

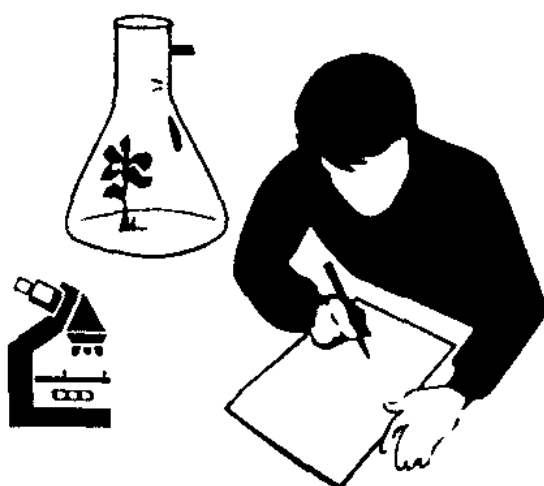
**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
УМАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ САДІВНИЦТВА**

Кафедра генетики, селекції рослин та біотехнології

Л. О. Рябовол, Я. С. Рябовол

КАЛЮСНА КУЛЬТУРА ТА КУЛЬТУРА КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ

Методичні рекомендації для проведення лабораторно занять аспірантам з дисципліни «Біотехнологія в селекції і насінництві сільськогосподарських культур» зі спеціальності 201 «Агрономія» освітнього рівня доктор філософії



Умань – 2020

УДК 631.527+[634.1+635]:631.527

Рецензенти: доктор сільськогосподарських наук, професор С. П. Полторецький;
доктор сільськогосподарських наук, професор О. І. Улянич
(Уманський національний університет садівництва)

Л. О. Рябовол, Я. С. Рябовол

КАЛЮСНА КУЛЬТУРА ТА КУЛЬТУРА КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ

Методичні рекомендації для проведення лабораторно заняття аспірантам з дисципліни «Біотехнологія в селекції і насінництві сільськогосподарських культур» зі спеціальності 201 «Агрономія» освітнього рівня доктор філософії. Умань: УНУС, 2020. 18 с.

Рекомендовано до видання: кафедрою генетики, селекції рослин та біотехнології (протокол засідання кафедри № 17 від 26 лютого 2020 року) та методичною комісією факультету агрономії Уманського НУС (протокол засідання № 6 від 12 березня 2020 року)

ЗМІСТ

1. КАЛЮСНА КУЛЬТУРА

- 1.1. Характеристика калюсу, калюсної культури
- 1.2. Живильні середовища для отримання калюсу
- 1.3. Підбір експланту та формування первинного калюсу
- 1.4. Порядок роботи при отриманні калюсу з експланту
- 1.5. Порядок роботи при отриманні калюсної культури

2. ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА РОЗВИТОК КАЛЮСНОЇ БІОМАСИ

- 2.1. Типи калюсних тканин
- 2.2. Вплив ауксинів та цитокінінів на ріст та розвиток калюсної культури
(статистична обробка даних)
- 2.3. Послідовність роботи при вивченні впливу екзогенних регуляторів росту на ріст та розвиток калюсної тканини

3. КУЛЬТУРА КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ

- 3.1. Характеристика суспензійної культури
- 3.2. Ростовий цикл клітинної суспензії
- 3.3. Послідовність роботи при отриманні суспензійної культури

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЮСНА КУЛЬТУРА

Калюс (калус) – тканина, що виникла шляхом неорганізованої проліферації клітин органів рослин, що висаджуються на живильний субстрат.

Калюсна культура формується, як відповідь на поранення біологічного матеріалу в результаті якого паренхімні клітини переходять до активного поділу і формують недиференційовану тканину (калюсну тканину).

Культура калюсних тканин використовується для вирішення теоретичних питань фізіології і біохімії клітин та вивчення їх біосинтетичних потенцій. Калюсна культура є вихідним матеріалом для отримання суспензійної культури, ізольованих протопластів, отримання сполук вторинного метаболізму, для ведення клітинної селекції з метою отримання нових рослинних форм.

1.1. Характеристика калюсу, калюсної культури

Калюсна тканина має вигляд аморфної маси тонкостінних паренхімних клітин без визначеної анатомічної структури. Клір біомаси може бути білим, жовтим, коричневим, зеленуватим, червонуватим, що залежить від виду рослин, типу експланту, умов культивування, складу живильного середовища. Консистенція – щільна, розпушена клітина калюсу які мають велике ядро, високий вміст ДНК і РНК. Клітини деяких біовидів здатні накопичувати крохмаль і речовини вторинного метаболізму.

1.2. Живильні середовища для отримання калюсу

Для отримання калюсу рослин в культурі *in vitro* найчастіше використовують середовища Уайта, Мурасіге–Скуга. До основного складу вносять також вітаміни, регулятори росту, 20–40 г/л сахарози або глюкози.

Успіх калюсоутворення значно залежить від правильного підбору рiстактивуючих речовин, що iндукують клітинний поділ.

Для індукції калюсних тканин експланти поміщають на середовища з високими концентраціями ауксинів. Серед ауксинів найдійовішими є 2,4-дихлорфеноксоцтова (2,4-Д) та індолілоцтова (ІОК) кислоти. (табл.)

Для формування з експланту первинного калюсу необхідно вводити до складу субстрату в 10 разів вищі концентрації речовин ауксинової природи, ніж до окладу середовищ з розмноження калюсної тканини і отримання вторинного чи третинного калюсу.

В окремих випадках для індукції калюсогенезу до живильного середовища необхідно вносити складніші компоненти такі, як гідролізатор казеїну (200–500 мг/л), дріжджовий екстракт (50–100 мг/л).

1.3. Підбір експланту і формування первинного калюсу

Для отримання калюсної тканини *in vitro* простерилізований рослинний матеріал надрізають в декількох місцях і переносять на живильне середовище. Розміщують експлант на субстраті таким чином, щоб ушкоджені ділянки контактували з компонентами агаризованого середовища. Калюс можна отримати із будь-яких органів і тканин рослини (листок, живці, стебло, корінці, зародки тощо).

Формування калюсу проходить в місцях первинних або вторинних меристем, а також із паренхіми, що межує з цими меристемами.

Інтенсивність формування калюсних тканин залежить від розмірів експланту. Для більшості біовидів первинний експлант повинен мати розмір 5–10 мм³ і вагу 20–50 мг. Чим більший експлант тим складніший і різноманітніший набір клітин, тим складніший процес формування калюсної маси.

Окрім того, більшість рослин має властивість фізіологічної полярності (фізіологічна нерівноцінність протилежних полюсів певної клітини, органа або цілої рослини). У зв'язку з цим калюс інтенсивніше утворюється на боці експланту, який на материнській рослині обернений до кореня, тому при отриманні калюсу на фрагментах стебла, шматочках кореня, черешка експланти

поміщають на агар апікальною стороною. У разі ізолювання експлантів із бульб (топінамбур, картопля) полярність не має суттєвого значення. Для повного виключення впливу полярності, біоматеріал можна поміщати на середовище тангентально. При невеликих розмірах експлантів дотримання умов полярності стає не важливим.

Умови культивування експланту

Для отримання калюсу експлант поміщають на живильне середовище і культивують, переважно, в темнових термостатах за температури 25–26°C і відносній вологості 75%.

Найкращим лабораторним посудом для проведення даного технологічного процесу є чашки Петрі (різного діаметру) або широкогорлі колби Ерленмейера на 100–250 мл.

1.4. Порядок роботи при отриманні первинного калюсу з експланту стерильних рослин (роботу проводять у ламінар-боксі)

1. Стерильним пінцетом витягти рослину із пробірки і помістити її на стерильне скло (чашку Петрі).
2. Підтримуючи рослину пінцетом, скальпелем розрізати (стебло, міжвузля, листочки, живці) її на окремі експланти (5–10 мм).
3. На експланті зробити додаткові надсічки.
4. Біоматеріал помістити у чашки Петрі (колби) з середовищем для калюсогенезу.
5. Герметично закрити посуд. Підписати.
6. Помістили рослинний матеріал для культивування в термостат у контрольовані умови температурного режиму (25–26°C) і вологості (75%).
7. Через 20–30 діб провести візуальне визначення частоти калюсоутворення на експлантах.
8. Дані технологічного процесу вести в таблицю:

Таблиця. Оцінка індукції калюсогенезу рослинного матеріалу

№ з/п	Тип експланту	Загальна кількість експлантів	Кількість експлантів, що утворило калюс		Індекс росту
			шт.	%	

Якщо матеріал для технологічного процесу отримання калюсу береться з природних умов, перед введенням у культуру він стерилізується.

Після утворення калюсу його відділяють від експланту розділяють на невеликі частини і поміщають на поверхню оновленого живильного середовища, з метою пасажування та отримання необхідної кількості калюсної тканини.

Розмір транспланту за культивування на агаризованому середовищі варіює від 60 до 100 мг маси тканини на 30–40 мл живильного субстрату.

1.5. Порядок роботи при отриманні калюсної культури

1. Експлант з первинним калюсом перенести у стерильну чашку Петрі.
2. Притримуючи експлант пінцетом, скальпелем зрізати калюс.
3. Скальпелем поділити калюсну тканину на рівні невеликі фрагменти, які перенести пінцетом на свіже живильне середовище.
4. Герметично закрити посуд. Підписати.
5. Біоматеріал помістити в термостат у контрольовані умови вирощування (25–26°C, вологість – 75%).
6. З метою прискорення інтенсивності наростання калюсної маси кожних 4–6 тижнів оновлювати живильне середовище. Від наростаючої калюсної тканини відділяти залишки старого агаризованого середовища, калюс розділяти на рівні фрагменти і переносити на оновлений субстрат.
7. Постійно визначати інтенсивність росту, приріст і час подвоєння популяції калюсної культури.

Іноді в технологічному процесі трапляється ризогенез калюсної маси. Такі варіанти досліду бракуються, адже калюсні клітини після ризогенезу втрачають морфогенетичні властивості.

2. ВПЛИВ РЕГУЛЯТОРІВ РОСТУ НА РОЗВИТОК КАЛЮСНОЇ БІОМАСИ

2. Типи калюсних тканин

Калюсна тканина, яку отримують в ізолюваній культурі має індивідуальні морфологічні, фенотипічні, морфогенетичні, біосентетичні особливості. Вони залежать від біовиду, походження експланту, умов вирощування, складу живильного середовища.

Органогенні властивості калюсу мають прямопропорційну залежність, що до його консистенції.

Найкращі органогенні характеристики має розпушений або напівщільний калюс, клітини якого великі, вакуолізовані, мають високий вміст білка, легко розпадаються і здатні до швидкого поділу.

Калюс середньої щільності, з добре вираженими меристематичними осередками, має нижчу регенераційну здатність. Проте органогенні характеристики клітин і час подвоєння їх популяції залишається на високому рівні.

Щільний калюс з зонами редукованого камбію і судин має найнижчі регенераційні характеристики. Клітини – дрібні. Його важко розділити на окремі частини.

Регулятори росту, що використовуються для отримання калюсної культури

Клас РРР	Назва	Скорочено	Концентрація, мг/л	Приготування вихідного розчину
Ауксини	2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота	2,4-Д	1-2	Розчиняються в 1 N розчині NaOH
	індоліл-3-оцтова кислота	ІОК	1-10	
	α-нафтилоцтова кислота	НОК	1-10	
Цитокініни	6-бензиламінопурин	6-БАП	0,1-0,5	Розчиняються в 1 N розчині NaOH або в спирті
	6-фурфурилоамінопурин (кінетин)	К	0,1-0,5	

Консистенція калюсної тканини залежить від вмісту в живильному середовищі ауксинів, особливо 2,4-дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д). Чим

вищий вміст цієї речовини в живильному субстраті, тим пухкіша калюсна тканина.

Встановлено, що за тривалого культивування щільні калюси можуть дати початок розпушеним тканинам, але не навпаки.

2.2. Вплив ауксинів та цитокінінів на розвиток калюсної культури (статистичний аналіз даних)

Для визначення сили росту калюсних тканин першочергово визначають збільшення сирової маси: $W_t - W_o$. Результати можуть бути виражені відносно вихідної маси:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_o}{W_o}$$

Це дозволяє встановити у скільки разів збільшилася маса протягом дослідження. Величину приросту маси можна визначити у відсотках:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_o}{W_o} \cdot 100\%$$

Якщо тривалість росту в різних варіантах неоднакова в формулу вводиться фактор часу:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_o}{W_o} \cdot \frac{1}{t}$$

Таким же чином можна проводити облік результатів за масою сухої речовини.

Більше інформації про характер росту отримують при визначенні кількості клітин на одиницю маси калюсу. Підрахунок клітин дозволяє визначити збільшення маси тканини, що відбувається за рахунок поділу клітин чи їх росту. Це дає можливість розрахувати і середню вагу клітин.

Кількість клітин визначають за методом розробленим Брауном, який полягає у мацерації і послідовному прямому підрахунку клітин краплі суспензії у лічильній камері під мікроскопом.

Використовують кілька методів мацерації. Більшість з них базується на обробці тканин сильними кислотами, які гідролізують середні пластинки, що з'єднують клітини.

Клітини підраховують у камері Фукс-Розенталя.

2.3. Послідовність роботи при вивченні впливу регуляторів росту на ріст та розвиток калюсної тканини

Робота складається з кількох етапів:

I етап

1. Приготувати 1 л середовища Мурасіге–Скуга з додаванням 0,2 мг/л кінетину.
2. Розділити середовище на 10 частин по 100 мл і розлити в пронумеровані стаканчики.
3. До середовища у кожний стаканчик додати відповідну кількість 2,4-Д від 0,3 до 3 мг/л (0,3; 0,6; 0,9.....3мг/л)
4. Середовище розлити по пробірках (5 мл), закрити фольгою і проавтоклавувати.

II етап

1. У боксі 4–6-ти тижневу калюсну тканину розділити на рівні фрагменти, які перенести на середовище в пробірки.
20–30 калюсів залишити і окремо зважити для встановлення середньої маси експланту.
2. Пробірки з калюсною масою культивувати у термостаті за температури 24–26 °С.
3. Через 6–7 тижнів візуально визначити тип калюсу.
4. З кожної пробірки калюс вийняти, відокремити від нього залишки агаризованого живильного субстрату і зважити.
5. Відносний приріст маси калюсної тканини визначити за формулою:

$$\Delta W = \frac{W_t - W_o}{W_o} \cdot 100\%$$

де W – відносний приріст маси;
 W_o – початкова маса калюсу;
 W_t – кінцева маса калюсу.

6. Результати записати в таблицю та побудувати діаграму.

Таблиця. Вплив ауксину на прорість калюсної тканини

№ з/п	Вміст ауксину в середовищі, мг/л	Середня вага калюсу, мг		Відносний приріст маси калюсу, %	Тип калюсу
		початкова	кінцева		

III етап

1. Приготувати 100 мл 7,5 %-го розчину хромового ангідриду.
2. У 30 пробірок налити по 2 мл розчину хромової кислоти.
3. Із кожного варіанта досліду приготувати по 3 наважки калюсної тканини (масою 0,1 г кожна), які помістити у пробірки з мацеруючим розчином.
4. Пробірки помістити у термостат за температури 25°C ≈ 24 год. (час інкубації для кожної культури підбирають експериментально).
5. Перед підрахунком ретельно, але акуратно, струсити вміст пробірки, щоб вийшла рівномірна суспензія клітин.
6. Піпеткою з широким кінчиком швидко нанести по краплі суспензії клітин на кожну сітку лічильної камери Фукс-Розенталя, закрити її склом і притерти до бічних граней сіток до появи кілець Ньютона.
7. Провести підрахунок клітин у чотирьох великих квадратах, розташованих за діагоналлю сітки лічильної камери.
8. Промити камеру, заповнити знову і провести повторний підрахунок. Операцію повторити тричі для кожної пробірки.
9. Кількість клітин в 1 г калюсної тканини обчислюють за формулою:

$$W = \frac{n \cdot 1000 \cdot v}{0,2d},$$

де W – кількість клітин в 1 г калюсної тканини;

n – кількість клітин у одному великому квадраті;

0,2 – глибина камери Фукс-Розенталя;

d – наважка калюсної тканини, яку взяти для підрахунку клітин (г);

V – кінцевий об'єм суспензії клітин.

10. Побудувати графік залежності кількості клітин в 1 г калюсної тканини від співвідношення кінетину: 2,4-Д.

На основі проведених досліджень зробити висновок про вплив (концентрації, співвідношення) регуляторів росту на наростання калусної біомаси в ізольованій культурі.

Загальна схема утворення калусної культури *in vitro*



3. КУЛЬТУРА КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ

3.1. Характеристика суспензійної культури

Клітинна суспензія – це окремі клітини або клітинні агрегати, що вирощуються в рідкому живильному середовищі в умовах постійного переміщення та аерації.

Вирощування клітин у рідкому середовищі має низку переваг перед вирощуванням калусних тканин поверхневим методом. Так легше впливати на метаболізм і ріст клітинних популяцій екзогенними чинниками; вони зручніші для біохімічних і молекулярно-біологічних експериментів.

Основним способом отримання суспензійних культур є занурення шматочка недиференційованого калусу в рідке середовище, яке переміщується. Іноді використовують фрагменти органів, що поміщають у рідке середовище, де відбувається диференціація та формування калусу, який згодом

розпадається на окремі клітини (такий спосіб потребує більших затрат часу).

Для отримання клітинної суспензії важливе значення має тип вихідної калюсної тканини. Оптимальним є розпущений тип калюсу, який легко піддається фрагментації за перенесення його в рідке живильне середовище.

Розпушеність калюсу досягається відповідним підбором компонентів живильного середовища, на якому розвивається з експланту калюсна маса. Зокрема, до субстрату вводять вищі концентрації регуляторів росту ауксинової природи (найчастіше 2,4-дихлорфеноксиноцтової кислоти) і зменшують або виключають із середовища цитокініни.

Живильний субстрат необхідно також звільнити і від іонів Ca^{2+} .

Вирощують клітинні суспензії в основному на таких же живильних середовищах, що і калюсні культури. Але є низка середовищ, призначених безпосередньо для вирощування суспензійних культур.

Для ініціації суспензійної культури потрібно 2–3 г калюсної тканини на 60–100 мл рідкого живильного середовища. Суспензію помішають на шейкер, який має швидкість перемішування 100–120 об/хв.

Первинну суспензію фільтрують через 1–2 шари марлі, нейлонові або металеві ситечка, щоб позбутися великих щільних грудок калюсної тканини і залишків експлантів. Фільтрування рекомендується і в декількох наступних субкультивуваннях до набуття клітинною суспензією бажаних ознак.

Зазвичай, тривалість пасажування за культивування клітинних суспензій становить 14–18 діб. Густина популяції за цей проміжок часу сягає 10^6 – $5 \cdot 10^6$ клітин на мл.

3.2. Ростовий цикл клітинної суспензії

Ріст популяції клітин у циклі періодичного вирощування характеризується S-подібною кривою. У процесі субкультивування клітин послідовно проходять наступні фази:

- 1) латентна або лаг-фаза; 2) експотенціальна (логарифмічна) фаза; 3) лінійна

фаза; 4) (уповільнення росту); 5) стаціонарна фаза; 6) фаза деградації (відмирання клітин).

Ріст суспензійних культур можна оцінити за одним або кількома параметрами:

- 1). об'єм осаджених клітин (ООК);
- 2). щільність клітинної популяції;
- 3). маса сирої і сухої речовини;
- 4). вміст білка;
- 5). життєздатність клітин.

Для глибинного культивування рослинних клітин використовують відкриті або закриті системи в періодичному або проточному режимах культивування.



3.3. Послідовність роботи при отриманні суспензійної культури

1. Перенести шматочки калюсної тканини в стерильну чашку Петрі.
2. Стерильним пінцетом подрібнити калюс на фрагменти.
3. Фрагмент калюсної тканини помістити в колби Ерленмейера з рідким живильним середовищем (2–3 г/100 мл).
4. Колби з рослинним матеріалом культивувати у темних умовах на

шейкері за 120 об/хв.

5. Через 10–14 діб клітинну суспензію профільтрувати через нейлон.

6. Фільтрат розділити на три порції, які розлити у стерильні колби Ерленмейера.

7. До клітинної суспензії додати свіже середовище, довести об'єм до 100 мл.

8. Колби помістити на шейкер.

9. Субкультивування клітинної суспензії проводити кожні 14–18 днів. Для цього у ламінар-боксі із колби з клітинною суспензією відібрати 50–60 мл (біля 2/3 об'єму) середовища з клітинами і замінити свіжим середовищем того ж складу. Відібране середовище перенести у стерильну колбу Ерленмейера і свіжим середовищем довести об'єм до 100 мл.

Суспензійні культури рослинних клітин широко використовують в клітинній селекції для отримання соматичних ембріодів, ізольованих протопластів, сполук вторинного синтезу (алкалоїдів, терпеноїдів, глікозидів, полісахаридів, ефірних олій, анти канцерогенів тощо).

Матеріали та обладнання: обладнання лабораторії біотехнології, асептичні рослини (культура, якою займається аспірант), чашки Петрі з калюсом, чашки Петрі зі стерильним середовищем для калюсу, стерильні чашки Петрі, скальпелі, пінцети, спирт, спиртівка, маточні розчини макро-, мікроелементів MS, Fe-хелат, вітаміни, 2,4-Д, кінетин, мезоінозит, сахароза, агар-агар, 1 N KOH, посуд (пробірки, колби Ерленмейера), мірний посуд, хромовий ангідрид, камера Фукс-Розенталя, мікроскоп, фольга, шейкер, стерильні лійки з нейлоновими фільтрами.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Биотехнология растений: культура клеток. од ред. Бутенко Р. Г. Москва: Агропромиздат, 1989. 284 с.
2. *Бутенко Р. .* Культура клеток растений и биотехнология. Москва: Наука, 1986. 236 с.
3. *Бутенко Р. Г., Катаева Н. В.* Клональное микроразмножение растений. Москва: Наука, 1983. 254 с.
4. *Глазко В. И.* Генетически модифицированные организмы: от бактерии до человека. Київ: КВИЦ, 2002. 210 с.
5. *Глазко В. И.* Агрехимический аспект биосферы: проблема генетического разнообразия. Київ: Норапринт, 1998. 209 с.
6. *Глеба Ю. Ю., Сытник К. М.* Клеточная инженерия растений. Київ: Наук, думка, 1984. 159 с.
7. *Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е.* Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Київ: Наукова думка, 1980. 487 с.
8. *Кунах В. А.* Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого–біохімічні основи. Київ: Логос, 2005. 730 с.
9. *Кучук Н. В.* Генетическая инженерия высших растений. Київ: Наук, думка, 1997. 152 с.
10. *Левенко Б. А.* Трансгенные растения. Київ, 2000. 305 с.
11. *Мельничук М. Д., Новак Т. В., Кунах В. А.* Біотехнологія рослин. Київ: ПоліграфКонсалтинг, 2003. 520 с.
12. *Муромцев Г. С., Бутенко Р. Г., Тихоненко Т. И., Прокофьева М. И.* Основы сельскохозяйственной биотехнологии. Москва: Наука, 1990. 257 с.
13. *Пузік В. К.* Культура ізольованих органів тканин і клітин у біотехнології рослин. харків, 1997. 100 с.
14. *Рудишин С. Д.* Основы біотехнології рослин. Вінниця, 1998. 224 с.

Навчальне видання

Рябовол Людмила Олегівна
Рябовол Ярослав Сергійович

КАЛЮСНА КУЛЬТУРА ТА КУЛЬТУРА КЛІТИННИХ СУСПЕНЗІЙ

Методичні рекомендації для проведення лабораторно занять аспірантам з дисципліни «Біотехнологія в селекції і насінництві сільськогосподарських культур» зі спеціальності 201 «Агрономія» освітнього рівня доктор філософії.

Відповідальний за випуск Я. С. Рябовол

Підписано до друку 12.03.2020 р. формат 60x90/20
Обсяг 0,8 умов. друк. арк. Наклад 100 прим.
Замовлення № 18.

Редакційно-видавничий центр Уманський НУС.
Свідоцтво КВ № 17791-6641 ПР від 17.03.2011р.
20305, м. Умань, вул. Інституцька ,1
тел. 8(04744) 4-69-7

