Управление образования и науки Тамбовской области

ТОГАПОУ «Аграрно-промышленный колледж»

**Методические рекомендации**

 по приготовлению питательных сред,

предназначенных для культивирования растительных тканей и клеток.

 Подготовил преподаватель Т.И. Орехова

Оглавление

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 1.Введение............................................................................................... 3 |  |
|  | 2 Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей на примере среды Мурасиге-Скуга........................................................................................................... 5 2.1Приготовление маточных растворовсреды ........................................................................................................ 72.2 Методика приготовления питательной среды…..................................................................................................... 82.3 Приложения…………………………………………………………..83.Список литературы………………………………………… ……….10 |  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |
|  |  |  |

 **1.Введение**

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. 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. 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.

Стерильные проростки выращивают с целью получения асептических растений и получения эксплантов in vitro.

Из апикальных меристем в питательной среде получают безвирусные растения картофеля, которые могут быть размножены и высажены в теплицы для получения безвирусных клубней. Для ускоренного размножения материала используются также клубни, полученные in vitro.

Каллусы на искусственных питательных средах, включающих фитогормоны, легко образуются на эксплантах из самых различных органов: из асептически прорастающих семян, отрезков стеблей и корней, изолированных фрагментов паренхимы, тканей клубня, изолированной сердцевины стебля, из листа, зародышей и др.

 Сущность метода выращивания изолированных тканей растений и получения каллуса заключается в том, что выделенный кусочек ткани (эксплант) стерилизуют и переносят на искусственную питательную среду, содержащие минеральные соли, органические вещества, фитогормоны. На такой питательной среде клетки начинают делиться.

Суспензия представляет собой одиночные клетки и агрегаты, которые растут в жидкой питательной среде определенного состава в стерильных условиях. Существуют разные способы культивирования суспензии: в колбах на качалках, ферментерах. Необходимое условие роста суспензии состоит в перемешивании или встряхивании среды, что обеспечивает аэрацию культур. Обычно суспензию получают из рыхлой каллусной ткани, помещая ее в жидкую питательную среду того же состава, что и для каллуса, но без агара. Растительные суспензии характеризуют по следующим показателям: количество жизнеспособных клеток, сегрегированность суспензии и плотность клеток в суспензионной культуре.

Одним из основных показателей, характеризующих суспензию, служит плотность клеточной популяции. Число клеток определяют после мацерации (разделения клеток) суспензии. Подсчет клеток ведется в счетной камере под микроскопом.

Для проведения клеточной селекции обычно применяют высев мелкоагрегированной суспензии в агаризованную среду. При этом одиночные клетки и мелкие агрегаты дают начало клеточным клонам. Конечная цель клеточной селекции-получение растений из клеточных клонов.

Клеточные оболочки у растений представлены главным образом целлюлозой, гемицеллюлозой и пектиновыми веществами. Поэтому для разрушения оболочки используют ферментные смеси на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ. Ферментные растворы лучше готовить непосредственно перед опытом. Для ферментации используют молодые листья, предварительно осажденную суспензионную культуру или каллусные ткани, растущие на агаре. Длительность ферментации зависит от типа ткани, состава ферментных растворов, температуры инкубации.

Растительные протопласты, высеянные на питательную среду, через три-четыре дня регенерируют клеточную оболочку и переходят к делению. К 12-14-му дню практически все клетки, начавшие делиться, превращаются в микроколонии. Состоящие из 20-40 клеток микроколонии переносят на среду для подращивания, где они превращаются в хорошо пролиферирующие каллусные ткани. Из каллусов можно получить растения-регенеранты.

Культивирование небольших количеств клеток в микрообъеме питательной среды оказывается полезным при изучении их жизнедеятельности.

**2. Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей на примере среды Мурасиге-Скуга.**
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 рН.

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 дифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление дифференцированных 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 6- 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 гибберелловую кислоту (ГК). Иногда к питательной среде добавляют растительные экстракты или соки. Наибольшей ростактивирующей способностью обладает кокосовое молоко-жидкий эндосперм кокосового ореха.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар-полисахарид, получаемый из морских водорослей. Обычно для получения твердой питательной смеси к среде добавляют 5-8% агара.

Для культивирования клеток, тканей и органов тех или иных растений используют питательные среды различного состава. Наиболее широко применяются среда Мурасиге-Скуга (табл.1.)

 **2.1 Приготовление маточных растворов**

Оборудование и техническое оснащение, необходимое для приготовления питательной среды .

Химреактивы (табл.1). Колбы или стаканы химические на100мл,600мл, 1000мл, автоматические однокапельные пипетки переменного объема, аналитические весы, технические весы, электроплитка, рН- метр, магнитная мешалка.

Прежде всего необходимо приготовить маточные растворы макро-, микросолей и витаминов. Для среды Мурасиге и Скуга обычно готовят маточные растворы следующего состава: 1) NH4 NO3 , KNO3 , KH2 PO4 , MgSO4.7H2 O (MgSO4 . 7H2 O вливают последним без нагревания, что предотвращает выпадение осадка); 2) раствор CaCl2 ; 3) раствор хелата железа (раствор FeSO4 и ЭДТА-Na2 , необходимый для образования хелата железа, следует нагреть до кипения); 4) раствор микроэлементов.

Количество солей, необходимых для приготовления маточных растворов, а также количество маточного раствора, которое надо взять для приготовления питательной среды, приведены в таблице 1.

Полученные растворы сливают в склянки с притертой пробкой, снабжают этикеткой и хранят в холодильнике. Хелат железа хранят в темной склянке.

Концентрированные растворы витаминов (каждого в отдельности) хранят во флакончиках. Для приготовления растворов берут десятикратную по отношению к добавляемой дозе навеску витамина и растворяют в 10 мл воды. В 1 мл этого раствора содержится порция витамина, необходимая для приготовления 1 л раствора по прописи Мурасиге-Скуга.

 **2.2 Приготовление питательной среды**

 Навески агара помещают в две плоскодонные колбы объемом 0,5 л, добавляет воды, растворяют агар на плитке. В мерном стакане растворяют навески глюкозы (с перемешиванием на магнитной мешалке), добавляют заранее отмеренные объемы маточных растворов макро- и микроэлементов , хелата железа , источника кальция и инозитол . Добавляют раствор солей к раствору агара, доводит общий объем каждой среды до требуемого.

 Затем по каплям добавляют однонормальный раствор щелочи и, сверяясь с показаниями рН-метра, доводят рН среды до нужной отметки 5,8. Применение магнитной мешалки обеспечивает быстрое перемешивание растворов.

 Каждую колбу закрывают крышкой из двух слоев алюминиевой фольги и колпачком из пергаментной или упаковочной плотной бумаги. Чтобы крышки плотно сидели на горлышке колбы их прихватывают поверх бумажных колпачков резинкой.

Питательные среды стерилизуют, добавляют требуемое количество фитогормонов и регуляторов роста.

Требуемое количество солей для приготовления маточных растворов Среды Мурасиге-Скуга.

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группа веществ | Вещество | Концентрация, мг/л | Навеска в-ва , мг | Разводится в мл воды | Объём маточного р-ра на 1 л среды, мл |
| Макроэлементы | NH4NO3KNO3MgSO4·7H2OKH2PO4 | 16501900370170 | 165001900037001700 | Разводят на 1 л | 100 |
| Источник кальция | CaCl2·2H2O | 440 | 4400 | На 100 мл | 10 |
| Микроэлементы | MnSO4·4H2OH3BO3ZnSO4·7H2ONa2MoO4·2H2OCuSO4·5H2OCoCl2·6H2OKI | 22,36,28,60,250,0250,0250,83 | 2230620860252,52,583 | Разводят на 100 мл | 1 |
| Хелатжелеза | FeSO4·7H2ONa2ЭДТА·2H2O | 27,837,3 | 557745 | На 100 мл каждый | 10 |
| Углево-ды | Сахароза | 30000 | Добавляют в сухом виде |
|  | Агар | 6000 |

 СПИСОК  ИСПОЛЬЗУЕМОЙ  ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия. - М.: Ленанд, 2017. - **118** c

2. Биотехнология. Теория и практика / Н.В. Загоскина и др. - М.: Оникс, 2016. - 496 c.

3.Калёнов, С. В. Дистанционная подготовка биотехнологов. Элементы виртуальной образовательной среды. Учебное пособие / С.В. Калёнов, В.И. Панфилов, А.Е. Кузнецов. - М.: ДМК Пресс, 2014. - 94 c.
4. Клунова, С. М. Биотехнология / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. - М.: Академия, 2016.

5. Клунова, С. М. Биотехнология / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. - М.: Академия, 2015.