



Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Башкирский государственный аграрный университет»

Кафедра лесоводства и
ландшафтного дизайна

Б1.О.34 Меристемное размножение растений

Методические указания к лабораторным работам

Направление подготовки
35.03.01 Лесное дело

Профиль подготовки
Лесное хозяйство, охотничий сервис и туризм

Квалификация (степень) выпускника
бакалавр

УДК 630
ББК 43
М 54

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета агротехнологий и лесного хозяйства для студентов очной и заочной формы обучения по направлению подготовки 35.03.01 «Лесное дело» (протокол № 6 от «21» марта 2024 г.)

Составитель: к.с.-х.н., доц. Ханова Э.Р., асс. Рафикова Д.А.

Рецензент: к.с.-х.н. доцент, зав. кафедрой землеустройства Галеев Э.И.

Ответственный за выпуск: заведующий кафедрой лесоводства и ландшафтного дизайна доцент Габитова А.А.

ВВЕДЕНИЕ

В методическом указании предусматривается изучение вопросов меристемного размножения растений. Современные биотехнологии предлагают принципиально новые пути для формирования нового и ценного для жизнедеятельности человека генетического разнообразия растений посредством отбора форм и клонов особей с искомыми признаками.

Использование метода меристемного размножения растений в лесном хозяйстве позволит значительно повысить продуктивность и устойчивость лесов. Возрастающая роль биотехнологий в ускорении научнотехнического прогресса требует, чтобы основами данной дисциплины овладели специалисты лесного хозяйства. Поскольку применение селекционно-генетических методов позволяет наиболее эффективно решать вопросы повышения продуктивности и жизнестойкости, в том числе и лесных насаждений, то знание теоретических основ и методов получения рекомбинантных ДНК и получение на их основе новых растительных организмов позволят будущим специалистам применять их на практике для повышения продуктивности и биологической устойчивости искусственно создаваемых насаждений.

Тема 1. ОРГАНИЗАЦИЯ И ОБОРУДОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ, ПРАВИЛА РАБОТЫ В НЕЙ

1.1. Цель занятия - ознакомить обучающихся с организацией и оборудованием биотехнологической лаборатории.

1.2. Материалы и оборудование. Химические стаканы (50, 100, 250 мл), штативы с пробирками, инструменты (пинцеты, скальпели, ножницы, препарировальные иглы), хромпик, гипохлорит натрия.

1.3. Программа работы.

1. Ознакомиться с устройством биотехнологической лаборатории.
2. Под руководством преподавателя освоить принципы работы автоклава, сушильного шкафа, дистиллятора и другого вспомогательного оборудования.

3. Посуду замочить в растворе гипохлорита натрия, тщательно отмыть в растворах детергентов (стиральный порошок), промыть 8-10 раз проточной водой, поместить на 4-6 часов в хромпик (смесь серной кислоты с бихроматом калия), промыть теплой водой, затем дважды дистиллированной.

4. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 2 часа при температуре 100-130°C.

5. Сухую посуду для хранения закрыть ватными пробками, фольгой, целлофаном.

1.4. Контрольные вопросы

1. Как устроена биотехнологическая лаборатория?
2. Как происходит стерилизация помещения лаборатории?

Тема 2. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ МИКРОКЛОНАЛЬНОГО РАЗМНОЖЕНИЯ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

2.1 Цель занятия - ознакомить обучающихся с составом питательных сред для культивирования древесных растений и развить практические навыки по их приготовлению.

2.2 Материалы и оборудование. Электроплитка, весы аналитические до 500 г, весы торсионные до 100 мг, магнитные мешалки, дозатор, рН-метр, пинцеты, ножницы, химические стаканы, колбы, мерные цилиндры объемом от 5 мл до 1 л, пробирки объемом от 1 до 10 мл, макро- и микросоли, фитогормоны (ИУК и 6-БАП), витамины.

2.3 Программа работы.

1. Подготовка посуды для приготовления маточных растворов. Используемую для приготовления маточных растворов посуду нужно тщательно отмыть в растворе-детергенте – стиральном порошке, затем промыть 8–10 раз проточной водой, затем дважды промыть дистиллированной

ной водой. Чистую посуду поместить в сушильный шкаф на 1 ч при температуре 120°C. Сухую посуду для хранения закрыть ватными пробками, фольгой, целлофаном.

2. Приготовление и хранение маточных растворов.

2.1. Приготовление маточного раствора макросолей (Приложение 1, 2). Каждую соль из состава маточного раствора макросоли (KNO_3 , NH_4NO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) по прописи Мурасиге-Скуга растворить в отдельном стаканчике при нагревании, затем слить в стеклянную колбу и добавить дистиллированную воду до необходимого объема (для предотвращения выпадения осадка в охлажденную смесь маточного раствора макросоли последним компонентом добавляют раствор солей магния). Для приготовления 1 л питательной среды Мурасиге-Скуга необходимо взять 50 мл маточного раствора макросоли.

2.2. Приготовление маточного раствора микросолей. Каждую соль из состава маточного раствора микросоли ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KJ и $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) по прописи Мурасиге-Скуга (Приложение 2) растворить в отдельном стаканчике при нагревании, затем слить в стеклянную колбу и добавить дистиллированную воду до необходимого объема (для предотвращения выпадения осадка в охлажденную смесь маточного раствора микросоли последним компонентом добавляют раствор солей молибдена). Для приготовления 1 л питательной среды Мурасиге-Скуга необходимо взять 1 мл маточного раствора микросоли.

2.3. Приготовление маточного раствора хелата железа. Для приготовления хелата железа необходимо растворить отдельно $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2 \cdot \text{ЭДТА}$ в 450 мл дистиллированной воды, подогреть и постоянно помешивая раствор, затем их смешать, установить кислотность среды на уровне $\text{pH} = 5,5$ и добавить дистиллированной воды до объема 1 л. Для приготовления 1 л питательной среды Мурасиге-Скуга необходимо взять отдельно по 5 мл маточных растворов $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и $\text{Na}_2 \cdot \text{ЭДТА}$.

2.4. Приготовление маточных растворов витаминов. Взять десятикратные навески каждого витамина по прописи Мурасиге-Скуга (тиамин, пиридоксин, глицин, инозитол и никотиновая кислота) и растворить отдельно в 10 мл дистиллированной воды. В 1 мл каждого из приготовленных растворов будет содержаться порция витамина, необходимая для приготовления 1 л питательной среды Мурасиге-Скуга.

2.5. Приготовление маточного раствора фитогормона ауксина ИУК (индолилуксусной кислоты). Взвесить 100 мг ИУК и растворить в небольшом количестве спирта (1,0–2,0 мл). Затем полученную смесь подогреть до полного растворения и довести до объема 100 мл (1 мл раствора содержит 1 мг ИУК).

2.6. Приготовление маточного раствора фитогормона цитокинина 6-БАП (6-бензиламинопурин). Взвесить 100 мг гормона 6-БАП и растворить в небольшом количестве 1 н. раствора HCl (1,0–2,0 мл). Затем полученную смесь подогреть до полного растворения и довести до объема 100 мл (1 мл раствора содержит 1 мг 6-БАП).

2.7. Приготовленные маточные растворы макросоли, микросоли и хелата железа хранят в холодильнике в сосудах с притертыми пробками при температуре 0–4°C, маточные растворы витаминов хранят в холодильнике при температуре $t = -20^\circ\text{C}$ в небольших (5–10 мл) сосудах с пробками, приготовленные растворы ИУК и 6-БАП не хранят, а используют непосредственно перед приготовлением среды Мурасиге-Скуга.

3. Приготовление питательной среды Мурасиге-Скуга.

3.1. В химический стакан емкостью 2 л поместить 30 г сахарозы, долить дистиллированной водой до объема 400 мл и растворить.

3.2. Добавить к раствору сахарозы 50 мл маточного раствора макросоли, 1 мл микросоли, 5 мл хелата железа, 5 мл хлористого кальция, 1 мл каждого в отдельности витамина.

3.3. Для приготовления агара нужно навеску массой 7 г поместить в стакан и залить водой до 200 мл, растворить, нагревая на плитке при постоянном помешивании.

3.4. Приготовленный агар (концентрация агара – 0,7%) долить к раствору солей и питательную среду довести дистиллированной водой до объема 1 л.

3.5. Установить кислотность среды на уровне $pH = 5,5-6,0$. Регулирование величины pH осуществляется добавлением 2–3 капель 0,1 н. раствора HCl (снижение pH) или 2–3 капель 0,1 н. раствора KOH (повышение pH).

3.6. Питательную среду разлить в пробирки на 1/3 объема, закрыть их ватными пробками и поместить в металлические штативы.

3.7. Штативы с пробирками завернуть в целлофановую бумагу, поместить в автоклав и про- автоклавировать в течение 20 мин. при давлении 1,0 атм.

3.8. Приготовленную питательную среду Мурасиге-Скуга охладить при комнатной температуре и хранить в холодильнике при $4^{\circ}C$.

2.4 Контрольные вопросы

1. Что такое маточный раствор?
2. Как простерилизовать питательные среды, посуду, дистиллированную воду, инструменты?
3. Какие вещества входят в состав питательных сред, и какую функцию они выполняют в культуре клеток и тканей *in vitro*?

Тема 3. ПОЛУЧЕНИЕ АСЕПТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭКСПЛАНТОВ

Исходным материалом для получения культур тканей растений могут служить любые органы растений, растущих в полевых условиях. Для микроразмножения древесных растений используют два вида исходного материала: 1) семена и их отдельные части, а также части проростков; 2) молодые ткани взрослых растений (почки, хвоя, ткани листа, побеги).

Перед введением в культуру эксплант стерилизуют. В качестве растворов для стерилизации используют хлорамин, хлорную известь и другие вещества, содержащие активный хлор, или же ртутьсодержащие растворы. Перед посадкой на питательную среду материал ополаскивают в стерильной воде. Далее экспланты помещают на питательную среду.

3.1 Цель занятия - ознакомить обучающихся с различными видами эксплантов и дать практические навыки по их стерилизации и посадке на питательную среду.

3.2 Материалы и оборудование. ламинар-бокс, пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга, стерильные препарировальные иглы, пинцеты, скальпели, флакон с 96%-м спиртом, спиртовка, вата, 1–6%-й раствор хлорамина, 2–3%-й раствор перекиси водорода, 5–7%-й раствор хлорной извести, 0,1%-й раствор сулемы, колбы с автоклавированной дистиллированной водой, чашки Петри, вегетативные почки тополя.

3.3 Программа работы.

1. Посуду, халаты, вату, бумагу, дистиллированную воду необходимо стерилизовать в автоклаве под давлением пара 1 атм и температурой $120^{\circ}C$ в течение 30 мин. (перед автоклавированием колбы, вату, бумагу, халаты заворачивают в целлофановую бумагу).

2. Металлические инструменты (препарировальные иглы, пинцеты, скальпели) следует стерилизовать в сушильном шкафу при температуре $170^{\circ}C$ в течение 1 ч.

3. Для стерилизации почек в качестве эксплантов нужно предварительно удалить из них кроющие чешуи и поместить экспланты по 5 шт. в чашки Петри со следующими стерилизующими растворами: – спирт, 96%-й раствор (время 5 с); – хлорамин, 1–6%-й раствор (время 1–3 мин.); – перекись водорода, 13–18%-й раствор (время 3–5 мин.); – хлорная известь, 5–7%-й раствор (время 5–8 мин.); – сулема, 0,1%-й раствор (время 8–10 мин.).

4. Поверхности ламинар-бокса обработать 96%-м раствором спирта.

5. После стерилизации эксплантов нужно отмыть их от стерилизующих растворов дистиллированной автоклавированной водой.

6. Простерилизованные инструменты и пробирки с питательной средой поместить на стол ламинар-бокса и включить ультрафиолетовое излучение на время 20 мин.

7. Почки поместить на простерилизованный стол ламинар-бокса.

8. Для работы в ламинар-боксе необходимо надеть стерильный халат и шапочку, руки обработать 96%-м раствором спирта.

9. Пинцеты, скальпели и препарировальные иглы поместить в стакан с 96%-м раствором спирта. Перед каждой манипуляцией инструменты обжечь спиртовкой.

10. Взять из штатива пробирку с питательной средой Мурасиге-Скуга, обжечь горлышко над спиртовкой, снять пробку.

11. Препарировальной иглой перенести почки на поверхность питательной среды Мурасиге-Скуга без заглубления, далее пробирку и ее горлышко обжечь на пламени спиртовки и закрыть.

12. Зарисовать образовавшийся из почек каллус через 1–2 недели.

3.4 Контрольные вопросы

1. Какие стерилизующие растворы используются для растительных эксплантов?

2. Из каких областей экспланта образуется каллус?

Тема 4. СУБКУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПЕРВИЧНОГО КАЛЛУСА

Ростовой цикл каллусных клеток начинается с посадки экспланта на питательную среду Мурасиге-Скуга (начало культивирования) и завершается в момент прекращения митоза (стационарная фаза). Общая продолжительность периода роста каллуса составляет 21–28 дней, далее вследствие истощения питательной среды элементами питания клетки стареют и умирают. Для недопущения отмирания клеток в процессе культивирования каллус пассируют (пересаживают на свежую питательную среду) каждые 4–6 недель. Масса каллусной ткани, которую пассируют на свежую питательную среду, должна составлять 60–100 мг на 20–40 мл среды. После четырех недель культивирования формируются многочисленные адвентивные побеги. Адвентивные побеги длиной 0,3–0,5 см отделяют от экспланта и пересаживают на свежую среду. Первые корешки появляются через 10 дней.

4.1 Цель занятия - научить обучающихся проводить пересадку первичного каллуса и адвентивных побегов на свежую питательную среду.

4.2 Материалы и оборудование. Пробирки с каллусами, пробирки с питательной средой Мурасиге-Скуга для культивирования каллусов, чашки Петри, пинцеты, препарировальные иглы, 96%-й раствор спирта, ламинар-бокс, спиртовка, верховой торф, песок, агаровая среда.

4.3 Программа работы.

1. Создать асептические условия в ламинар-боксе для успешного пассирования каллусных тканей (столик ламинар-бокса следует обработать 96%-м раствором спирта и включить ультрафиолетовое излучение).

2. В асептических условиях следует извлечь каллусы тополя из пробирок и поместить их на стерильную поверхность ламинар-бокса.

3. Стерильной препарировальной иглой выделить зоны меристематической активности (белые мелкие клетки).

4. Выделенные транспланты тополя величиной 2–3 мм следует поместить на поверхность питательной среды Мурасиге-Скуга с добавлением гормонов ИУК (концентрация 2 мг/л) и 6-БАП (концентрация 1 мг/л)

5. Результаты пассирования каллусных тканей тополя зарисовать через 2–4 недели. По результатам взвешиваний через 1–2–3–4 недели построить график роста каллуса.

4.4 Контрольные вопросы

1. Каковы основные способы микроклонального размножения?

2. Для каких целей используют культуру каллусов в биотехнологии, генетике и селекции?

Тема 5. МИКРОЧЕРЕНКОВАНИЕ СТЕРИЛЬНЫХ ПРОРОСТКОВ

5.1 Цель занятия - научить обучающихся проводить микрочеренкование стерильных проростков и помещать их на свежую питательную среду.

5.2 Материалы и оборудование. Ламинар-бокс, колбы с проростками, колбы с питательной средой, скальпели, пинцеты, ножницы, препарировальные иглы, спиртовка, флакон с 96 % спиртом, стерильная пленка.

5.3 Программа работы.

1. Подготовить ламинар-бокс и инструменты к работе.
2. В ламинаре извлечь стерильные проростки из колб.
3. Побеги разделить на микрочеренки (междоузлие с почкой) и посадить в питательную среду на глубину междоузлия.
4. Колбу закрыть пленкой и перенести в культуральную комнату.
5. Результаты зарисовать через 2-4 недели.

5.4 Контрольные вопросы

1. Чем отличаются питательные среды для пролиферации побегов, индукции корнеобразования, культивирования меристем, получения микроклубней?
2. Как получают стерильные проростки и для чего их используют?

Питательная среда Мурасиге-Скуга

№ п/п	Компонент питательной среды	Содержание вещества, мг/л
1	KNO_3	1900
2	NH_4NO_3	1650
3	KH_2PO_4	170
4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	690
6	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
7	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025
8	H_3BO_3	6,2
9	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3
10	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6
11	KJ	0,83
12	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
13	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,85
14	$\text{Na}_2 \cdot \text{ЭДТА}$ (трилон Б)	37,35
15	Тиамин HCl	0,1
16	Пиридоксин HCl	0,5
17	Глицин	0,5
18	Никотиновая кислота	0,5
19	Инозитол	100
20	ИУК	2,0
21	6-БАП	0,2
22	Сахароза	30 000
23	Агар	7000

Состав маточных растворов по Мурасиге-Скуга

№ п/п	Компонент питательной среды	Количество вещества
Маточный раствор макросолей № 1 (г на 1 л маточного раствора)		
1	KNO_3	38
2	NH_4NO_3 (или CaCl_2 безводный)	33 (8,8)
3	KH_2PO_4	3,4
4	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (или MgSO_4 безводный)	7,4 (3,6)
5	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13,8
Маточный раствор микросолей № 2 (мг на 100 мл маточного раствора)		
1	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
2	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
3	H_3BO_3	620
4	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2230
5	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860
6	KJ	83
7	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2,5
Маточный раствор хелата железа № 3 (мг на 100 мл маточного раствора)		
1	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	557
2	$\text{Na}_2 \cdot \text{ЭДТА}$ (трилон Б)	745
Маточный раствор витаминов № 4 (мг на 10 мл маточного раствора)		
1	Тиамин HCl	1
2	Пиридоксин HCl	5
3	Глицин	5
4	Никотиновая кислота	5
5	Инозитол	1000