

Лабораторне заняття № 6-7

Принципи дотримання стерильності. Типи рослинних експлантів. Основні етапи мікроклонального розмноження.

Мета: ознайомитися з принципами дотримання стерильності, типами рослинних експлантів та основними етапами мікроклонального розмноження.

Матеріали та обладнання: Ламінар-бокс, стеблові та листові експланти, ємкості з поживним середовищем, скальпелі, пінцети, ножиці, препарувальні голки, спиртівка, флакон з 96% спиртом, відбілювач, лабораторний посуд, харчова плівка, маркер.

Питання для самостійної підготовки

1. Яким чином здійснюється стерилізація посуду та інструментів для роботи з рослинними об'єктами в умовах *in vitro*?
2. Перелічіть способи стерилізації поживних середовищ, що містять і не містять термолабільні компоненти.
3. Яким чином здійснюється підготовка до роботи ламінар-боксу?
4. Назвіть основні правила роботи в умовах ламінар-боксу.
5. Охарактеризуйте основні етапи проведення стерилізації рослинних об'єктів.

Теоретичні відомості

Однією з умов успішного культивування ізолюваних органів, тканин, клітин і протопластів рослин є дотримання суворої стерильності, оскільки на штучних поживних середовищах добре розвиваються мікроорганізми, що представляє подвійну небезпеку. По-перше, в результаті життєдіяльності мікроорганізмів може істотно змінитися склад поживних середовищ, по-друге, ізолювані від рослини тканини, клітини і особливо протопластів легко пошкоджуються мікроорганізмами. Тому всі досліді проводять в стерильних умовах - ламінар-боксах. Стерилізації піддається ламінар-бокс, інструменти, посуд, поживні середовища, рослинний матеріал.

Стерилізація ламінар-боксу.

Ламінар-бокси призначені для культури ізолюваних клітин, тканин і деяких інших робіт, що вимагають стерильності. Стерильність забезпечується за допомогою бактеріальних фільтрів, через які нагнітається повітря. За 20 хв до початку роботи внутрішній обсяг ламінар-боксу опромінюють ультрафіолетовими лампами. Попередньо в ламінарії розміщують спиртову пальник, фарфоровий стакан з 96% -ним спиртом, колби або пробірки з живильним середовищем, які протирають 70% -ним спиртом. через 20 хвилин вимикають УФ і включають біофільтри. Для роботи в ламінарбоксі надягають стерильний халат, руки обробляють 70% -им спиртом.

Стерилізація посуду.

Спочатку посуд ретельно миють з використанням миючих засобів або розчину біхромату калію в сірчаній кислоті. Вимитий посуд обполіскують дистильованою водою і висушують в сушильній шафі. Щоб уникнути зараження простерилізованих предметів з повітря, перед стерилізацією їх загортають в обгортковий папір (у склянок і колб досить обернути алюмінієвою фольгою тільки шийку). Потім посуд поміщають в сушильну шафа і прогрівають при 160°C протягом 2 год (з моменту установки потрібної температури). За цей час гинуть не тільки бактерії, але і їх споречки. Ще більш суворої стерилізації можна домогтися під тиском в автоклаві, оскільки вологий жар більш згубний для мікроорганізмів і спор. Автоклавування проводять під тиском 2 атм протягом 25-30 хв.

Стерилізація інструментів.

Попередня стерилізація інструментів (скальпелів, пінцетів, голок і т.д.) полягає в нагріванні сухим гарячим жаром в сушильній шафі протягом 2 год при 140°C. Металеві предмети не можна автоклаувати: під дією пара вони іржавіють і тупляться. Безпосередньо перед роботою і в її процесі інструменти (пінцети, скальпелі, мікробіологічні петлі) ще раз стерилізують в ламінар-боксі, поміщаючи їх в фарфоровий стакан з 96% - вим етиловим спиртом і обпікаючи в полум'ї спиртівки. стерильний інструмент використовують тільки для одноразової маніпуляції. Перед повторним застосуванням його слід знову простерилізувати спиртом і обпалити.

Стерилізація поживних середовищ.

Живильні середовища, що не містять термолабільні компоненти, стерилізують в автоклаві або шляхом двократного кип'ятіння з інтервалом в кілька годин. Органічні рідини, що не виносять нагрівання, звільняються від бактерій при пропущенні через стерильні дрібнопористі бактеріальні фільтри з діаметром пор 0,45 мкм.

Стерилізація рослинного матеріалу.

Процес отримання стерильного рослинного матеріалу (вільного від епіфітних і ризосферних мікроорганізмів) складається з декількох етапів. Перший етап - попередня стерилізація. умови обробки матеріалу варіюють в залежності від об'єкта. Фрагменти стебла, кореня або листа промивають проточною водопровідною водою і поміщають в спирт (70% -ний розчин на 1 хв). Попередня стерилізація насіння - триваліша процедура, що залежить від ступеня їх забрудненості. Виділяють три групи насіння: 1 - з дуже незначною зараженістю поверхні мікроорганізмами, 2 - з зараженістю тільки зовнішньої поверхні насіння, 3 - з присутністю мікроорганізмів на поверхні і всередині насіння.

Першу групу легко знезаразити будь-якою стерилізуючою обробкою. Найчастіше це насіння пшениці, сорго, капусти.

Друга група вимагає більш ретельної поверхневої очистки. Насіння промивають в мильній воді, в розчині $KMnO_4$, 70% -ному спирті; деякі насіння обробляють гіпохлоритом натрію або кальцію з подальшою відмиванням стерильною водою. Ця група включає латук, шпинат, редис, томат, кукурудзу, моркву та ін.

Нарешті, третя група не може бути очищена до тих пір, поки внутрішні тканини не будуть незаражені. це насіння рису, соняшнику, соєвих бобів, сосни і деякі інші. відсоток насіння з внутрішнім зараженням мікроорганізмами варіює залежно від виду рослини, тривалості та умов зберігання насіння.

Другий етап - стерилізація. попередньо простерилізовані тканини або органи занурюють в стерилізує розчин. Всі процедури, пов'язані з використанням стерилізують речовин, проводять в асептичних умовах (ламінар-боксі). Стерилізуючий агент і тривалість його впливу підбирають в залежності від об'єкта. при цьому важливо не тільки забезпечити достатній ступінь чистоти рослинного матеріалу, а й зберегти його життєздатність. Одним із найбільш нешкідливих і ефективних агентів вважається гіпохлорит кальцію або натрію (зазвичай використовують розчини, в яких концентрація активного хлору становить 0,5-1%). Поряд з ними застосовують також 2-10% -ні розчини хлораміну; 0,1-1% -ні розчини сулеми; 5% -ний розчин формаліну; 10% -ний розчин CuSO_4 ; 5% -ний розчин фенолу; 13-18% -ві розчини перекису водню; 70% -ний розчин етанолу і т.п. Для стерилізації можна також використовувати хлорвмісні розчини відбілювачів, наприклад, засіб "Білізна" (розведення 1: 2, 1: 3) або дезінфікуючий засіб "Domestos".

Антибіотики застосовують для стерилізації рослинного матеріалу, внутрішні тканини якого інфіковані бактеріями. Найбільш часто застосовують стрептоміцин і тетраміцин в концентраціях 10-80 мг / л, ампіцилін - 200-400 мг / л, левоміцетин, каноміцин і інші.

Третій етап - відмивання об'єкта від стерилізуючого розчину (Постстерилізація). При цьому рослинний матеріал промивають 3-4 порціями стерильної дистильованої води, витримуючи його в кожній порції протягом 10-15 хв.

Типи експлантів: Способи отримання і методи стерилізації Виділення апікальних меристем

У культурі тканин можна розмножувати рослини і отримувати оздоровлений (безвірусний) посадковий матеріал. для оздоровлення рослин використовують культуру апексів або культуру апікальних меристем, так як в стебловий апекс віруси проникають повільніше, ніж в інші частини рослин. При культивуванні апексів розмноження вірусів пригнічується реакцією рослинного організму на травму, викликану відсіканням верхівки. В *in vitro* використовуються апекси верхівкових і бічних нирок (точок зростання), кінчиків коренів (особливо проростків). Апікальна меристема - група меристематических (освітніх) клітин, організованих в ростовий центр, що займає термінальне положення у втечі або корені і забезпечує освіту всіх органів і первинних тканин. Верхня частина апікальної меристеми представлена ініціалами (єдиною клітиною - у хвощів і багатьох папоротей і багатоклітинній структурою - у насінневих рослин). Найближчі похідні ініціальних клітин часто виділяють в зону протомеристеми. Слідом за нею лежать тканини, вже частково диференційовані, але все ще знаходяться в меристематичному стані, які відносять до частково детермінованої первинної меристеми. Залежно від вироблених нею систем тканин детермінована

меристема включає наступні клітинні комплекси: туніку, образуючу надалі первинну покривну тканину (епідерміс) і частина первинної кори, і корпус, клітини якого поступово формують комплекс які проводять тканин (центральний циліндр); в корені - дерматоген, диференціюється в первинну покривну тканину (різодерміс); періблему - майбутню первинну кору; плерому - центральний циліндр. Таким чином, майбутній хід розвитку меристематичних тканин частково детермінований вже самим розміщенням їх в апексі втечі і кореня. Зазвичай на поживні середовища висаджують невелику частину меристеми до 0,5 мм.

В цілому закономірність така: чим менше величина меристеми, тим більша ймовірність отримання безвірусних рослин. Її виділення здійснюється в ламінар-боксі з використанням препаративних інструментів під збільшенням біокулярного мікроскопа. Культивування рослин з апікальних меристем дозволяє отримувати безвірусний оздоровлений посадковий матеріал практично всіх сільськогосподарських культур. Найбільш повно розроблена технологія отримання безвірусного картоплі. Так система первинного насінництва та оздоровлення посадкового матеріалу картоплі включає наступні етапи: підготовка бульб для виокремлення апікальних меристем, видалення апікальних меристем, регенерація рослин з меристем, адаптація рослин-регенерантів в захищеному ґрунті, отримання першої продукції безвірусного матеріалу у відкритому ґрунті, вирощування безвірусного посадкового матеріалу в первинних ланках насінництва, збереження колекції сортів. У культурі тканин використовуються апекси верхівкових і бічних нирок. Щоб виключити вплив метаболітів бульби на проростки і підвищити регенераційні здатності вихідного матеріалу з середньої частини бульби вирізують очки з частиною паренхіми (1,5 x 1,5 см). очки пророщують на піску, попередньо обробленому сухим жаром. Етіюльовані проростки вирощують в темряві при температурі 25 ± 2 °C, вологості повітря 70-80%. Пісок двічі в день зволожують, через 7-10 днів проводять підживлення розчином Кнопа. Апікальні меристеми проростків ізолюють на 12-13 пластохроні (Проміжок часу між ініціаціями двох листових горбків).

Ізольовані меристеми культивують в асептичних умовах на поживних середовищах з багатим вмістом макро- і мікросолей, з підвищеною концентрацією цитокінінів (6-БАП 2 мг / л). У культуральній кімнаті з кондиціонованим повітрям підтримують температуру 25 ± 2 °C, вологість повітря 70%, освітленість 5 кЛх і фотоперіод 16 годин. В середньому від посадки меристеми на середу до формування проростків з 5-6 листочками проходить 30-45 днів, в деяких випадках від 2 до 8 місяців. Середовища в міру виснаження оновлюють, і проростки періодично пересаджують на нові середовища в стерильних умовах. Виділення клітин, їх груп і тканин. Регенерацію рослин з культури тканин можна отримати, використовуючи один з трьох методів: культуру зародків, органогенез, соматичний ембріогенез. Соматичний або нестатевий ембріогенез є процес формування зародкоподібних структур із соматичних клітин. Соматичний зародок - це незалежна дво полюсна структура, фізично не прикріплена до тканини, з якої вона походить. такі

зародки в подальшому можуть розвиватися і утворювати регенеранти через стадії, відповідне тим, що зустрічаються при розвитку зиготи. Подібне явище можна зустріти у багатьох видів рослин в умовах *in vitro* при роботі з культурами різних типів клітин, тканин і органів, тоді як в природі такі процеси відбуваються всередині семязачатка. При соматичному ембріогенезі перенесення калуса на середу без регуляторів росту зазвичай буває досить для стимуляції більш пізніх стадій розвитку зародка і його подальшого проростання. Утворення соматичних зародків з культур клітин, тканин і органів може відбуватися прямим або непрямим шляхом. Прямий соматичний ембріогенез полягає в формуванні вегетативного зародка з однією або декількох клітин тканини експлантів без стадії освіти проміжного каллуса. Таке явище спостерігається у цитрусових, де тканини нуцеллуса дають початок нуцеллярним зародкам. Є дані про пряму ембріогенезі в деяких культурах пиляків і протопластів. Однак у порівнянні з випадками непрямого ембріогенезу ці випадки рідкісні. Непрямий ембріогенез складається з декількох етапів: приміщення експлантів в культуру, яку треба буде стимуляції росту каллуса і формування передзародка (зазвичай на середовищі, що містить високі концентрації ауксинів), і перенесення калуса на живильне середовище без регуляторів росту, для того щоб індукувати формування біполярних зародків з передзародка. При відповідних умовах ці зародки проростають і утворюють рослини - регенеранти. Калус за своєю природою гетерогенний і може складатися з клітин багатьох типів, включаючи ініціал передзародка. Ініціал передзародка можуть складатися з однієї клітини або являти собою багатоклітинні освіти. Коли калус переносять на середовище з низьким вмістом ауксина, відбувається процес подальшого ембріогенезу, при якому утворюється велика кількість передзародків, а раніше сформувалися ініціал передзародка розвиваються в біполярні зародки. Розвиток зародків відбувається асинхронно.

Формування соматичних зародків може бути досягнуто шляхом використання відповідної живильного середовища, умов культивування та відбору експлантів. Соматичний ембріогенез моркви являє собою класичний приклад регенерації рослин за типом непрямого соматичного ембріогенезу. У моркви практично будь-яка частина рослини (корінь, черешок листа, лист, стебло або зіготи́чеський зародок) продукує ембріогенного каллус. З свежеізолірованих експлантів моркви і з ліній калусних клітин шляхом маніпуляцій із середовищем культивування можна індукувати освіти соматичних ембріодів. При розвитку цих соматичних ембріодів спостерігаються типові стадії розвитку (кулька і торпедо). збігаються зі стадіями розвитку заплідненої яйцеклітини в зародковому мішку розвивається насіння моркви. Це явище може служити одним з доказів тотіпотентності клітин вищих рослин. Морфогенетична здатність клітин в культурі клітин при тривалому культивуванні звичайно змінюється. У клітинах моркви, наприклад, вона може повністю пропадати через 30-40 тижнів після ізолювання експлантів, але зміною складу середовищ культивування її можна повернути. Це означає, що генетична інформація, необхідна для ембріогенезу, завжди присутній в клітинах і, що існують певні епігенетичні фактори, які необхідні для регуляції

соматичного ембріогенезу в культурі клітин моркви. У даній роботі вивчають ефект двох компонентів середовища культивування на соматический ембріогенез в закінчили ріст калусних ліній моркви. Отримання мікрочеренков

Використання мікрочеренків при клональному розмноженні рослин *in vitro* має найбільш широке поширення. Як живців частіше використовуються прокидаються нирки або верхівки молодих пагонів. У деяких випадках використовуються листові черешки - рослини здатні продукувати особини з фрагментів листів або їх черешків (сенполії, стрептокарпуси, бегонії королівські, сансивьера і ін.) Використання мікрочеренков при клональний розмноженні рослин *in vitro* має найбільш широке поширення. Як живців частіше використовуються прокидаються нирки або верхівки молодих пагонів. У кореневищних багаторічників (хости, Анемона, астильби, аконіти і ін.) використовують підземні нирки кореневища. У цибулинних листові луски (Лілії) або центральні нирки (нарциси, тюльпани) цибулин. У деяких випадках використовуються листові черешки - рослини здатні продукувати особини з фрагментів листів або їх черешків (сенполії, стрептокарпуси, бегонії королівські, сансивьера і ін.). При цьому головним є відбір живців на початкових етапах сезонного зростання. В цей період їх інфікування значно менше і підвищений гормональний фон сприяє більш ефективному введенню. При введенні таких живців *in vitro* використовується етапна стерилізація вихідного матеріалу з використанням спирту, перекису водню і хлорвмісних препаратів. При вдалому запровадженні в Надалі подальше їх клонування здійснюється з використанням мікрочеренків, які представляють собою нарізані фрагменти пагонів з 1-3 вузлами, або відокремлені пучки дрібних пагонів, рясно наростаючих в базальній частині. Цей же спосіб розмноження може бути використаний і з рослинами стерильними після розвитку рослин з калусних культур. Мікрочеренки відокремлюються від материнського клону і розсаджуються в нові колби з агаризованому середовищем. При досягненні ними «товарних» розмірів їх висаджують на середу з підвищеним фоном ауксинов (0,5-3,0 мг / л) для остаточного вкорінення. Після чого рослини готові до висадки з колб на ґрунтовий субстрат і адаптації до нестерильним умов. цей спосіб значно скорочує терміни процесу розмноження (минаючи стадії калюсоутворенням), однак при цьому не відбувається очищення матеріалу від вірусів. Цей спосіб розмноження заснований на формування адвентивних нирок і пагонів. Здатність до індукції адвентивних бруньок в звичайних умовах зустрічається у деяких видів рослин (наприклад, в роді бегонія). Така індукція в значній мірі визначається вмістом гормонів в середовищі або регулярним механічним пошкодженням верхівкової бруньки механічно (зрізанням верхівок). Результат - зняття апікального домінування і закладка адвентивних нирок. Цей метод вже став промисловим при виробництві посадкового матеріалу деяких культур. Ця модель найбільш детально була відпрацьована на картоплі. При роботі з картоплею найчастіше користуються живцюванням. для цього виріс в пробірці з меристеми втечу розчленовують з дотриманням стерильності на фрагменти розміром 0,5-1,0 см, кожен з яких повинен мати листочок і пазушні бруньки. Ці черешки відразу ж поміщають на поживне

середовище того ж складу для дорощування і вкорінення. При цьому середовище може бути як щільної (тобто з агаром), так і рідкої. Як тільки висаджені черепки сформуєть з пазушної нирки новий втечу, останній знову черенкують. Таким чином, з обмеженого числа «меристемних» рослин за кілька місяців можна отримати велику кількість безвірусного посадкового матеріалу (за півроку-30000). При цьому за кожен цикл живцювання воно зростає і 4-5 разів. На думку багатьох дослідників, способи розмноження на основі зняття апікального домінування мають мінімальний ступінь ризику щодо отримання неоднорідного потомства. Частота появи мутантних форм (в розрахунку на число новоутворень) тут не перевищує частоту появи таких при розмноженні рослини звичайними методами. Даний спосіб отримує все більшого поширення в практиці. Він універсальний і відрізняється відносно високою відтворюваністю отриманих результатів.

Етапи мікроклонального розмноження рослин.

Процес клонального мікророзмноження можна розділити на 4 етапи: Вибір рослини-донора, ізолювання експлантів і отримання добре зростаючої стерильної культури. Власне мікророзмноження, коли досягається отримання максимальної кількості меристематических клонів. Укорінення розмножених пагонів з наступною адаптацією їх до ґрунтових умов, а при необхідності депонування рослин-регенерантів при зниженій температурі (+ 2°C, + 10°C). Вирощування рослин в умовах теплиці та підготовка їх до реалізації або посадці в поле. Для культивування тканин на кожному з чотирьох етапів потрібне застосування певного складу живильного середовища.

Виконання роботи

Завдання 1. Ознайомитися за теоретичним описом основних видів стерилізації.

Завдання 2. Розділити рослинні експланти за основними групами та підготувати їх до стерилізації.

Завдання 3. Провести стерилізацію ламінар-боксу, лабораторного посуду та інструментів.

Завдання 4. Провести стерилізацію рослинних експлантів.

Завдання 5. Висадити стерильні рослинні експланти на відповідні поживні середовища з дотриманням умов стерильності.

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.