

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Основи генетичної та клітинної інженерії

Частина II Клітинні технології рослин Лабораторний практикум

Навчальний посібник

Рекомендовано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
як навчальний посібник для здобувачів ступеня бакалавра
за спеціальністю 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Укладачі: І. Р. Клечак, В. М. Ліновицька, Л. О. Тітова

Електронне мережне навчальне видання

Київ
КПІ ім. Ігоря Сікорського
2022

Рецензент *Михайлова О. Б.*, канд. біолог. наук, старш. наук. співроб.,
Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України

Відповідальний редактор *Дуган О. М.*, д-р біолог. наук, проф.,
Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

*Гриф надано Методичною радою КПІ ім. Ігоря Сікорського
(протокол № 6 від 24.06.2022 р.)
за поданням Вченої ради факультету біотехнології і біотехніки
(протокол № 11 від 14.06.2022 р.)*

У навчальному посібнику розглядаються методики клітинної інженерії рослин. Представлено методи підготовки живильних середовищ, отримання стерильних рослин, первинних калусів з використанням різних експлантів та методи культивування *in vitro*. До кожної лабораторної роботи наведено короткі теоретичні відомості, рекомендації щодо виконання, вимоги до оформлення та контрольні запитання за темами. Показано переваги використання нових об'єктів біотехнології – рослинних клітин для вирішення фундаментальних та практичних завдань біотехнології.

Призначений для здобувачів ступеня бакалавра за спеціальністю «Біотехнології та біоінженерія».

Реєстр. № НП 21/22-706. Обсяг 1,1 авт. арк.

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
проспект Перемоги, 37, м. Київ, 03056
<https://kpi.ua>

Свідоцтво про внесення до Державного реєстру видавців, виготовлювачів
і розповсюджувачів видавничої продукції ДК № 5354 від 25.05.2017 р.

© І. Р. Клечак, В. М. Ліновицька, Л.О. Тітова
© КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2022

ЗМІСТ

Вступ	4
Заходи безпеки під час виконання лабораторних робіт	5
Методи стерилізації, що застосовуються при роботі з культурами рослин <i>in vitro</i>	7
<i>Лабораторна робота 1</i>	
Приготування живильних середовищ, призначених для культивування культур клітин, тканин та органів рослин	9
<i>Лабораторна робота 2</i>	
Стерилізація експлантів та вирощування асептичних рослин	17
2.1. Стерилізація насіння і вирощування асептичних рослин	19
2.2. Стерилізація бульб, коренеплодів і кореневищ та отримання первинного калусу	22
2.3. Стерилізація листків та отримання первинного калусу	23
<i>Лабораторна робота 3</i>	
Культивування ізольованих клітин, тканин та органів в умовах <i>in vitro</i>	27
Вимоги до оформлення протоколів	30
Список рекомендованої літератури	31
Перелік використаних джерел	31

ВСТУП

Дисципліна «Основи генетичної та клітинної інженерії» викладається згідно навчального плану підготовки бакалаврів спеціальності «Біотехнології та біоінженерія» і призначена ознайомити студентів з сучасними методами дослідження та створення нових продуцентів. За своїм змістом дисципліна займає значне місце в процесі підготовки фахівців з біотехнології і є продовженням дисципліни «Генетика».

Лабораторний практикум з дисципліни «Основи генетичної та клітинної інженерії» призначений для отримання навичок з експериментальної роботи в галузі генетичної та клітинної інженерії і складається з 3 частин: генетичне конструювання *in vivo*, клітинні технології рослин та застосування клітинних культур в біотехнології і вірусології. В процесі виконання лабораторних робіт в рамках II частини «Клітинні технології рослин» студенти засвоюють методи і способи постановки і проведення експериментів з рослинами.

Кожне лабораторне заняття складається з трьох етапів. На першому етапі відбувається обговорення особливостей виконання деяких операцій, а також перевірка правильності складеної студентами блок-схеми експерименту. На другому етапі виконується відповідна лабораторна робота. Після отримання результатів на третьому етапі оформлюється протокол лабораторної роботи, що обов'язково повинен містити блок-схему, розрахунки, таблиці, ілюстративні матеріали, докладні висновки, де студент демонструє вміння аналізувати отриманий експериментальний матеріал та знання теоретичного матеріалу не тільки з даної дисципліни, але й з суміжних дисциплін. В кінці кожної лабораторної роботи є питання для самоконтролю, які складаються як з питань за змістом лабораторних робіт, так і з теоретичних питань.

В залежності від часу, відведеного у робочому навчальному плані на лабораторні заняття, форми навчання та спеціалізації студентів можливе проведення наведених робіт в повному обсязі або частини на вибір.

ЗАХОДИ БЕЗПЕКИ ПІД ЧАС ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

1. Під час перебування та виконання робіт у біотехнологічній лабораторії слід суворо дотримуватись вимог з безпеки та охорони праці, викладених в інструкції. У разі, якщо здобувач вищої освіти не ознайомлений із зазначеними вимогами, він повинен повідомити про це викладача. Здобувач вищої освіти несе персональну відповідальність за власну безпеку під час перебування у лабораторії, що підтверджує особистим підписом у журналі з безпеки та охорони праці під час проведення інструктажу.
2. В лабораторії категорично забороняється вживати їжу та напої.
3. У лабораторію забороняється входити у верхньому одязі. Усі здобувачі вищої освіти повинні працювати в чистих бавовняних халатах, які мають бути застебнуті на всі гудзики. Волосся необхідно прибрати з обличчя та сховати під шапочку.
4. На лабораторному практикумі студенти працюють в латексних або нітрилових рукавичках. По закінченню всіх видів робіт, у тому числі прибирання робочого місця, рукавички викидають у спеціальні ємності і ***обов'язково миють руки з використанням дезінфікуючих засобів.***
5. На лабораторних столах не повинно бути зайвих речей, лише необхідне канцелярське приладдя. Обов'язковим є наявність блок-схеми експерименту.
6. Лабораторні роботи виконуються переважно з дотриманням асептичних умов.
7. Для проведення лабораторного практикуму використовуються тільки стерильні живильні середовища, буферні розчини, інструменти та матеріали.
8. При використанні відкритого полум'я (газовий пальник, спиртівка) необхідно впевнитись у його стійкому та зручному розташуванні на робочому столі. Розташовувати спиртівку потрібно на відстані не менш, ніж 20 см від краю робочого стола. Запалювати спиртівку та газовий пальник можна лише за допомогою сірника. При роботі зі спиртівками забороняється запалювати спиртівки одну від одної. Гасити запалену спиртівку потрібно,

закривши доступ повітря спеціальним ковпачком, а газовий пальник – перекриттям вентиля доступу газу. Запалену спиртівку заборонено пересувати з місця на місце. По закінченню роботи з газовими пальниками необхідно перекрити газовий кран. У разі випадкового займання ватно-марлевої пробки, паперового ковпачка або інших легкозаймистих матеріалів, що знаходяться на робочій поверхні, необхідно терміново загасити полум'я, закривши доступ повітря.

9. У лабораторії необхідно дотримуватися правил безпеки під час роботи з хімічними речовинами. За необхідності (робота з концентрованими хімічними речовинами) потрібно використовувати засоби індивідуального захисту (рукавички, респіратори, гумовий фартух, захисні окуляри). У разі потрапляння будь-яких хімічних речовин на шкіру необхідно змити реактив великою кількістю води; нейтралізувати кислоту необхідно слабким розчином соди, а луг – слабким розчином оцтової кислоти. Роботу з концентрованими та леткими хімічними речовинами необхідно проводити під витяжною шафою.
10. Необхідно суворо дотримуватися вимог електробезпеки. Забороняється використовувати несправне електрообладнання і вмикати прилади без дозволу викладача або лаборанта, а також торкатися поверхні приладу мокрими руками.
11. Після закінчення роботи здобувач вищої освіти повинен прибрати та упорядкувати робоче місце, руки необхідно ретельно вимити, а за потреби обробити дезінфікуючим розчином.

МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ, ЩО ЗАСТОСОВУЮТЬСЯ ПРИ РОБОТІ З КУЛЬТУРАМИ РОСЛИН *IN VITRO*

Обов'язковою умовою проведення досліджень, що стосуються біотехнології рослин, є дотримання умов стерильності на всіх етапах. Для цього проводиться підготовка приміщення та ламінарного боксу, обладнання та інструментів та готуються стерильні живильні середовища.

Підготовка лабораторії та ламінарного боксу. Лабораторію слід утримувати в ідеальному порядку та регулярно проводити вологе прибирання з дезінфікуючими речовинами. Перед початком роботи лабораторію або ламінар-бокс опромінюють ультрафіолетом упродовж 2-х годин. Під час опромінення категорично забороняється перебувати в цьому приміщенні, а приступати до роботи можна не раніше, ніж через 30-45 хв після закінчення опромінення. Не можна допускати потрапляння ультрафіолетового світла на відкриті ділянки шкіри і в очі, а за необхідності слід одягати спеціальні захисні окуляри.

Підготовка посуду. Полягає в митті, ополіскуванні та висушуванні. Миття посуду проводиться послідовно. Спочатку потрібно замочити посуд у теплій воді, видалити агар. Якщо наявна значна контамінація, то такі ємності спочатку дезінфікують автоклавуванням. Далі необхідно промити посуд у теплій воді та обробити хромовою сумішшю (9,2 г розтертого на порошок кристалічного біхромату калію розчиняють в 100 мл концентрованої сірчаної кислоти, обережно помішуючи скляною паличкою). Обробка хромовою сумішшю здійснюється із суворим дотриманням правил безпеки при роботі з концентрованими кислотами: при обробці посуд беруть металевими щипцями й обережно обполіскують у хромовій суміші.

Наступним етапом є промивання посуду послідовно у водопровідній і дистильованій воді і висушування.

Стерилізація посуду та матеріалів. Ємності для культивування та для виконання асептичних маніпуляцій (флакони, колби, пробірки, чашки Петрі та ін.) перед заповненням їх живильними середовищами стерилізують сухим жаром у сушильній шафі. Тривалість стерилізації становить 2 години за

температури 150-170°C. Також посуд і матеріали можна стерилізувати вологим жаром під тиском 2 атм. протягом 25-30 хвилин.

Стерилізація інструментів. Попередню стерилізацію інструментів проводять нагріванням сухим жаром у сушильній шафі при 140°C 2 години. Не допускається стерилізувати металеві інструменти в автоклаві, тому що під дією пари вони швидко іржавіють і тупляться. Безпосередньо перед роботою та у процесі виконання маніпуляцій з рослинними культурами (перед кожною операцією) металеві інструменти стерилізують етиловим спиртом з наступним обпалюванням (фламбуванням) у полум'ї спиртівки.

Лабораторна робота 1

ПРИГОТУВАННЯ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ, ПРИЗНАЧЕНИХ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ КУЛЬТУР КЛІТИН, ТКАНИН ТА ОРГАНІВ РОСЛИН

Мета роботи: сформувати вміння приготування спеціалізованих живильних середовищ, призначених для культивування культур рослинних клітин, тканин та органів *in vitro* різними методами.

Короткі теоретичні відомості

В сучасній біотехнології рослин використовують різноманітні живильні середовища для культивування *in vitro* органів, тканин і клітин. Більшість з них є модифікаціями основних живильних середовищ: Уайта, Гамборга, Мурасиге і Скуга (МСк).

До складу будь-якого живильного середовища для вирощування культур рослин входять наступні групи речовин:

- мінеральні солі – макро- і мікроелементи;
- вуглеводи;
- вітаміни;
- амінокислоти;
- стимулятори росту - синтетичного і натурального походження;
- вода;
- агар.

Основою створення живильних середовищ для вирощування рослинних клітин, тканин та органів є суміш мінеральних солей (макро- та мікроелементів), вуглецю (сахароза або глюкоза), азот у вигляді нітратної або амонійної солі, фосфор (у вигляді фосфату), сірка (у вигляді сульфату) та іони K^+ , Ca^+ , Mg^+ .

Мінеральне живлення

1. Азот. Представлений в середовищах у вигляді нітрату. В деяких середовищах (Мурасиге і Скуга, Гамборга) азот додають у вигляді солей

амонію. Концентрація нітратів, що зазвичай використовують у середовищах, складає 2-25 мМ. У деяких випадках для інтенсифікації процесів росту калусних та суспензійних культур сумарну концентрацію нітрату та аміаку збільшують до 60 мМ. Можна використовувати одночасно нітрати та солі амонію (10-20%), що сприяє кращому росту тканин.

2. Фосфор. Використовується у вигляді ортофосфату. Крім цього, можуть бути використані фосфати цукрів.

3. Іони Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-} . Додаються до середовищ у невеликих кількостях, у вигляді солей.

4. Сірка. До складу середовищ вносять у вигляді сульфату, сульфіту, цистеїну, глутатіону або метіоніну.

5. Іони заліза. Додають до середовища у вигляді солей органічних кислот (цитрат заліза) або неорганічних солей ($FeCl_2$, $Fe_2(SO_4)_3$). Для покращення доступу заліза рекомендується вводити хелатуючі реагенти, наприклад, етилендіамінтетраоцтову кислоту (ЕДТА).

Крім основних макроелементів, до складу середовищ входять мікроелементи: бор, цинк, кобальт, манган, молібден. Ці компоненти додаються у вигляді неорганічних солей.

Вуглеводне живлення

У середовищах для культивування рослинних клітин, тканин і органів як джерело вуглецю та енергії використовують сахарозу або глюкозу в концентрації 20-40 г/л.

Регулятори росту

Для дедиференціації та калусогенезу будь-яких рослинних клітин обов'язковою умовою є наявність в середовищі регуляторів росту – фітогормонів (ауксинів та цитокінінів). Гібереліни використовуються рідко і тільки для обмеженого переліку експлантів.

Оскільки різні експланти дуже відрізняються в умовах культивування *in vitro* за здатністю до синтезу та метаболізму окремих фітогормонів,

додавання екзогенних регуляторів росту фактично визначає успіх культивування.

В залежності від потреб тканин рослин у екзогенних фітогормонах виділяють декілька груп тканин:

- тканини, для росту яких потрібні тільки ауксини;
- тканини, які ростуть на середовищах з цитокініном;
- тканини, для росту яких необхідні і ауксини, і цитокініни;
- тканини, які ростуть на складних за складом середовищах;
- тканини, які ростуть на середовищах без регуляторів росту (культури тканин пухлин)

Для отримання та підтримання культур тканин використовують наступні **ауксини**:

- β-індолілоцтова кислота (ІОК) – в концентрації 1-30 мг/л;
- α- нафтилоцтова кислота (НОК) – в концентрації 0,1-0,2 мг/л;
- 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота (2,4-Д) – в концентрації меншій, ніж 1 мг/л;

Цитокініни (у різних концентраціях):

- кінетин (Кін)
- 6-бензиламінопурин (БАП)
- Зеатин

Якісний склад фітогормонів та їх концентрації підбирають для кожного експланту в окремому досліді в залежності від способу культивування та виду рослини, використовуючи методи математичного планування.

Вітаміни. Основне призначення вітамінів у складі середовищ для культивування – виконання функції коферментів, що контролюють найважливіші реакції метаболізму.

Тіамін (B_1) – приймає участь у складі піруватдекарбоксилази у перетворенні вуглеводів та окислювальному декарбоксилюванні кетокислот. До середовищ його вводять в концентрації 0,1-10,0 мг/л.

Піридоксин (В₆) – приймає участь у процесах декарбоксилування та переамінування амінокислот.

Нікотинова кислота – входить до складу окислювально-відновлювальних ферментів – дегідрогеназ у вигляді амідів. В середовище вводять в концентрації 0,5 – 1,0 мг/мл.

Агар-агар. Широко використовується як ущільнювач середовищ. Плавиться при температурі +100⁰С, а твердне – при +45⁰С. Це полісахарид, який отримують з морських водоростей, з водою утворює гель.

рН середовища. Більшість культур рослинних клітин, тканин та органів ростуть на середовищах з рН 5,6 – 5,8. Відносно стабільне значення рН у середовищі підтримується за рахунок хелатуючих реагентів або відповідних сполук.

Для зручності і прискорення процесу приготування живильних середовищ доцільно готувати ***концентровані (маточні) розчини макро- і мікросолей, вітамінів і регуляторів росту.*** Маточні розчини макросолей готують у концентраціях, що у 10 разів перевищують потрібні. Маточні розчини мікроелементів готують у концентраціях, що у 100 разів перевищують потрібні, з розрахунку, щоб в 1 мл маточного розчину містилась маса речовини, яка потрібна для приготування 1 л середовища. Для виготовлення маточних розчинів кожен компонент зважують і розчиняють окремо у новій порції бідистильованої води, зливають і доводять до потрібного розрахованого об'єму. Розчини вітамінів готують у концентрації 1 мг/мл. Розчини вуглеводів і органічних добавок також окремо зважують, розчиняють, стерилізують і додають безпосередньо до середовища в розрахованій необхідній кількості.

Розчини фітогормонів готують таким чином: цитокініни (кінетин, зеатин, БАП) спочатку розчиняють у невеликій кількості 1н розчину лугу або кислоти, ауксини (ІОК, НОК, 2,4-Д) – у краплі етанолу, підігріваять і додають відповідний об'єм бідистильованої води; гібереліни розчиняють у бідистильованій воді.

Маточні розчини макро-, мікросолей та вуглеводів автоклавують і зберігають за температури 0...+4°C не більше двох місяців. Розчини вітамінів, ферментів, рослинних екстрактів зберігають за температури -20°C. Розчини фітогормонів бажано готувати безпосередньо перед приготуванням живильного середовища.

Матеріали, реактиви, обладнання: ваги аналітичні ($\pm 0,0001$), ваги технічні ($\pm 0,001$), мірні циліндри, колби конічні термостійкі різного об'єму, флакони термостійкі різного об'єму, сэмплери або мірні піпетки різного обсягу, ватно-марлеві пробки, шпателі, магнітні мішалки, кристалічні препарати та реактиви для приготування маточних розчинів, розчинники для фітогормонів (в залежності від того, які будуть готуватися).

Хід роботи

1. Приготування маточних розчинів для живильного середовища Мурасиге і Скуга.

Маточні розчини макро- та мікросолей готують за таблицею 1, зважуючи і розчиняючи окремо кожен наважку в новій порції бідистильованої води. Після приготування розчинів макросолей, їх змішують і доводять об'єм бідистильованою водою до 1 л. Окремо змішують всі мікросолі та доводять об'єм бідистильованою водою до 100 мл.

Розчин хелату заліза готують таким чином: на 100 мл розчину зважують $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 557 мг і окремо $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (натрієва сіль етилендіамін-тетраоцтової кислоти або трилон Б) – 745 мг. Наважки окремо розчиняють у бідистильованій воді, зливають і доводять до кипіння.

Маточний розчин вітамінів готують зважуванням кристалічних вітамінів та розчиненням їх в бідистильованій воді. Готують кожний окремо і потім зливають в одну ємність. Можна використати стерильні розчини лікарських препаратів вітамінів в ампулах.

Маточний розчин вуглеводу готується як 50% розчин сахарози або іншої речовини у бідистильованій воді.

Маточні розчини автоклавують при 0,8 – 1 атм (температура 115 – 120°C) 20 – 25 хв.

2. Приготування розчинів фітогормонів для живильного середовища Мурасиге і Скуга.

Розчини фітогормонів готують безпосередньо перед використанням. Як розчинник застосовують різні рідини, в залежності від фітогормону. 100 мг фітогормону розчиняють у невеликій кількості (0,5–2,0 мл) етанолу (ауксини, гібереліни), 0,5–1н НСl або КОН (цитокініни), підігрівують до повного розчинення (крім абсцизової кислоти і кінетину) і доводять до 100 мл. Концентрація приготованих концентрованих розчинів фітогормонів – 1 мг/мл. Для зручності зберігання та використання розчини вітамінів і фітогормонів (ІОК, зеатин, гіберелін) розливають по 3–5 мл і зберігають у замороженому стані.

3. Приготування робочого живильного середовища Мурасиге і Скуга.

Для приготування робочого стерильного агаризованого середовища МСк в колби, що містять розраховану кількість стерильного розплавленого агару на бідистильованій воді, необхідно асептично додати розраховані кількості стерильних маточних розчинів макро- і мікросолей, Fe-хелату, вітамінів, вуглеводів і фітогормонів, якщо останні входять до складу середовища.

Маточні розчини додаються поступово, після кожного вливання обов'язкове перемішування. Уважно відслідковують процес перемішування та запобігають застиганню.

Якщо середовище призначене для отримання первинного калюсу, то також додаються стерильні розчини відповідних фітогормонів.

Готові теплі середовища асептично розливають по пробіркам (приблизно ½ по висоті) або чашкам Петрі.

**Таблиця 1. Склад середовища Мурасиге і Скуга для культивування рослин
*in vitro***

Компоненти середовища	Концентрація, мг/л (крім фітогормонів)
Маточний розчин I (макросолі)	– на 1 л готового середовища додається 100 мл
NH₄NO₃	1650
KNO₃	1900
CaCl₂·2H₂O	440
NaH₂PO₄	170
MgSO₄ ·7H₂O	370
Маточний розчин II (хелат заліза)	– на 1 л готового середовища додається 5 мл
Na₂EDTA·2H₂O	37,3
FeSO₄·7H₂O	27,8
Маточний розчин III (мікросолі)	– на 1 л готового середовища додається 1 мл
H₃BO₃	6,2
ZnSO₄·7H₂O	8,6
CuSO₄·5H₂O	0,025
CoCl₂·6H₂O	0,025
KI	0,83
Na₂MoO₄·2H₂O	0,25
MnSO₄·4H₂O	22,3
Маточний розчин IV (вітаміни)	– на 1 л готового середовища додається 1 мл
B₁	0,10
B₆	0,5
PP	0,50
Маточний розчин V (вуглеводи)	– на 1 л готового середовища додається 90 мл 50% р-ну
Сахароза	45000
Фітогормони	в кількості, що залежить від мети культивування та фітогормону

Оформлення роботи: навести блок-схему виконання лабораторної роботи. Розрахувати кількості стерильних маточних розчинів, які необхідно взяти для приготування певної кількості середовища МСк. Визначити, яку кількість концентрованих розчинів фітогормонів необхідно додати до готового

середовища МСк, для отримання їх певної робочої концентрації. Результати розрахунків навести у вигляді таблиці:

Обсяг середовища МСк, що необхідно приготувати, мл	
Кінцева концентрація фітогормону в готовому середовищі МСк, мг/л	
Компоненти середовища	Кількості, що необхідні, мл
Маточний розчин I (макросолі)	
Маточний розчин II (хелат заліза)	
Маточний розчин III (мікросолі)	
Маточний розчин IV (вітаміни)	
Маточний розчин V (вуглеводи)	
Водний розчин агару	
Фітогормони	

Зробити висновки.

Контрольні питання

1. Як здійснюється стерилізація приміщень та робочих поверхонь, де проводяться маніпуляції, передбачені у методах культури клітин, тканин та органів рослин?
2. Як провести стерилізацію посуду, що застосовується у методах культури клітин, тканин та органів рослин?
3. Яким чином здійснюють стерилізацію інструментів, що застосовується у методах культури клітин, тканин та органів рослин?
4. Які особливості стерилізації середовищ, що застосовуються у методах культури клітин, тканин та органів рослин?
5. Які групи речовин входять до складу живильних середовищ для культивування рослинних клітин, тканин та органів в умовах *in vitro*?
6. Які макро- та мікросолі входять до складу живильних середовищ для культивування рослинних клітин, тканин та органів в умовах *in vitro*?
7. Які вітаміни є необхідними складовими живильних середовищ для культивування рослинних клітин, тканин та органів в умовах *in vitro*?
8. Які вуглеводи необхідно ввести до складу живильних середовищ для культивування рослинних клітин, тканин та органів в умовах *in vitro*?
9. Які стимулятори росту необхідні для культивування рослинних клітин, тканин та органів в умовах *in vitro*?
10. Які живильних середовища використовуються для культивування рослинних клітин, тканин та органів в умовах *in vitro*?
11. Які особливості підготовки робочих та маточних розчинів для культивування рослинних клітин, тканин та органів в умовах *in vitro*?

Лабораторна робота 2

СТЕРИЛІЗАЦІЯ ЕКСПЛАНТІВ ТА ВИРОЩУВАННЯ АСЕПТИЧНИХ РОСЛИН

Мета роботи: встановити умови стерилізації різних експлантів, отримати навички вирощування первинного калусу та стерильних рослин *in vitro*.

Короткі теоретичні відомості

Основною вимогою при отриманні культур рослинних клітин, тканин та органів є стерилізація рослинних об'єктів, яка забезпечує знешкодження екзогенної мікрофлори, оскільки поверхні рослин дуже часто сильно контаміновані спорами різних грибів, мікроорганізмів, вірусами. Стерилізувальну речовину, її концентрацію і час обробки необхідно підбирати правильно. Це значить, що умови стерилізації рослин та стерилізувальні агенти повинні знешкоджувати патогенну мікрофлору і мати мінімальний шкідливий вплив на рослину. Стерилізувальні розчини повинні легко вимиватись дистильованою водою або розкладатись.

Технологію стерилізації підбирають для кожного експланту індивідуально. Навіть за наявності відпрацьованих методик стерилізації, вони все одно потребують модифікації при використанні іншого об'єкту.

Рослинні об'єкти перед стерилізацією миють у мильному розчині, потім відмивають проточною водою, очищають від зайвих тканин: із коренеплодів і коренів знімають шкірку, із пагонів – кору, із бруньок – покривні луски.

Рослинні експланти стерилізують етиловим спиртом, розчинами речовин, що містять активний хлор (хлораміном, гіпохлоритом кальцію і натрію), сулемою, бромною водою, перекисом водню, нітратом срібла, діацидом, антибіотиками.

Етиловий спирт – часто застосовують для попередньої стерилізації інструментарію та матеріалів протиранням поверхні або зануренням на кілька секунд в спирт в концентрації 70-95%. Рослинні об'єкти спочатку занурюють у спирт на декілька секунд, а потім фламбують їх в полум'ї спиртівки.

Гіпохлорит кальцію (хлорне ванно) – використовується для обробки бруньок, зав'язей, квіток, насіння, пагонів протягом 5–8 хвилин у вигляді 5–7 % розчину.

Гіпохлорит натрію – використовується для обробки будь-яких експлантів протягом 1–20 хвилин у вигляді 0,5–5 % розчину. Ця речовина є клітинною отрутою, тому особливо важливо підбирати час стерилізації і концентрацію експериментально. Залишки гіпохлорита натрію спочатку видаляють 0,01 н HCl, а потім 8 разів промивають стерильною дистильованою водою.

Хлорамін – застосовують у концентрації 1–6 %. Пиляки й молоді зародки обробляють протягом 1–3 хвилин, сухе насіння – 30–60 хвилин, потім промивають стерильною дистильованою водою 2–3 рази. Розчини, що містять активний хлор, використовуються один раз і готують їх безпосередньо перед роботою.

Сулема (двохлориста ртуть) – токсична речовина, тому вимагає особливої обережності як при зберіганні, так і при доборі концентрації для окремих об'єктів. Для стерилізації зародків використовують 0,1 % розчин протягом 1–3 хвилин, для корене- і бульбоплодів – до 10–20 хвилин. Також використовують деякі інші сполуки ртуті: діацид, фамосепт, мертіюлят.

Бром – як 1 % розчин застосовують для стерилізації лише сухого насіння, оскільки він токсичний і пошкоджує зародки.

Фенол – використовують для стерилізації кісточок плодових порід дерев у вигляді 5% розчину.

Антибіотики – застосовують для стерилізації рослинного матеріалу, інфікованого бактеріями (тканини корончастигаллових пухлин). Найчастіше застосовують стрептоміцин і тетраміцин у концентрації 10–80 мг/л, ампіцилін 200–400 мг/л, левоміцитин, каноміцин та інші. Оскільки речовини, що використовуються для стерилізації, негативно впливають не тільки на мікроорганізми, а й на рослинні клітини, вид речовини, її концентрацію, експозицію обробки підбирають експериментально залежно від виду рослини, її фізіологічного стану, місця вирощування, типу експланта та інших факторів.

Простерилізований рослинний матеріал поміщають на відповідні агаризовані середовища: або на середовища для калусогенезу (фрагменти стебла, листків, бульб, корнеплодів) або на середовище для отримання стерильних рослин (насіння). Через 7 діб оцінюють наявність контамінації і розраховують ефективність стерилізації (відсоток стерильних насінин або експлантів за певний час обробки за визначеної концентрації дезінфектанту). Протягом наступних 10-30 діб отримують дані щодо оптимальних умов стерилізації, а також, в залежності від мети роботи дані щодо ефективності отримання стерильних рослин або ефективності калусогенезу.

2.1. Стерилізація насіння і вирощування асептичних рослин

Залежно від ступеня забруднення насіння ділять на три групи:

- I - з незначним зараженням поверхні мікроорганізмами (пшениця, сорго, капуста);
- II - з зараженням лише зовнішньої поверхні насіння (шпинат, редис, помідори, кукурудза, морква);
- III - з наявністю мікроорганізмів на поверхні і в середині насіння (рис, соняшник, соя, сосна).

В залежності від того, до якої групи належить насіння, обирають режим обробки насінневого матеріалу, проте стерилізувальну речовину, її концентрацію, а також час стерилізації необхідно підбирати для кожного виду і сорту дослідним шляхом.

Мета роботи: підібрати оптимальну концентрацію стерилізувального розчину для забезпечення ефективної стерилізації насіння. Отримати стерильне насіння та проростити з нього стерильні рослини.

Матеріали і обладнання: мильний розчин; 70%-й розчин спирту; ємності із стерильною водою; концентрований розчин "Білизни"; склянки для стерилізувальних розчинів; мірні циліндри; насіння; пробірки з середовищем МСк; стерильні чашки Петрі; чашки Петрі зі стерильним фільтрувальним

папером; марля; пінцети; скальпелі; пальник; спирт для стерилізації інструментів.

Хід роботи

1. Приготувати розчини "Білизни" різної концентрації:

- 1 частина препарату і 4 частини води (1:4),
- 1 частина препарату і 3 частини води (1:3),
- 1 частина препарату і 2 частини води (1:2),
- 1 частина препарату і 1 частина води (1:1).

Розчини використовують одноразово відразу ж після приготування!

2. Промити насіння мильним розчином.

3. У марлевій мішечки покласти по 4 насінини.

4. Марлевій мішечки з промитим насінням на 1 хв занурити у склянку з 70% етанолом.

5. Стерильним пінцетом перенести мішечки з насінням у стаканчики з відповідною концентрацією стерилізувального розчину і витримати відповідний час (табл.2). ***Об'єм насіння має займати 1/4 об'єму стерилізувального розчину. Мішечки потрібно перевертати кожні 2 хвилини, щоб розчин гарно змочував насіння.***

6. Простерилізоване насіння промити тричі по 10 хвилин у стерильній дистильованій воді. Для цього стерильним пінцетом перенести мішечки із склянки зі стерилізувальним розчином кожен у окрему стерильну чашку Петрі і додати стерильну дистильовану воду. Витримати 10 хвилин періодично обережно струшуючи. Промивання повторити ще 2 рази, використовуючи кожен раз нову порцію води.

7. Мішечки з насінням стерильним пінцетом перенести кожен у окрему стерильну чашку Петрі з проавтоклавованими паперовими фільтрами, щоб видалити надлишок води.

8. Стерильним пінцетом перенести мішечок до іншої чашки Петрі, розгорнути його двома пінцетами і перенести насіння у чашку Петрі.

9. Стерильним пінцетом перенести насіння на безгормональне живильне середовище по одному у пробірку.

10. Підписати пробірку, зазначивши середовище, вид або сорт рослини і дату посадки.

11. Пробірки з насінням помістити у термостатну кімнату за температури $+25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

12. Через 4-6 діб перевірити мікробіологічну чистоту посіву і схожість насіння.

13. Після проростання насіння пробірки перенести у термостат з освітленням 400 лк і температурою $+25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Таблиця 2. Визначення оптимальної концентрації стерилізувального розчину для забезпечення ефективної стерилізації насіння

№ п/п	Концентрація розчину "Білизни"	Тривалість стерилізації (хв)	Загальна кількість насіння	Кількість інфікованого насіння через 7 днів		Схожість насіння		Ефективність стерилізації (%)
				штук	%	штук	%	
1	1:4	10						
2		15						
3		30						
4	1:3	10						
5		15						
6		30						
7	1:2	10						
8		15						
9		30						
10	1:1	10						
11		15						
12		30						

Оформлення роботи: навести блок-схему виконання лабораторної роботи. Результати представити у вигляді таблиці (табл.2). Визначити відсоток асептичного насіння за різних умов стерилізації. Оцінити ефективність стерилізації і схожість насіння та зробити висновки щодо оптимальних умов проведення стерилізації.

2.2. Стерилізація бульб, коренеплодів і кореневищ та отримання первинного калусу

Однорідність клітинного складу, синхронність поділів, чітка відповідь у стані спокою на дію індукторів поділу роблять бульби і коренеплоди зручною системою для вивчення метаболізму клітини при проходженні нею клітинного циклу і переходу із диференційованого в дедиференційований стан. Тому таку модель використовують для вивчення індукції синтезу ДНК, білка, дослідження ферментативної активності у різних фазах клітинного циклу.

Для отримання експлантів використовують здорові бульби, коренеплоди або кореневища.

Мета роботи: оволодіти методикою стерилізації бульб, коренеплодів і кореневищ, отримати первинний калус.

Матеріали і обладнання: бульби та коренеплоди картоплі, моркви, топінамбуру, селери; мильний розчин; чашки Петрі з середовищем для диференціювання; чашки Петрі пусті стерильні; склянки; пінцети; скальпелі; пробкові свердла; спирт; спиртівка; парафілм або плівка для обгортання чашок Петрі.

Хід роботи

Як рослинний матеріал в даній роботі можна використати бульби картоплі, топінамбура, коренеплоди моркви, кореневища женьшеню тощо.

1. Бульби чи коренеплоди вимити проточною водою.
2. Очистити від шкірки.
3. Вимити у мильному розчині, а потім сполоснути дистильованою водою.
4. Бульбу чи коренеплід на кілька секунд занурити у спирт, дати йому стекти і обпалити у полум'ї спиртівки.
5. Покласти обпалену бульбу чи коренеплід у стерильну чашку Петрі.
6. Притримуючи стерильним пінцетом, скальпелем відрізати частину бульби чи коренеплоду.

7. Стерильним пробковим свердлом вичленити циліндр з тканини.
8. Циліндр тканини порізати скальпелем на диски товщиною 0,5 см, які помістити на середовище для калусогенезу. Два крайні диски відкинути, оскільки їх клітини пошкоджені під час обпалювання.
9. Чашки Петрі підписати і закрити плівкою або парафілом.
10. Чашки з експлантами культивувати у термостаті без освітлення при $+25\pm 1^{\circ}\text{C}$.
11. Через 7-10 днів оцінити ефективність стерилізації. Через 15-30 днів провести візуальне визначення частоти калусоутворення на експлантатах

Оформлення роботи: навести блок-схему виконання лабораторної роботи. Визначити відсоток асептичних експлантів та відсоток експлантів з калусоутворенням. Оцінити ефективність стерилізації. Зробити висновки щодо якості проведення стерилізації та калусоутворення.

2.3. Стерилізація листків та отримання первинного калусу

Культуру ізольованих листків використовують для вивчення механізмів переходу клітин до дедиференціації, вивчення дії різних біологічно активних речовин та з практичною метою – для розмноження деяких видів рослин. Експланти листків більшості видів рослин за умови стерильної культури набувають здатності утворювати калус. Культивування здебільшого здійснюють на середовищах Уайта, Мурасиге і Скуга, Гамборга.

Мета роботи: підібрати оптимальні умови стерилізації листків. Отримати первинний калус.

Матеріали і обладнання: рослини картоплі, тютюну, гербери, тополі, помідорів, які вирощені в теплиці; мильний розчин; 70%-й розчин спирту; ємності із стерильною водою; концентрований розчин "Білизни"; склянки для стерилізувальних розчинів; мірні циліндри; чашки Петрі з середовищем МСк; стерильні чашки Петрі; чашки Петрі зі стерильним фільтрувальним папером;

марля; пінцети; скальпелі; пальник; спирт для стерилізації інструментів;
парафілм або плівка для обгортання чашок Петрі

Хід роботи

1. Приготувати розчини "Білизни" різної концентрації:

- 1 частина препарату і 4 частини води (1:4),
- 1 частина препарату і 3 частини води (1:3),
- 1 частина препарату і 2 частини води (1:2),
- 1 частина препарату і 1 частина води (1:1).

Розчини використовують одноразово відразу ж після приготування!

2. Інтактні листки промити у проточній воді, витримати 1-2 хв у мильному розчині, промити проточною, а потім дистильованою водою.

3. Промиті листки занурити у 70%-й етанол на 10-15 сек.

4. Рослинний матеріал помістити у стерилізувальний розчин з відповідною концентрацією «Білизни» і витримати відповідний час (табл.3).

5. Рослинний матеріал промити тричі по 10 хвилин у стерильній дистильованій воді. Для цього стерильним пінцетом перенести листки із склянки зі стерилізувальним розчином кожен у окрему стерильну чашку Петрі і додати стерильну дистильовану воду. Витримати 10 хвилин періодично обережно струшуючи. Промивання повторити ще 2 рази, використовуючи кожен раз нову порцію води.

6. Для підсушування стерильним пінцетом перенести рослинний матеріал кожен у окрему стерильну чашку Петрі з фільтрувальним папером.

7. Стерильний листок розрізати на експланти по 5-10 мм і помістити на живильне середовище.

8. Чашки підписати і заклеїти парафілмом або плівкою.

9. Чашки з рослинним матеріалом культивувати у термостаті без освітлення при $+25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

10. Через 4-7 днів визначити оптимальні умови стерилізації.

11. Після початку калусоутворення чашки перенести у термостат з освітленням 400 лк і температурою $+25\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Таблиця 3. Визначення оптимальної концентрації стерилізувального розчину для забезпечення ефективної стерилізації експлантів

№ п/п	Концен- трація розчину "Білизни"	Тривалість стерилізації (хв)	Загальна кількість експлантів	Кількість асептичних експлантів через 7 днів		Кількість життєздатних експлантів через 30 днів	
				штук	%	штук	%
1	1:4	10					
2		15					
3		30					
4	1:3	10					
5		15					
6		30					
7	1:2	10					
8		15					
9		30					
10	1:1	10					
11		15					
12		30					

Оформлення роботи: навести блок-схему виконання лабораторної роботи. Результати представити у вигляді таблиці (табл.3). Оцінити ефективність стерилізації і частоту калусоутворення з листків та зробити висновки.

Контрольні питання

1. Які вимоги до стерилізації експлантів?
2. Які речовини використовують для стерилізації експлантів?
3. Які вимоги висувають до стерилізувальних сполук?
4. Як класифікується за мікробною забрудненістю насіння?
5. Як отримати стерильні рослини?

6. Що таке ефективність стерилізації?
7. Для чого використовують в технології культивування рослинних клітин, тканин та органів коренеплоди та бульби?
8. Як отримати первинний калус, використовуючи бульби і коренеплоди?
9. Для чого використовують культуру ізольованих листків?
10. Як отримати первинний калус, використовуючи листки?

Лабораторна робота 3

КУЛЬТИВУВАННЯ ІЗОЛЬОВАНИХ КЛІТИН, ТКАНИН ТА ОРГАНІВ В УМОВАХ IN VITRO

Мета роботи: набути навичок щодо індукції дедиференціації та калусоутворення з використанням як експланту пагонів.

Короткі теоретичні відомості

Культивування клітин, тканин та органів використовуються як для вирішення фундаментальних завдань біотехнології, так і для практичних завдань по створенню або вдосконаленню рослин з цінними властивостями.

Основні етапи культивування *in vitro*:

- ізолювання експланту;
- вирощування експланту на підібраних в залежності від мети живильних середовищах в контрольованих умовах;
- дотримання стерильних умов роботи та періодичне субкультивування.

Калусні культури. Одним з етапів введення клітин рослин в культуру *in vitro* є індукція калусогенезу. В природі калус виникає в місцях травмування рослин і є генетично закріпленою реакцією на травму. Здатність до калусогенезу і різних типів морфогенезу залежить від багатьох чинників: складу середовища, умов вирощування, фізіологічного стану рослин, умов зберігання рослин та умов отримання експланту.

Після утворення первинного калусу його субкультивують, тобто поміщають на поверхню агаризованого живильного середовища. В результаті такого субкультивування отримують стерильну культуру кулусу, яку підтримують тривалий час, періодично пересаджуючи її на свіже живильне середовище.

Калусні культури можна отримувати з різних органів рослин (пагонів, листків, коренів) або з певних типів клітин (пилку, ендосперму). Добір експлантів залежить від тих завдань, які ставляться дослідником.

Існує критичний розмір і форма вихідного експланту, який буде впливати на проліферацію калусу. Дрібніші за розмірами клітини мають більшу вірогідність дати початок калусній тканині, оскільки при ізолюванні пошкоджуються менше, ніж клітини великих розмірів.

Калусні клітини відрізняються між собою за рядом властивостей: колір, консистенція, тощо. Калусні культури можуть бути щільними або пухкими при культивуванні на агаризованому середовищі. Їх консистенція залежить від складу середовища.

Після утворення первинного калусу його відділяють в асептичних умовах і поміщають на свіже живильне середовище. В результаті отримують культуру калусної тканини, яку підтримують протягом тривалого часу, розділяючи на фрагменти і переносячи на свіже живильне середовище. Цей процес називається субкультивуванням. Його здійснюють на середовищах такого ж складу, як і для дедиференціації та індукції калусогенезу.

В процесі культивування в калусній культурі можуть відбутись процеси вторинної диференціації, що дозволяє завдяки тотіпотентності рослинної клітини регенерувати з неї рослину, в тому числі зі зміненими властивостями.

Матеріали і обладнання: молоді пагони рослин; чашки Петрі з середовищем для диференціювання; чашки Петрі пусті стерильні; склянки; пінцети; скальпелі; спирт; спиртівка; парафілм або плівка для обгортання чашок Петрі.

Хід роботи

1. Пагони рослини витримати в мильному розчині 20 хв, потім промити проточною водою 8 разів, нарізати на сегменти довжиною 3-5 мм. Нарізані пагони загорнути в марлю.
2. Занурити пагони, загорнуті в марлю, у 70 %-й етанол на 40 секунд.
3. Вийняти та промити стерильною дистильованою водою.
4. Занурити у 50 %-й розчин препарату «Брадофен» на 12 хвилин або використати інший дезінфектант.

5. Промити стерильною дистильованою водою – 3 рази по 5 хвилин.
6. Стерильний рослинний матеріал покласти в стерильну чашку Петрі.
7. Від рослинного матеріалу за допомогою скальпеля відрізати сегмент розміром 0,5 х 0,5 см і помістити його на поверхню живильного середовища, трохи притиснувши в агар.
8. Пробірки з експлантами розмістити в культуральній кімнаті за температури 25-28 °С, відносної вологості повітря 60-70 % і 16-годинного фотоперіоду.
9. Провести дослідження експлантів через 2 тижні. Вибракувати інфіковані експланти. Виявити ознаки калусогенезу. Дослідження проводити через 7-10 днів.

Оформлення роботи: навести блок-схему виконання лабораторної роботи. Визначити відсоток асептичних експлантів та відсоток експлантів з калусоутворенням. Оцінити ефективність стерилізації. Зробити висновки щодо якості проведення стерилізації та калусоутворення.

Контрольні питання

1. У чому полягає суть методу культури клітин, тканин та органів рослин?
2. Які загальні принципи методу культури клітин, тканин та органів рослин?
3. Які напрями практичного застосування методу культури тканин рослин?
4. Які основні етапи культивування *in vitro*?
5. Що таке субкультивування?
6. Що таке експлант?
7. Що таке диференціація?
8. Що таке дедиференціація?
9. Що таке калюс? Наведіть його основні характеристики.
10. В результаті чого змінюється метаболізм клітин експланта?

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ПРОТОКОЛІВ

Кожна лабораторна робота оформлюється студентами у вигляді протоколу. Протоколи і блок-схеми досліду оформлюють на білих аркушах паперу формату А4 або аркушах паперу в клітинку формату А4 з обох сторін. На початку заняття студенти надають викладачеві на перевірку протокол, який повинен містити номер та назву лабораторної роботи, мету, матеріали і обладнання та блок-схему досліду. В блок-схемі вказується назва і об'єм розчинів, що вносяться, вид лабораторного посуду, отримане розведення, умови проведення. Вздовж стрілок вказують об'єм розчинів, які переносять, зазначають хімічний посуд, що використовується, зразки, які потрібно віддати на зберігання або знезараження. Під час роботи блок-схема прикріплюється на робоче місце на лабораторному столі.

У ході виконання експерименту студент безпосередньо у блок-схемі має відзначати всі особливості і відхилення від стандартної методики і причини змін. Допуск до роботи студент отримує після перевірки викладачем наявності і правильності блок-схеми досліду та теоретичних знань, що стосуються даної роботи. За результатами виконання кожного етапу роботи студент допускається (або не допускається) викладачем до виконання наступного етапу робіт.

На основі отриманих результатів студент робить висновки і надає рекомендації щодо подальшої роботи. Аркуші протоколу в межах однієї лабораторної роботи нумеруються, скріплюються степлером і збираються у файли та папку-швидкозшивач.

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Карпов О.В., Демидов С.В., Кир'яченко С.С. Клітинна та генна інженерія: Підручник - К.:Фітосоціоцентр, 2010. – 208 с.
2. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
3. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Левенко Б.О. Основи біотехнології рослин. – К.: 2000. – 248 с.
4. Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А. Біотехнологія рослин: підручник. Київ : ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 520 с.
5. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. М., Мир, 2002. – 589 с.
6. Задерей Н. С. Біотехнологія рослин : навч.-метод. посібн. / Н. С. Задерей. – Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2015. – 84 с.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Ключащенко А.А., Пінчук А.П. Практикум з біотехнології рослин – Навчальний посібник – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2005. – 136 с.
2. Задерей Н. С. Біотехнологія рослин : навч.-метод. посібн. / Н. С. Задерей. – Одеса: Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2015. – 84 с.