

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
Список сокращений	7
1. УСЛОВИЯ РАБОТЫ С АСЕПТИЧЕСКИМИ КУЛЬТУРАМИ РАСТЕНИЙ	8
1.1. Лабораторные помещения для выполнения работ с <i>in vitro</i> и крио коллекциями	8
1.2. Лабораторные помещения для проведения тестирования на наличие вирусных и вироидных инфекций	9
1.3. Состав питательных сред и их приготовление	9
1.4. Подготовка растительного материала, ламинар-бокса и инструментов	11
2. СНОВНЫЕ ЭТАПЫ <i>IN VITRO</i> СОХРАНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖАЕМЫХ КУЛЬТУР	13
2.1. Введение в культуру <i>in vitro</i>	13
2.2. Микроразмножение и укоренение в культуре <i>in vitro</i>	14
2.3. <i>In vitro</i> коллекции в системе <i>ex situ</i> сохранения вегетативно размножаемых растений	15
2.4. Протоколы для введения в культуру <i>in vitro</i> , микроразмножения, укоренения и среднесрочного хранения некоторых вегетативно размножаемых культур	16
3. МЕТОДЫ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ОБРАЗЦОВ ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖАЕМЫХ КУЛЬТУР (КАРТОФЕЛЯ И МАЛИНЫ)	30
3.1. Дроплет-метод для криоконсервации образцов картофеля	30
3.2. Метод дроплет-витрификации для криоконсервации образцов южноамериканских аборигенных сортов картофеля	31
3.3. Метод дроплет-витрификации для криоконсервации образцов малины и ежевики на основе оптимизированного протокола «dv-biotech»	32
3.4. Регламент и стандарты закладки образцов на длительное криохранение	33
3.5. Состав сред для криоконсервации	35

4. ТЕСТИРОВАНИЕ МИКРОРАСТЕНИЙ НА НАЛИЧИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ, ВИРУСНЫХ И ВИРОИДНЫХ ИНФЕКЦИЙ.....	36
4.1. Тестирование микрорастений на наличие бактериальных инфекций	36
4.2. Тестирование на наличие вирусных инфекций методом иммуноферментного анализа	39
4.3. Тестирование на наличие вирусных и вироидных инфекций методом ОТ-ПЦР	45
5. ОЗДОРОВЛЕНИЕ МИКРОРАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ ОТ ВИРУСА PLRV МЕТОДОМ КРИОТЕРАПИИ	55
Литература	58

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Оборудование для работ с <i>in vitro</i> и крио коллекциями ...	67
Приложение 1а. Оборудование для проведения ИФА и ОТ-ПЦР	67
Приложение 2. Состав питательных сред.....	68
Приложение 3. Праймеры для детекции основных вирусов и вироидов картофеля методом ОТ-ПЦР	70
Приложение 4. Форма протоколов для учета данных по жизнеспособности и регенерационной способности эксплантов в экспериментах по криоконсервации	71

РИСУНКИ

ВВЕДЕНИЕ

Одна из наиболее актуальных задач биологической науки заключается в сохранении биоразнообразия, важным компонентом которого являются генетические ресурсы культурных и родственных им дикорастущих видов растений, являющиеся основой для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства. Актуальность проблемы сохранения генетических ресурсов растений постоянно возрастает, что связано с угрозой утраты генофонда культурных видов и их диких родичей в результате генетической эрозии, урбанизации, воздействия неблагоприятных абиотических факторов среды [57, 86].

Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР) сохраняет одну из крупнейших и старейших в мире коллекцию культурных растений и родственных диких видов, включающую более 320 000 образцов. Основная часть коллекции представлена видами растений, размножаемых семенами. Однако такие важные сельскохозяйственные культуры, как плодовые, ягодные, орехоплодные, декоративные, картофель, некоторые овощные, можно стабильно воспроизводить только при вегетативном размножении. Хранение их генофонда в виде семян невозможно, поскольку половое размножение разрушает генетическую структуру сортов, представленных высокогетерозиготными генотипами. В ВИР вегетативно размножаемые культуры поддерживают в основном в виде полевых коллекций. Полевые коллекции этих культур несут значительные потери из-за воздействия экстремальных факторов внешней среды, заболеваний и вредителей. Практическое решение проблемы надежного сохранения генофонда вегетативно размножаемых культур состоит в оздоровлении растений полевых коллекций от инфекций; в создании дублетных коллекций, сохраняемых в контролируемых условиях среды; в оптимизации этих условий, направленной на сохранение высокой жизнеспособности, регенерационной способности и генетической стабильности растений.

В крупных мировых генбанках присутствуют три системы хранения коллекционных образцов вегетативно размножаемых культур: полевые коллекции, *in vitro* коллекции и крио коллекции [8, 11, 57, 86, 87] (приложения, рис. 1). Каждая из этих систем имеет свои преимущества и недостатки [8, 11] и только их совместное использование может обеспечить надежное долгосрочное хранение генетического разнообразия вегетативно размножаемых культур.

Необходимо отметить, что число культурных видов, для которых разработаны методы сохранения *in vitro* и их криохранения ограничено. Для надежного сохранения генофонда картофеля, плодовых и некоторых овощных культур необходима дальнейшая работа по совершенствованию

методов длительного культивирования растений в контролируемых условиях среды.

Цель данных методических указаний – познакомить читателя с практическими приемами осуществления *in vitro* сохранения и криохранения коллекций вегетативно размножаемых культур и с организацией этих работ в отделе биотехнологии ВИР (см. приложения, рис. 1).

По сравнению с предыдущим изданием 2011 г. [13] данные методические указания расширены и дополнены (см. разделы: 3. Методы криоконсервации; 5. Оздоровление микрорастений картофеля от вируса PLRV методом криотерапии); внесен ряд изменений (предложено несколько наборов для выделения *тотальной* РНК из растений картофеля – раздел 4.3.1.). Рисунки 1–8 приведены из предыдущего издания [13].

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК – абсцизовая кислота
БАП – 6-бензиламинопурин, бензил аденин
ГК – гибберелловая кислота
2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
ИУК – индолил-3-уксусная кислота
ИМК – индолил-3-масляная кислота
ИФА – иммуноферментный анализ
МС – питательная среда Мурасиге-Скуга
НУК – α -нафтилуксусная кислота
ОТ – обратная транскрипция
ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ЭДТА – этилендиаминетрауксусная кислота
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, синоним ИФА
DAS – double antibody sandwich – двойной «сэндвич» – вариант ИФА
DEPC – диэтилпирокарбонат
DMSO – диметилсульфоксид
SDS – додецилсульфат натрия
TAS – triple antibody sandwich, тройной «сэндвич» – вариант ИФА
TDZ – тидаизурон.
LN – жидкий азот
LS – loading solution, погружающий раствор
PVS2 – plant vitrification solution, растительный витрифицирующий раствор 2
RS – rewarming solution, раствор для оттаивания
DMSO – диметилсульфоксид

1. УСЛОВИЯ РАБОТЫ С АСЕПТИЧЕСКИМИ КУЛЬТУРАМИ РАСТЕНИЙ

Методология, принципы и условия работы с асептическими культурами растений подробно изложены в различных руководствах по биотехнологии растений [4, 15 и др.]. В настоящих методических указаниях представлены рекомендуемые методические материалы к выполнению практических работ по формированию, поддержанию и сохранению коллекций образцов вегетативно размножаемых культур в контролируемых условиях среды – *in vitro* и крио коллекциях.

1.1. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ РАБОТ С IN VITRO И КРИО КОЛЛЕКЦИЯМИ

Препараторская для подготовки посуды. Эта комната должна быть оборудована мойкой с подводкой горячей воды, системой очистки воды аквадистиллятором, шкафами для хранения чистой посуды, сушильным шкафом для сушки вымытой посуды.

Препараторская для приготовления питательных сред. Необходимое оборудование: весы аналитические (точность 0,0001 г), весы лабораторные (точность 0,001 г), pH-метр, система очистки воды (дистиллятор, система очистки обратным осмосом), лабораторные столы, шкаф для хранения реактивов для приготовления сред (соли, сахара, агар), холодильник для хранения реактивов (фитогормоны, витамины) и запасных растворов для приготовления сред, полки или шкафы для хранения мерной посуды.

Автоклавная – предназначена для стерилизации питательных сред и посуды. Необходимое оборудование: автоклав или несколько автоклавов.

Ламинарные комнаты – для введения образцов в культуру *in vitro*, микроразмножения введенных образцов. Здесь размещают ламинар-боксы, оснащенные приспособлениями для стерилизации инструментов. Простейший вариант – стерилизация в пламени газовой горелки или спиртовки.

В этих помещениях должна быть обеспечена стерилизация ультрафиолетом.

Для выделения меристем или почек необходимо наличие стереомикроскопа. Для криоконсервации почек микрорастений необходимо наличие сосудов Дьюара.

Инструменты и расходные материалы: пинцеты различного размера, препаровальные иглы, скальпели, ножницы, криопробирки объемом 1,8 мл, стерильные мембранные фильтры, жидкий азот.

Климатические камеры или/и световые комнаты, оборудованные кондиционером и светоустановками с регулируемыми фотопериодом и освещенностью. В этих же помещениях могут быть размещены

холодильники с подсветкой для хранения культур при низких положительных температурах.

Оборудование для работ с *in vitro* и крио коллекциями см. в приложениях (приложение 1).

1.2. ЛАБОРАТОРНЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ТЕСТИРОВАНИЯ НА НАЛИЧИЕ ВИРУСНЫХ И ВИРОИДНЫХ ИНФЕКЦИЙ

1. Моечная, оборудованная мойкой с подводкой горячей воды, дистиллятором, шкафами для хранения чистой посуды, сушильным шкафом для сушки вымытой посуды.

2. Комната для выделения РНК и растирания образцов при проведении ELISA. Эта комната должна быть оборудована вытяжным шкафом. В ней могут быть размещены холодильники для хранения растворов и препаратов нуклеиновых кислот, а также морозильная камера на -70°C для хранения препаратов РНК. Здесь же размещают микроцентрифуги.

3. Комната для постановки реакций обратной транскрипции и ПЦР. В ней помещают ламинарный бокс или камеру для предотвращения контаминации при постановке ПЦР, отдельную морозильную камеру. В комнате, или хотя бы в камере для постановки ПЦР, необходимо обеспечить стерилизацию ультрафиолетом. Желательно, чтобы эта комната не была смежной с другими помещениями.

4. Комната для проведения ELISA и проведения электрофореза также должна быть оборудована мойкой с подводкой горячей воды.

1.3. СОСТАВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД И ИХ ПРИГОТОВЛЕНИЕ

В культуре *in vitro* применяют жидкые и твердые среды. Жидкие среды используют для культивирования сусpenзий, каллусов, изолированных органов и тканей. Для введения в культуру, микроразмножения и хранения растений *in vitro* обычно используют твердые среды, представляющие собой гели. Как правило, в качестве гелеобразующего агента используют агар-агар. В настоящее время применяют и другие гелеобразующие агенты, например, фитогель.

Питательные среды, в основном, представляют собой модификации стандартных сред Мурасиге-Скуга, N6 Чу, B5 Гамборга [48, 53, 68]. Их компоненты можно разделить на шесть групп:

1) основные неорганические вещества (макроэлементы) – это соединения азота в форме нитратов, нитритов, солей аммония; фосфаты, сульфаты, а также растворимые соли калия, натрия, кальция, магния;

2) макроэлементы – соли, содержащие йод, бор, марганец, цинк, молибден, медь, кобальт;

3) источник железа – железо применяют в виде хелатов (FeS_4 + ЭДТА или её натриевая соль $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$) – наиболее доступная для усвоения форма железа;

4) источники углерода – применяют ди- или моносахара в концентрации 20–60 г/л, обычно используют сахарозу, иногда глюкозу, фруктозу, мальтозу;

5) органические добавки – мезоинозит в концентрации 100 мг/л; витамины: пиридоксин (В6), тиамин- HCl (В1), никотиновая кислота (РР), иногда в некоторые среды добавляют аскорбиновую кислоту (витамин С), а-токоферол (витамин Е), цианкобаламин (В12);

6) фитогормоны (регуляторы роста и развития растений) – в методиках, применяемых для хранения коллекций *in vitro*, используют ауксины (ИУК – индолил-3-уксусная кислота, ИМК – индолил-3- масляная кислота, НУК – α-нафтилуксусная кислота, 2,4-Д – 2,4-дихлорфенокси-уксусная кислота); цитокинины (кинетин – 6-фурфурил- аминопурин, зеатин, БАП – 6-бензиламинопурин, TDZ – тидиазурон); гиббереллины (ГК – гиберелловая кислота).

В практической работе для удобства готовят запасные (концентрированные) растворы. Макро- и микросоли хранят в холодильнике при температуре +4°C; витамины разливают в небольшие емкости (по 10–20 мл) в количестве, необходимом для приготовления 1 л среды, и хранят в замороженном виде при температуре –20°C. Растворы макроэлементов готовят в концентрации, превосходящей концентрацию в среде в 10–20 раз, микроэлементов – в 100–1000 раз, витаминов – в 1000 раз. Для их приготовления каждую соль растворяют в отдельном стаканчике, затем сливают вместе и доводят до нужного объема. Запасные растворы хлористого кальция и хелата железа (сернокислое железо + ЭДТА или $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ – трилон Б) готовят и хранят отдельно от других солей.

Растворы фитогормонов желательно готовить непосредственно перед приготовлением среды. Большинство фитогормонов не растворяются в воде. Ауксины, гиббереллины предварительно растворяют в 0,5–2,0 мл спирта; цитокинины, абсцизовую кислоту в 0,5–1 н HCl или КОН. Затем их подогревают до полного растворения и разбавляют водой так, чтобы в 1 мл содержалось 1–2 мг вещества.

После внесения в питательную среду всех необходимых компонентов, кроме агар-агара, реакцию среды доводят до pH 5,6–5,8. Если она кислая, ее титруют 1-нормальным раствором щелочи (NaOH или КОН), если щелочная – титруют 1-нормальным раствором соляной кислоты. После этого вносят расплавленный агар и дистиллированной водой доводят приготовленную среду до нужного объема. Для ягодных и плодовых культур в качестве добавки к агару рекомендуется используется фитогель

гельрит (Phytigel, Gellam Gum), который обеспечивает прозрачность питательной среды и облегчает выявление в ней инфекций [80].

Приготовленные питательные среды разливают в посуду необходимого размера (стаканчики, пробирки, банки). Культуральные сосуды закрывают алюминиевой фольгой или автоклавируемыми крышками. Среду автоклавируют в течение 20 минут при рабочем давлении 1 атм.

Если в среду необходимо добавить компоненты, разлагающиеся при автоклавировании, такие как витамин С, антибиотики, их вносят после автоклавирования. В этом случае среду разливают в стерильные культуральные сосуды в стерильном ламинар-боксе после внесения всех компонентов. Растворы веществ, разлагающихся при автоклавировании, стерилизуют холодным фильтрованием через стерильный мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

1.4. ПОДГОТОВКА РАСТИТЕЛЬНОГО МАТЕРИАЛА, ЛАМИНАР-БОКСА И ИНСТРУМЕНТОВ

Стерилизация растительного материала

Успех введения в культуру часто определяется эффективностью стерилизации. Выбор стерилизующего агента зависит от особенностей экспланта. Для нежных тканей концентрация стерилизующего агента должна быть снижена, чтобы сохранить жизнеспособность экспланта.

Растительные экспланты стерилизуют растворами веществ, содержащих активный хлор (хлорамин, гипохлорит Ca или Na), перекисью водорода, спиртом, нитратом серебра, антибиотиками.

Для предварительной стерилизации часто применяют 70% этиловый спирт, промывая в нем стерилизуемый материал (до 5 минут в зависимости от материала).

Для стерилизации растительных тканей перекисью водорода обычно используют ее 10% раствор в воде.

Гипохлорит кальция (хлорная известь) применяют в виде 5–7% раствора для обработки почек, завязей, цветков, семян, побегов в течение 5–8 минут. Гипохлорит натрия используют в виде 0,5–5% раствора для обработки любых эксплантов в течение 1–20 минут. Время стерилизации и концентрацию подбирают экспериментально для каждого объекта. Хлорамин применяют в концентрации 1–6 %. Пыльники и молодые зародыши обычно обрабатывают в течение 13 минут, сухие семена – 30–60 минут, затем промывают стерильной дистиллированной водой 2–3 раза.

Растворы, содержащие активный хлор, используют один раз и готовят непосредственно перед работой. Для стерилизации растительного материала часто применяют бытовые хлорсодержащие средства (например,