азотного живлення. Використовуючи неорганічні джерела азоту, рослинні тканини на їх основі синтезують всі необхідні для життєдіяльності органічні азотні сполуки. Найкращою формою азотного живлення тканин є нітрати, у вигляді яких азот

входить до складу більшості поживних середовищ і тільки в деякі середовища, крім нітратів, додаються солі амонію.

За даними Хаймера і Філера асиміляція нітратів в культивованих клітинах рослин відбувається за наступною схемою:

Середовище (NO_3) // Нітратредуктаза // Нітритредуктаза – NH_4 перетворення аміаку в органічний азот: амінокислоти, білки, нуклеїнові кислоти.

Фосфор для росту рослинних тканин використовується в основному вигляді ортофосфату (PO_4^{-3}). Джерелом фосфорного живлення можуть бути також фосфати цукрів. Іони Na^+ , Cl^- , SO_4^{-2} потрібні для культивування тканин в невеликих кількостях і привносяться до складу середовища з елементами мінерального живлення і при регулюванні рН середовища.

Сірку вводять у вигляді сульфатів, сульфідів або амінокислот цистеїну, глутатіону, метіоніну.

Залізо використовують у вигляді неорганічних солей і солей органічних кислот. При цьому одночасно з солями залізо в поживне середовище вводять етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА). Наявність цієї сполуки як хелатуючого агента, покращує доступність заліза в широких межах рН, поскільки на його засвоєність впливають метаболіти, що виділяються культурами тканин.

2. Мікроелементи. Внесення Mn, Co, Cu, Zn, Mo в поживне середовище особливо важливе при культивуванні тканин в рідкому середовищі. Відсутність їх зменшує інтенсивність росту на 40% в першому пасажі і призводить до загибелі культури на протязі двох наступних пасажів. При вирощуванні ізольованих тканин на твердому агаризованому середовищі, вони не так гостро реагують на відсутність мікроелементів, оскільки агар містить в своєму складі макро- і мікроелементи.

3. Вуглеводи. Ці сполуки необхідні для нормального розвитку хлорофілоносних тканин. Хоча в останні роки і одержані клони культур тканин, які характеризуються значною інтенсивністю фотосинтезу і розроблені умови їх культивування, одержання автотрофних культур тканин – завдання майбутнього. В більшості поживних середовищ, які використовуються для ізольованих культур рослинних тканин, джерелом вуглецю і енергії є гексози: сахароза і глюкоза в концентрації 20-40 г/л. Дослідження класу вуглеводів, які найбільш придатні для росту окремих видів тканин, були проведені Готре. На середовищах з пентозами, за виключенням ксилоли, культури не ростуть. Для деяких тканин оптимальними джерелами вуглеводного живлення є фруктоза, манноза або галактоза. Тканини, для яких характерна наявність активних гідролітичних ферментів, які вони виділяють в поживне середовище, можуть рости на середовищах з полісахаридами: розчинним крохмалом (пухлинні тканини, тканини деревних рослин), рафінозою і целобіозою.

4. Амінокислоти. Окремі амінокислоти, внесені в поживне середовище як доповнення до нітратів можуть проявляти стимулюючу, пригнічуючу або нормативну дію, а суміш амінокислот, як правило, стимулює ріст тканин. Амінокислоти використовують в двох випадках:

- як єдине джерело азотного живлення;
- на фоні основного азотного живлення для активації метаболізму і росту тканин.

Дуже часто суміш амінокислот замінюють гідролізатом казеїну, який синергічно діє з цитокінінами та ауксинами. В деяких випадках внесення до середовища гідролізату казеїну може бути замінено дією однієї або декількох амінокислот.

5. Вітаміни. Більшість тканин, що культивуються *in vitro*, здатні до синтезу всіх необхідних для їх життєдіяльності вітамінів. Переважна кількість вітамінів, як відомо входять до складу ферментів-біокатализаторів різноманітних важливих реакцій обміну в тканинах. Ряд рослинних тканин синтезують вітаміни в субоптимальній кількості і при їх

внесенні до поживного середовища ріст тканин значно покращується. Крім того, внесення вітамінів в поживне середовище може викликати нормативний ефект. Вітаміни подовжують термін життя експланту і нормалізують деякі ростові процеси, що протікають при регенерації рослин. Найбільш важливу роль в рості культури тканин відіграють вітаміни групи В. Використовують жиророзчинні вітаміни: А, Д, Е, К та водорозчинні вітаміни: групи В (В₀ – В₁₂), нікотинову кислоту, пантотенаткальцію, мезо-інозит, параамінбензойну кислоту, фолієву кислоту, аскорбінову кислоту, біотин, рибофлавін.

Для росту ізольованих тканин більшості рослин при культивуванні їх на штучних поживних середовищах необхідна наявність в поживному середовищі різних стимуляторів росту. Без додавання в середовище стимулюючих речовин в культурі здатні рости тільки пухлинні тканини (галлові пухлини, пухлини вірусного походження, звиклі тканини) і камбіальні тканини обмеженого числа видів рослин.

а) стимулятори росту синтетичного походження підрозділяють на наступні групи:

- **ауксини** вводять для індукції клітинного ділення і диференціації. Вони активують утворення корневих зачатків у основи пагонів, цибулинок в культурі тканин, регулюють соматичний ембріогенез, регенерацію пагонів із калусів експлантів. Найчастіше використовують індолілоцтову кислоту (1-30 мг/л), нафтилоцтову кислоту (0,1-2 мг/л), 2,4 дихлорфеноксіцтову кислоту (1 мг/л);
- **цитокиніни** приймають участь майже у всіх морфогенетичних реакціях. Вони активують і прискорюють процес дедиференціації, клітинного ділення, утворення калусу, індукують розвиток пазушних бруньок, регулюють ріст соматичних зародків, активують диференціацію стеблових бруньок в калусій тканині. В поживних середовищах кінетин використовують в концентрації 0,001-10 мг/л, 6-бензиламінопурин – 0,0001-10 мг/л, зеатин – 0,01-10 мг/л.
- **гібереліни** активують ріст і витягування стебла: прискорюють ріст сформованих в культурі бруньок, сприяє отриманню рослин (посадкового матеріалу) з міцною, добре розвиненою надземною частиною.

б). стимулятори росту рослинного походження – рослинні екстракти. Додавання їх в середовище завжди викликає ефективну дію, але при цьому експерименти важко відтворюються, оскільки діючий компонент, як правило, точно не відомий. Для внесення в поживні середовища використовують кокосове молоко, ендосперми кінського каштану, грецького горіху, кукурудзи та інших злаків, екстракти із органів вегетуючих рослин, солодовий екстракт, дріжджовий екстракт, весняну пасоку деяких дерев, томатний сік, березовий сік.

7. **Агар.** Додають для приготування твердого поживного середовища. Агар – це полісахарид, який добувають із морських водоростей у берегів Далекого сходу, Китаю та Японії. Звичайний агар має вигляд пластинок, зерен, або порошку. Агар утворює з водою гель, який плавиться при температурі 100°С і твердне при +45° С. Слід зазначити, що агар втрачає здатність утворювати гель в кислому середовищі. Агар додають до поживного середовища в концентрації 0,8-1,5%. Останнім часом використовують гелеутворюючі речовини – біогелі, силікагелі, поліакріламідні гелі. Желатинові поживні середовища непридатні для культури *in vitro*, в зв'язку з тим, що желатин є токсичним для рослинних тканин.

8. **Вода.** Використовують дистильовану або бідистильовану воду. Воду або переганяють двічі, або отримують при допомозі іонообмінників (в деіонізаторах).

При створенні поживних середовищ і культивуванні на них тих чи інших експлантів слід враховувати вплив деяких фізичних факторів, необхідних для успішного культивування клітин тканин і органів рослин. До них відносять:

Умови аерації – особливо важливі при культивуванні тканин коренів і клітинної суспензії. Аерація середовища в певній мірі обумовлює аеробне чи анаеробне протікання біохімічних процесів і є одним із факторів, які спричинюють клітинну диференціацію.

Температурний фактор – безпосередньо впливає на ряд процесів і особливо на активність ферментів, необхідних для метаболізації джерел живлення та інших біохімічних процесів. Для більшості культивованих тканин температурний фактор становить +25-26°C.

Осмотичний тиск поживного середовища є однією із умов направлення швидкості транспорту речовин через цитоплазматичну мембрану клітин. Регуляція величини осмотичного тиску здійснюється в основному варіаціями компонентів поживного середовища, в ряді випадків для підтримання відповідного осмотичного тиску в поживне середовище вводять компоненти, які не є джерелом живлення і не мають токсичних властивостей.

Освітлення є необхідним фактором для утворення хлорофілу та морфогенезу, обумовлює реалізацію генетичної інформації, впливає на мітотичну активність і ріст клітин. Як джерело світла використовують люмінесцентні лампи з інтенсивністю освітлення 1000-5000 лк. Оптимум освітлення для більшості рослин лежить в області 1000 лк при 14-ти годинному світловому дні. Збільшення або зменшення інтенсивності світла пригнічують ріст і розвиток тканин.

pH поживного середовища. Концентрація іонів водню в поживному середовищі при автоклауванні впливає на стійкість індолілоцтової кислоти, на осідання фосфатів і солей важких металів, на желетинізацію агару, на стійкість вітаміну B₁, пантотенової кислоти, цистину, триптофану, гіберелової кислоти. Оптимальне значення pH для більшості рослинних тканин лежить в межах 5,0-5,5.

Слід відмітити, що і на сучасному етапі при розробці поживних середовищ та вдосконаленню їх складу приділяється багато уваги. Імовірно, що ніколи не буде створене універсальне середовище, оскільки клітини і тканини різних рослин ростуть і функціонують в різноманітних метаболічних умовах.

Об'єктами культури *in vitro* можуть бути різноманітні тканини, які беруть із різних частин рослини, так звані *експланти*. Експланти відбирають із здорових, сильних і не пошкоджених рослин. Найчастіше вирощують в ізолюваній культурі прокамбіальні тканини стебла, тканини, що містять первинний і вторинний камбій, судинну паренхіму коренеплодів і бульб, тканини зав'язі. *In vitro* культивують також тканини пелюсток квітів, пиляків, нуцелуса, пилкових трубок, відрізки кінчиків коренів, проростків, адвентивні корені, зародки непророслого насіння.

В культурі тканин рослин вирішальне значення має використання онтогенетично молодих експлантів. Недозрілі тканини і органи більш пластичні з точки зору здатності до морфогенезу *in vitro*, ніж зрілі тканини і органи. Особливо зручні, як експланти – меристеми, верхівки пагонів, пазушні бруньки. Тканини рослин, які культивуються *in vitro* характеризуються високим ступенем функціональної і структурної гетерогенності, навіть в тих випадках, коли вони отримані від одних і тих же донорних генотипів і в однакових умовах культивування. В основі диференціації клітин лежать процеси репрограмування, репресії і дерепресії генетичної інформації, що призводить до утворення спеціалізованих клітин (явище тотипотентності), які стають компетентними і здатними до взаємодії, асоціації, органогенезу і морфогенезу. В окремих клітинах відбуваються не диференціація, а лише процеси їх поділу.