

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
МИКОЛАЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва,
стандартизації та біотехнології

Кафедра біотехнології та біоінженерії

КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

Методичні рекомендації

для виконання лабораторно-практичних робіт та
самостійного вивчення дисципліни
для здобувачів другого (магістерського) рівня вищої освіти
ОПП «Біотехнології та біоінженерія»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
денної форми здобуття вищої освіти



Миколаїв 2024

УДК 576.5:602.3
К90

Друкується за рішенням науково-методичної комісії факультету технології виробництва і переробки продукції тваринництва, стандартизації та біотехнології Миколаївського національного аграрного університету від “ 25 ” вересня 2024 р., протокол № 1 .

Укладач:

О. І. Юлевич – доцентка кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету, канд. техн. наук, доцентка

Рецензенти:

О. І. Каратєєва – в.о. зав. кафедри біотехнології та біоінженерії, доцентка с.-г. наук, доцентка кафедри біотехнології та біоінженерії Миколаївського національного аграрного університету

С. П. Кот – канд. біол. наук, доцент, доцент кафедри зоогієни та ветеринарії Миколаївського національного аграрного університету

ЗМІСТ

ВСТУП		4
1.	Лабораторна робота 1. Застосування культур клітин у різних галузях	6
2.	Лабораторна робота 2. Основні принципи роботи з культурами клітин: культуральні приміщення та обладнання	9
3.	Лабораторна робота 3. Культуральний посуд	12
4.	Лабораторна робота 4. Культуральні середовища	16
5.	Лабораторна робота 5. Основні методи культивування клітин поза організмом	22
6.	Лабораторна робота 6. Характерні особливості клітин рослин в культурі	28
7.	Лабораторна робота 7. Характерні особливості клітин тварин в культурі	31
8.	Лабораторна робота 8. Історія створення культур клітин рослин	37
9.	Лабораторна робота 9. Методи створення клітинних культур рослин	40
10.	Лабораторна робота 10. Особливості культивування клітинних суспензій	48
11.	Лабораторна робота 11. Визначення життєздатності клітин суспензійних культур	54
12.	Лабораторна робота 12. Методи клонального розмноження рослин	59
13.	Лабораторна робота 13. Історія створення культур клітин тварин	65
Перелік літератури		68

ВСТУП

Універсальним і найдрібнішим осередком життя є клітина. Клітинні структури властиві бактерія, грибам, рослинам, тваринам і людині. Це підкреслює їх спільність та органічну єдність у царстві природи. У клітині сконцентровано усі життєво важливі процеси, насамперед, здатність до росту й розмноженню. Клітини це структурні та функціональні одиниці всіх живих організмів.

Культури клітин – метод збереження у життєздатному стані клітин тварин чи рослин. Культури клітин *in vitro* є генетично однорідною популяцією, у зв'язку з чим активно використовуються в генетиці, імунології, біотехнології, вірусології для вирішення цілого кола експериментальних завдань: з'ясування причин та механізмів клітинної загибелі та переродження, отримання фармацевтичних препаратів, у тому числі високоспецифічних антитіл (імуноглобулінів), тестування нових ліків, вивчення токсичних властивостей різних субстанцій та багато іншого.

Оскільки клітини в культурі легко доступні для різних біохімічних маніпуляцій, при роботі з ними токсиканти, ліки, гормони та ін. можуть бути введені в культуральне середовище в заданій концентрації і протягом заданого періоду. Кількість цих речовин може бути на порядок менше, ніж при експериментах на тварині, що є важливою перевагою при роботі з дорогими реактивами. Зникає також небезпека того, що речовина, що досліджується, метаболізується печінкою, запасється м'язами або екскретується нирками. При використанні клітинних культур, як правило, буває неважко встановити, що при певній концентрації речовина, що додається в культуру, знаходиться в контакті з клітинами протягом даного періоду часу. Це забезпечує отримання реальних значень швидкості поглинання чи розпаду досліджуваних речовин.

Очевидні переваги роботи з генетично однорідними клітинами та тканинами в контрольованих умовах поза організмом у порівнянні з

проведенням дослідів на цілих організмах роблять цей метод одним з найбільш універсальних у медико-біологічних дослідженнях. Клітинні культури використовуються для вивчення закономірностей проліферації та контрольованої загибелі.

Переваги культури клітин полягають у можливості точного контролю фізико-хімічного оточення (рН, температура, осмотичний та парціальний тиск, вміст кисню та вуглекислоти), а також біохімічних та фізіологічних умов, що сприяє повторюваності та відновлюваності результатів, механізації та сертифікації проведення досліджень, економії реагентів та терміну виконання певних робіт.

Лабораторна робота 1

Застосування культур клітин у різних галузях

Культивування клітинних культур – це конструювання спеціальними методами клітин нового типу. Воно включає реконструкцію життєздатної клітини з окремих фрагментів різних клітин, об'єднання цілих клітин, що належали різним видам (і навіть відносяться до різних царств - рослин і тварин), з утворенням клітини, що несе генетичний матеріал обох клітин та інші операції.

Культивування клітинних культур використовується для вирішення теоретичних проблем у біотехнології, для створення нових форм рослин, що мають корисні ознаки та одночасно стійкі до хвороб тощо.

Основним об'єктом та засобом дослідження є клітинна культура. Як і будь-який інший метод, метод клітинної культури має низку переваг та недоліків.

Переваги методу клітинних культур:

1. Прижиттєве спостереження за клітинами, їх морфологічними та біохімічними особливостями різними методами, у тому числі з використанням світлової мікроскопії.

2. Можливість оцінки стану клітини «прижиттєво», а не «*post factum*», як у випадку з дослідженнями на тваринах.

3. Можливість зміни умов культивування, що дає широкі можливості щодо оцінки факторів, що впливають на клітинний метаболізм.

4. Оцінка та отримання результатів при використанні невеликої кількості клітинного матеріалу, що знімає проблему використання великої кількості тварин.

5. Використання клітинної культури знімає безліч етичних проблем, пов'язаних як з використанням великої кількості клітинного матеріалу, так і при тестуванні потенційно небезпечних і токсичних речовин.

6. Клітинна культура доступна для різних біохімічних маніпуляцій, у тому числі з отрутами, гормонами, токсинами, радіоактивними сполуками тощо.

7. При використанні клітинної культури оцінюється пряма дія досліджуваної речовини без побоювання, що вона буде метаболізована печінкою або нирками.

8. Стає можливим розрахувати точну концентрацію речовини, що тестується, що викликається той чи інший ефект.

Основними напрямками використання клітинної культури є генетика, імунологія, біохімія, молекулярна біологія, біотехнологія та генна інженерія, вірусологія та трансформація клітин, фармакологія та токсикологія, визначення механізмів росту та диференціювання, та багато іншого (табл. 1).

Таблиця 1

Основні напрямки використання клітинних культур

Наука	Напрямок використання
Генетика	Клонування. Зберігання та злиття клітин. Отримання та робота з мутантними клітинами.
Імунологія	Гібридомна технологія: клітини, що синтезують цікаві для вчених антитіла, піддають процедурі злиття з клітинами міеломи, які продукують антитіла з невідомою специфічністю. Отримані гібридоми дозволили налагодити виробництво моноклональних антитіл: миша імунізується неочищеним препаратом антигену, потім клітини її селезінки гібридизують з клітинами міеломи. Серед отриманих гібридних клітин знайдеться принаймні одна продукуюча антитіла, специфічні до вихідного антигену.
Біотехнологія	Культури клітин використовуються в біотехнології як джерело різних речовин, що секретуються: гормонів, інтерферону і т.д.
Вірусологія	Єдино ефективний метод вирощування вірусів у клітинній культурі, спостереження за клітинами, уражених вірусом, дослідження явища клітинної трансформації.
Ембріологія, розвиток та диференціювання клітин	Використання клітинної культури дозволяє вивчати диференціювання клітин <i>in vitro</i> . Пошук кореляції між зовнішнім стимулом на клітинну культуру та морфобіохімічною відповіддю клітин.
Токсикологія та фармакологія	Тестування на клітинній культурі механізму дії різних речовин, які можуть бути використані як лікарські препарати, детергенти, косметичні засоби, інсектициди, консерванти. Використання клітинної культури дозволяє

	зняти низку етичних проблем у галузі токсикології та фармакології.
Біохімія та патобіохімія	Дослідження біохімічних перетворень та патологічних шляхів надзвичайно ефективно з використанням клітинних культур.
Галузь*	Напрямок використання
Медицина	
Рослинництво	
Тваринництво	
Екологія	
Ембріоінженерія	

*Подовжити таблицю 1.

Завдання

Підготувати презентацію та реферат за темою:

1. Застосування клітинних культур у медицині
2. Застосування клітинних культур у рослинництві
3. Застосування клітинних культур у тваринництві
4. Застосування клітинних культур у екології
5. Застосування клітинних культур у ембріоінженерії
6. Застосування клітинних культур у фармакології
7. Застосування клітинних культур у косметології
8. Застосування клітинних культур у парфумерії

Лабораторна робота 2

Основні принципи роботи з культурами клітин: культуральні приміщення та обладнання

Для успішного проведення досліджень з використанням клітинних культур та застосуванням різних методик клітинної інженерії потрібно виконання низки умов та наявність спеціального парку приладів. У лабораторії для культивування клітинних культур повинні бути створені робочі зони, призначені для кожної стадії роботи з клітинними культурами:

1. Зона роботи персоналу та обробки даних призначена для роботи співробітників, включає письмові столи, книжкові шафи, комп'ютери тощо.

2. Приміщення передбокника призначене для перевдягання в стерильний одяг, миття рук і т.д. Тут повинні розташовуватися шафи для змінного одягу та стерильних халатів, мийка та душова.

3. Стерильний бокс призначений для проведення маніпуляцій із клітинними культурами у стерильних умовах та культивування клітинних культур. Тут повинні розташовуватись ламінарні шафи, CO₂-інкубатори, термостати, лабораторний стіл зі світловим, інвертованим та люмінесцентним мікроскопами, шафа з лабораторним посудом та холодильник.

4. Кельвінаторна (холодильна) кімната призначена для тривалого зберігання клітинних культур, живильних середовищ та реактивів. Тут повинні розташовуватися низькотемпературний морозильник на -152С°, судини Дьюара для зберігання культур клітин в рідкому азоті, фармацевтичний холодильник 0±5С°.

5. Автоклавна – мийна призначена для стерилізації інструментарію, живильних середовищ, «вбивання» клітинних культур. Тут повинні розташовуватися автоклав, сухожарова шафа, мийка.

Рекомендований комплект обладнання для оснащення лабораторії для культивування клітинних культур:

1. Бокс біологічної безпеки 2 або 3 класу захисту.
2. Центрифуга-вортекс до 2000 об/хв.
3. Центрифуга для пробірок 5-100 мл до 5000 об/хв.
4. Мікроцентрифуга для пробірок типу Епендорф до 12000-16000 об./хв.

5. Твердотільний холодотермостат для пробірок об'ємом 1,5 мл з діапазоном робочих температур $-5 - -100\text{ C}^{\circ}$.
6. Вакуумний насос медичний з колбою-пасткою
7. Окремий набір автоматичних мікродозаторів змінного об'єму.
8. CO_2 -інкубатор.
9. Термостат.
10. Світловий мікроскоп.
11. Інвертований мікроскоп.
12. Люмінесцентний мікроскоп.
13. Низькотемпературний кельвінатор -152C° .
14. Посудина Дьюара.
15. Посудина для зберігання та переливу рідкого азоту.
16. Фармацевтичний холодильник $0\pm 5\text{C}^{\circ}$.
17. Паровий автоклав.
18. Сухожарова шафа.
19. Набір ультрафіолетових бактерицидних ламп.
20. Шафи для наборів культуральних флаконів, одноразових наконечників, штативів, одноразових мікроцентрифужних пробірок, ємностей з дезінфікуючими розчинами тощо.

Контрольні питання:

1. У якому порядку повинні розташовуватись робочі зони в лабораторії для роботи з клітинними культурами?
2. Які основні прилади мають бути присутніми у зоні боксу?
3. Які особливості має мікроскоп для роботи з живими клітинними культурами?
4. Для чого необхідний CO_2 -інкубатор?
5. Які способи асептичної обробки застосовуються в ламінарній шафі?

Завдання

Складіть приблизну схему розташування зон у лабораторії для культивування клітинних культур.

1. Відзначити на плані місцезнаходження предметів основного обладнання у приблизному масштабі.

2. Визначити основні зони роботи.

3. Позначити на плані можливе розміщення приміщення для кріосховища клітин. Обґрунтувати свій вибір.

Дуже важливим питанням при культивуванні клітинних культур є вибір відповідного лабораторного посуду. Тут необхідно враховувати ряд факторів, таких як: чи ростуть клітини в суспензії або моношарі, який буде масштаб експерименту, чи допустимо газовий обмін з атмосферою або флакони повинні бути закупорені. На рисунку 1 представлений посуд, який використовується при культивуванні клітин.



Рис. 1. Культуральний посуд. 1. Флакон культуральний з вентильованою кришкою. 2. Пробірка культуральна зі скошеним дном. 3. Чашка Петрі культуральна. 4. Планшет культуральний

При роботі з клітинами необхідно дотримуватися методів асептики, тому весь культуральний посуд має бути стерильним. Існує два основних типи лабораторного посуду для роботи з культурами клітин: скляний та пластиковий (табл. 2). Вибір посуду залежить від матеріального забезпечення лабораторії та переваги дослідника, проте останнім часом популярною стала пластикова – через відносну дешевизну та зручність у використанні.

Таблиця 2

Види посуду для роботи з культурами клітин

Види	Кратність використання	Стерилізація
Скляна	Багаторазова	Вимагає ретельного миття та стерилізації після кожного використання
Пластикова	Одноразова	Не потрібна, у разі придбання стерильного посуду. Потрібно, якщо придбано нестерильну (наприклад, наконечники для автоматичних піпеток)

Весь спектр посуду для роботи з клітинними культурами можна розділити на кілька великих груп – залежно від завдань і частоти застосування в рутинній роботі. Розглянемо ті групи, які необхідні для пасажування та кріозаморозки клітинних культур (табл. 3).

Прилади дозування рідини. Існує великий спектр пристосувань та приладів для дозування рідин, які використовуються у цих роботах – це прості лабораторні груші, напівмеханічні лабораторні груші, різні види автоматичних дозаторів. Найбільш поширеними є механічні та електричні дозатори, які мають функцію «з можливістю автоклавування», оскільки для підтримки асептичних умов повинні автокладуватися 1 раз на 2-3 місяці.

Засоби для розрахунку клітин. Підрахунок клітин – одна з рутинних процедур, яку виконує дослідник під час роботи з клітинами. Існує велика різноманітність електричних приладів для підрахунку клітин – цитометрів, різних за функціями, що виконуються, і за ціною. Також використовуються камери Горяєва. Камера Горяєва – пристрій, призначений для підрахунку кількості клітин у заданому обсязі рідини. Зазвичай її використовують визначення кількості формених елементів у зразку крові. Є предметним склом, з борознами і нанесеною мікроскопічною сіткою.

Таблиця 3

Основні види матеріалів для ведення клітинних культур

Найменування	Види	Використання
Культуральні флакони	25 см ² , 75 см ² , 150 см ² , 175 см ² , 225 см ²	Зростання клітинних культур
Культуральні планшети	Кількість лунок: 96, 48, 24, 12, 6	Зростання клітинних культур, маніпуляції з клітинними культурами (проведення експериментів, клонування, забарвлення)
Чашки Петрі	35 мм, 60 мм, 90 мм	
Піпетки серологічні	Різного об'єму до 25мл	Відбір рідин під час маніпуляцій
Автоматичні дозатори рідин з постійним та змінним обсягом	0,2 мл, 1,0 мл, 5,0 мл, 10 мл	Відбір рідин під час маніпуляцій
Пробірки для центрифугування типу фалькон	15 мл та 50 мл	Для центрифугування
Пробірки типу Епендорф	0,5 мл, 1,5 мл, 2,0 мл	Відбір рідин при маніпуляціях, зберігання реактивів до T=-200C°
Контейнери для зберігання наконечників	Для кожного типу наконечників	Зберігання наконечників в асептичних умовах
Контейнери для зберігання пробірок Епендорфа	Для кожного типу пробірок Епендорфа	Зберігання
Лабораторні пластикові підставки для пробірок різного діаметру	Для кожного типу пробірок	При роботі в ламінарній шафі
Пробірки для заморожування клітин (кріопробірки)	0,5 мл, 1,5 мл, 2,0 мл	Для зберігання в кріосховищі

Прилади та матеріали, що знаходяться у ламінарній шафі. У ламінарній шафі повинен завжди знаходитися необхідний мінімум матеріалів та предметів, які використовуються у повсякденній роботі: ємність із 70% спиртом для протирання поверхонь, ватяні тампони у контейнері, контейнери з наконечниками, дозатори різного об'єму, пінцет, пальник. Усі предмети, що вносяться в ламінарну шафу, повинні протиратися ватним тампоном, змоченим

70% спиртом, а краї судин, що відкриваються і закриваються – також протираються спиртом і прожарюються в полум'ї пальника.

Контрольні питання:

1. Яким буває культуральний посуд?
2. Перерахуйте основні типи матеріалів, необхідних у рутинній роботі з культурами клітин.
3. Як розташовуються основні прилади та матеріали у ламінарній шафі?
4. Перерахуйте основні правила відкривання судин зі стерильними рідинами у шафі для ламінації.
5. Розкажіть про правила особистої гігієни та особистого захисту під час роботи з клітинними культурами.
6. Опишіть основні методи стерилізації (сухий жар, автоклавування, випромінювання, хімічну обробку та фільтрацію): умови, матеріали та обмеження.
7. Якими є правила упаковки скляного посуду при стерилізації?

Лабораторна робота 4

Культуральні середовища

Культивування тканин та клітин рослин потребує правильного підбору поживних середовищ. Усі живильні середовища складаються з наступних основних груп речовин:

- 1) мінеральні солі (мікроелементи – азот, фосфор, калій, кальцій, магній, сірка, залізо та мікроелементи –бір, цинк, мідь, молібден, марганець та ін.);
- 2) цукру (цукрозу та глюкозу в концентрації 2-3% від обсягу середовища);
- 3) деякі вітаміни групи В (тіамін 0,4-1,0 мг/л; піридоксин – 0,1-0,5 мг/л; нікотинова кислота – 0,5-1,0 мг/л; інозит – 20-80 мг/л);
- 4) стимулятори росту (типу ауксинів – β -індолілоцтової кислоти 0,1-1,0 мг/л; α -нафтілоцтової кислоти – 1,0-2,0 мг/л; 2,4- дихлорфеноксиоцтової кислоти (2,4-Д) – 1,0-2,0 мг/л і цитокіни, такі як кінетин або 6-бензиламінопурин або аденін у концентрації 0,2-0,5%).

Деякі живильні середовища містять гідролізат казеїну, амінокислоти, ЕДТА (етилендіамінтетраоцтова кислота) або її натрієву сіль, яка покращує доступність заліза для клітин.

Ізольовані клітини та тканини в більшості випадків нездатні до автотрофного живлення, тому в поживні середовища вводять вуглеводи, які є в цьому випадку необхідним компонентом поживності.

Фітогормони необхідні для диференціювання клітин та індукції проліферації. Диференціювання забезпечується ауксинами, а цитокіни індукують поділ клітин. У разі, коли необхідно індукувати стебловий морфогенез, вміст ауксинів у середовищі знижують.

Пухлинні клітини рослин здатні самі синтезувати гормони, тому вони здатні рости без внесення гормонів у живильне середовище.

В даний час є досить велика кількість різних поживних середовищ. Однак найчастіше для вирощування рослинних тканин і клітин застосовують середовище Г. Мурасіге та Ф. Скуга, яке було запропоновано цими авторами у

1962 р. Це середовище добре збалансоване та відрізняється від інших середовищ співвідношенням амонійного та нітратного азоту. Для приготування твердих поживних середовищ використовують агар-агар (полісахарид, який одержують з морських водоростей).

Для зручності під час роботи з поживними розчинами готують так звані маткові розчини, це розчин, концентрація необхідних компонентів в якому, як правило, в 10 разів вище за необхідний поживний розчин – робочий розчин. Вони зберігаються у холодильнику, а перед використанням їх розводять дистильованою водою.

Хоча сьогодні використовується досить велика кількість поживних середовищ: середовище Уайта і середовище Еглера, середовище Гамборга, середовище Шенна-Хільдербранта, проте, як і раніше, найчастіше використовується середовище Мурасіге і Скуга.

Більшість середовищ для культивування клітин тварин поставляються фірмами, що спеціалізуються на виробництві стерильних середовищ та рост-стимулюючих розчинів. В ранніх дослідженнях для культивування клітин використовували природні середовища на основі тканинних екстрактів та природних рідин організму, таких як екстракт курячого ембріону, сироватка, лімфа і т.д. З поширенням клітинних ліній потреба у великій кількості середовищ призвела до впровадженню середовищ з хімічно точно визначеним складом, заснованим на біохімічному аналізі природних рідин організму. Базове середовище Ігла та мінімальне середовище Ігла (MEM) отримали широке поширення з різними добавками сироваток теляти, людини, білкових гідролізатів та ембріональних екстрактів. До того часу уже було отримано багато постійних клітинних ліній (L929, HeLa та інші) і стало ясно, що ці середовища підходять для більшості клітинних ліній. На сьогодні розроблено ряд модифікованих середовищ (наприклад, для лімфобластних ліній клітин було розроблено середовище RPMI 1640), або модифікація середовищ для специфічних умов культивування (середовище Лейбовиця L15 було розроблено для культивування клітин у відсутності CO_2 та NaHCO_3). В кінці 40-х - початку 50-х років більша

частина клітин вирощувалась в плазмі, або згустку фібриногену за присутності тканинних екстрактів. В своїй класичній роботі Ігл досліджував потребу отриманих клітинних ліній в поживних речовинах, в результаті чого йому вдалось добитись розмноження клітин в середовищі певного складу, що містила суміш амінокислот, вітамінів, солей та вуглеводів, а також невеликі кількості сироватки крові великої рогатої худоби та людини . при цьому 27 факторів середовища були визначені як незамінні для росту клітин. Вони складають основу поживного середовища, відомого за назвою базове середовище Ігла. Із 20 амінокислот, що входили в склад середовища, 13 виявились незамінними, а останні могли бути синтезованими із інших джерел вуглецю. Видалення любого із 7 вітамінів приводило до розвитку симптомів вітамінної недостатності. При культивуванні клітин в БСІ необхідно було середовище часто поновлювати, тому його замінили на мінімальне середовище Ігла (МСІ), в якому концентрація поживних речовин була підвищена, що забезпечувало неперервний ріст клітин в культурі без заміни середовища.

На сьогодні, найбільш популярними є середовища Ігла в в модифікації Дюльбекко DMEM або RPMI 1640, в які додається сироватка. Також зараз в промислових технологіях використовуються безсировоткові середовища для того, щоб спростити процес та зменшити ризик контамінації культур клітин випадковими інфекціями. Популярним компромісом для багатьох лабораторіях стала суміш складних середовищ таких як середовище Хема Нам's F12 з іншими середовищами, що містять підвищені концентрації амінокислот та вітамінів, такі як DMEM.

В більшості випадків для культивування клітин використовують комерційні рідкі середовища культивування. Термін зберігання рідких середовищ є обмеженим. Частіше всього використовують сухі середовища, які готують по мірі необхідності. Обов'язковою умовою при приготуванні середовищ культивування в лабораторних умовах є використання деіонізованої, бідистильованої води.

Для приготування середовища із сухої наважки необхідно розвести наважку поступово додаючи її для розчинення в певному об'ємі. Для розчинення використовують магнітну мішалку. Коли всі компоненти будуть повністю розчинені та перевірено рН середовища, останнє повинно бути зразу ж профільтровано з використанням 0,22-0,45 мкм нітроцелюлозних фільтрів, щоб унеможливити мікробне забруднення.

Часто не всі компоненти присутні в середовищі. Наприклад, глютамін, бікарбонат натрію, глюкоза та сироватка крові або інші ріст-стимулюючі чинники та необхідні компоненти, які додаються по мірі необхідності. Зберігання середовищ для культивування та фосфатно-сольових буферів проводять при температурі +4°C. Зберігання розчину трипсину та ембріональної телячої сироватки проводять при -20° С, бажано невеликими аліквотами, необхідними для культивування.

Окремо до середовищ культивування додається глютамін, так як даний компонент може розпадатись, знаходячись в складі повного поживного середовища. Тому, глютамін також можна зберігати невеликими аліквотами в замороженому вигляді.

Часто для культивування певних клітинних ліній, або ж первинних культур використовують суміш антибіотиків. Для кожного конкретного випадку ця суміш вказується в умовах культивування, приведених в сертифікаті для культивованих клітин.

Контрольні питання:

1. Вкажіть основні типи та склад поживних середовищ для культивування різних типів клітин.
2. Вкажіть основні поживні потреби клітин.
3. В чому полягають переваги та недоліки різних типів поживних середовищ?
4. Які азотовмісні сполуки використовують як джерела азоту у живильних середовищах для культивування рослинних клітин, тканин та органів?

5. Чому до складу більшості середовищ залізо додають у хелатованій формі?

6. Як вік рослинної тканини, що культивується *in vitro*, впливає на склад живильного середовища?

7. Назвіть елементи обов'язкові складові живильного середовища.

8. Які елементи не обов'язково додавати до живильного середовища?

9. Які вуглеводи і у якій концентрації є найкращим джерелом вуглеводного живлення для більшості рослинних тканин?

10. Назвіть основні суміші вітамінів, які додають до живильного середовища?

11. Які фітогормони використовують для росту і диференціації рослинних клітин?

12. На які групи розділяють рослинні тканини за потребою у фітогормонах?

13. Як впливає співвідношення ауксин:цитокінін на процеси органогенезу?

14. Чим обумовлене обмежене використання рослинних екстрактів як стимуляторів росту?

15. Які оптимальні межі рН для більшості рослинних культур?

16. Які типи культур особливо чутливі до значення рН?

17. У яких випадках до складу живильного середовища додається активоване вугілля?

18. Чому до складу більшості стандартних середовищ не входить амінокислота глютамін і доводиться додавати додатково?

19. Що таке безсироваткові середовища: для чого вони застосовуються, їх переваги та недоліки.

20. Які антибіотики та антимікотики можуть додаватися у повні ростові середовища? У яких випадках їхнє застосування виправдане?

21. Перерахуйте недоліки застосування антибіотиків та антимікотиків при культивуванні клітин.

Завдання:

1. Наведіть у вигляді таблиці склад основних середовищ, що використовуються для культивування рослинних клітин. Зробіть порівняння складу середовищ та зробіть висновки щодо особливостей їх використання.
2. Наведіть у вигляді таблиці склад основних середовищ, що використовуються для культивування клітин тварин. Зробіть порівняння складу середовищ та зробіть висновки щодо особливостей їх використання.

Основні методи культивування клітин поза організмом

Залежно від способу та умов культивування можна виділити кілька типів рослинних культур: калюсні культури, суспензійні культури (рис. 2).

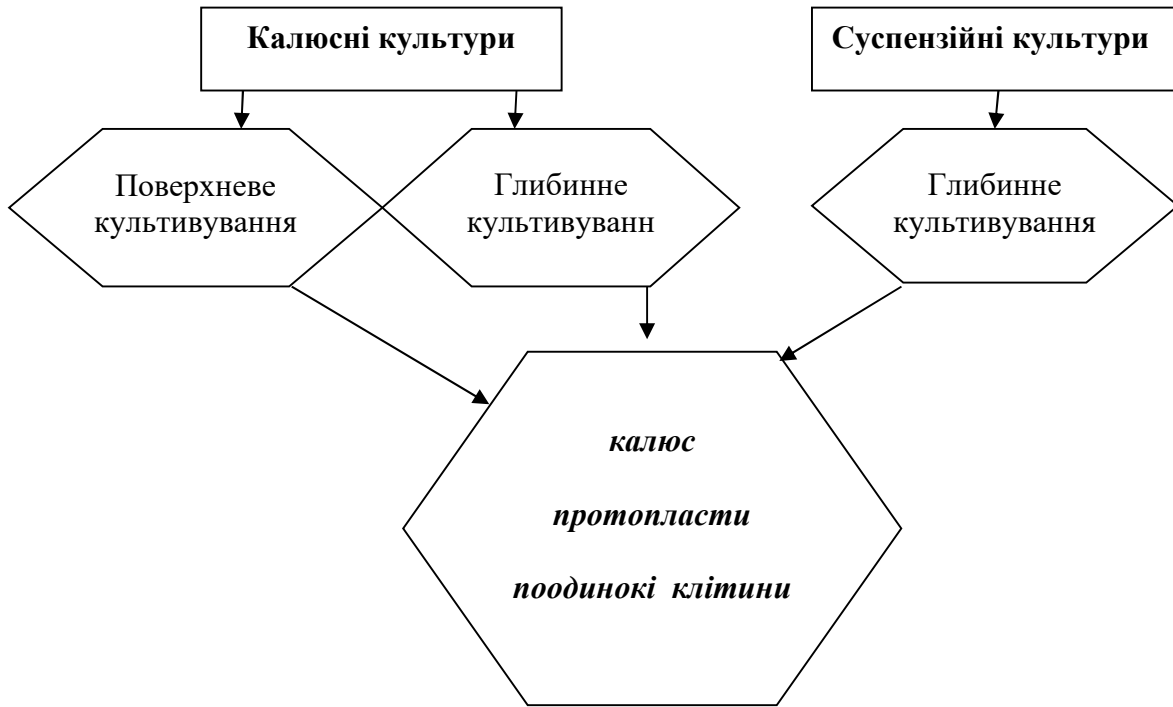


Рис. 2. Розподіл культур рослин за способом культивування

Необхідною умовою культивування клітинних суспензій є інтенсивне та постійне перемішування середовища з клітинами. Розподіл клітин у культурі забезпечується наявністю в культуральному середовищі ауксинів та цитокінів, тобто фітогормонів. За своїми характеристиками суспензійні культури представлені типовими калюсними клітинами. Для клітин використовують ті ж сольові середовища, які використовуються і для культивування калюсу.

Культивування клітин може здійснюватися як у накопичувальному режимі або періодичному культивуванні, так і проточному або безперервному культивуванні. У накопичувальному режимі культуральне середовище не змінюється до закінчення процесу культивування. У разі безперервного культивування постійно відбирається частина середовища та додається свіже середовище.

У процесі культивування клітин постійно здійснюється контроль стану культури, при цьому оцінюють такі характеристики як життєздатність клітин, щільність клітин у суспензії, ступінь агрегованості та швидкість росту клітин.

Особливості культивування поодиноких клітин

Поодинокую клітину можна виділити із суспензії клітин, з калюсу, з рослинних тканин, наприклад, меристеми або з культури ізольованих протопластів після відновлення клітинної стінки.

Культивування поодиноких клітин пов'язане з великими труднощами, тому що одиночна клітина не ділиться в тих умовах, за яких здійснюють розподіл суспензії клітинної або калюсної тканини. Для подолання цієї проблеми розроблено спеціальні методи культивування. Перший метод, що забезпечує розподіл одиночної клітини в культурі, був запропонований Джонсом у 1960. Цей метод отримав назву методу «няньки». В даному випадку «нянька» забезпечує стимуляцію поділу одиночної клітини. Як «няньки» використовують шматочки калюсної тканини, яка відокремлена від одиночної клітини фільтром у разі суспензійної культури. У присутності «няньки» одиночна клітина ділиться і дає клон (генетично однорідні клітини).

Якщо використовують агаризовані (тверді) середовища, то одиночну клітину поміщають у центр чашки Петрі, який відзначений кружальцем на дні чашки. На відстані 0,5 см від окремої клітини поміщають шматочок (2-3 мм у діаметрі) тканини, що добре росте.

Тканина може бути того ж виду, що і ізольована клітина, а може бути близького виду. Показано, що в процесі росту тканини в середу виділяються біологічно активні речовини, які стимулюють поділ одиночних клітин.

Через 2-3 тижні з одиночної клітини формується маса тканини, її переносять на свіже живильне середовище (у рідке або тверде) і продовжують культивування.

Необхідно відзначити, що отримана тканина є клоном.

Інший метод культивування одиночних клітин заснований на використанні мікрокраплі живильного середовища (20 мкл). Використання мікрокраплі в чашці Купрака забезпечує малий об'єм та концентроване живильне середовище.

Індукцію клітинних поділів одиночної клітини можна забезпечити за допомогою так званого «годуєчого шару» (аналогічний методу «няньки»). У якості «годуєчого шару» використовуються клітини суспензійної культури того ж виду рослин, що активно діляться, що і одиночна клітина.

Основою використання всіх перерахованих методів є збільшення концентрації факторів, що виділяються клітинами у процесі культивування. Ці фактори можуть бути отримані після фільтрації та концентрування культурального середовища, в якому зростали клітини. Для цього використовують фільтрування клітинної суспензії, що знаходиться в експоненціальній фазі росту, коли досягається найбільша концентрація так званих факторів кондиціювання – метаболітів, що виділяються в середовище в процесі культивування.

Якщо попередньо отримати кондиціонуючий фактор і внести його в середовище з одиночною клітиною, можна індукувати її поділ.

Отже, для забезпечення поділу одиночної клітини в культурі, необхідно досягти швидкого підвищення концентрації фактора кондиціювання одним із зазначених способів (рис. 3).

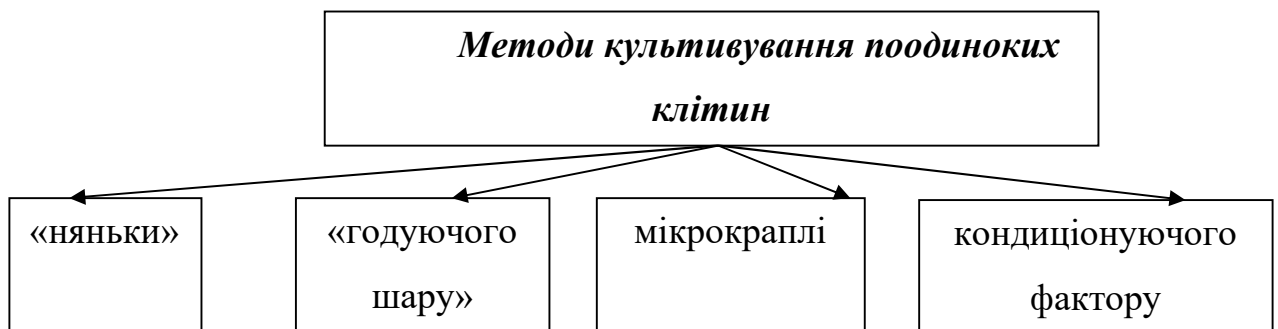


Рис. 3. Методи, що використовуються для одержання потомства поодиноких клітин (клонів)

Дослідження природи кондиціонуючого фактора показало, що це низькомолекулярні речовини (молекулярна маса близько 700 Да), водорозчинні та термостабільні.

Існує 2 основні системи культивування клітин тварин.

1. Непроточні культури – тип культур, у якому клітини вводять у фіксований обсяг середовища. У міру зростання клітин відбувається використання поживних речовин та накопичення метаболітів, тому середовище має періодично змінюватися, що призводить до зміни клітинного метаболізму, званого ще й фізіологічним диференціюванням. Згодом, внаслідок виснаження середовища відбувається припинення проліферації клітин.

Збільшити тривалість життя непроточних культур можна кількома способами:

- уривчастий (частина культури замінюється рівним обсягом свіжого середовища);
- постійний (обсяг культури збільшується із постійною низькою швидкістю, а невеликі порції клітин періодично видаляються);
- перфузійний (здійснюється постійне надходження свіжого середовища в культуру та одночасне видалення рівного обсягу використаного (безклітинного) середовища).

Перфузія може бути відкритою, коли з системи видаляється все середовище, і закритою, коли середовище, що видаляється, проходить через додаткову посудину, де відновлюється її рН і здійснюється аерування, і повертається в культуральну посудину.

Усі системи непроточних культур характеризуються накопиченням відходів у тій чи іншій формі та мінливістю зовнішніх умов.

2. Проточні культури забезпечують справжні гомеостатичні умови без зміни концентрації поживних речовин та метаболітів, а також кількості клітин. Гомеостаз обумовлений постійним входженням середовища у культуру та одночасним видаленням рівного обсягу середовища з клітинами. Такі системи придатні для суспензійних культур та моношарових культур на мікроносіях.

Існує 2 великих напрямки у культивуванні тварин клітин: моношарові культури та суспензійні культури.

Суспензійні культури краще з точки зору збільшення виходу клітин.

Моношарові культури також мають ряд переваг:

1. Легко провести повну заміну середовища та промити клітини перед додаванням свіжого живильного середовища. Це важливо в тих випадках, коли зростання клітин йде в одних умовах, а напрацювання продукту в інших умовах, наприклад при переносі клітин із середовища із сироваткою в безсироваткове середовище. Також можна повністю видаляти небажані компоненти.

2. Дозволяють забезпечити високу густину клітин.

3. Багато клітин експресія необхідного продукту йде ефективніше, якщо клітини прикріплені до субстрату.

4. Моношарові культури можуть бути використані для будь-якого типу клітин, що забезпечує найбільшу гнучкість досліджень.

5. У деяких випадках, наприклад, для поширення вірусів, потрібні тісні міжклітинні контакти.

Недоліками моношарових культур є:

- вимоги великого простору;
- зростання вартості та трудомісткості зі збільшенням масштабу;
- недостатньо ефективний контроль, зумовлений труднощами відбору проби;

- складності у визначенні та контролюванні рН, концентрації кисню.

Слід зазначити, що застосування мікроносіїв усуває ці недоліки. Існує багато різних різновидів цього способу культивування:

1. Культивування у плоских флаконах (матрацах).

2. Культивування в бутлях, що обертаються, коли в кожен момент часу 15-20% поверхні пляшки покрито живильним середовищем, а клітини знаходяться поперемінно то в середовищі, то в повітрі.

3. Культивування в колонках на мікроносіях, в якості яких виступають щільно упаковані скляні намисто діаметром 35 мм, що не зміщуються, стос пластин і ін., а живильне середовище омиває їх, протікаючи зверху вниз.

Завдання

1. Скласти таблицю переваг та недоліків різних методів культивування клітин рослин.

2. Скласти схему основних систем культивування клітин тваринного походження.

3. Скласти таблицю порівняльних характеристик різних систем культивування клітин тваринного походження

4. Скласти таблицю переваг та недоліків різних методів культивування клітин тварин.

Лабораторна робота 6

Характерні особливості клітин рослин в культурі

Методи культивування ізольованих фрагментів рослин ґрунтуються на дослідженні важливої властивості рослинної клітини – тотипотентності.

Тотипотентність у рослин реалізується при загоєнні ран; на рановій поверхні рослин в результаті неорганізованої проліферації клітин відбувається розвиток калюсу (лат. Callus - мозоль, товста шкіра).

Каллус сприяє загоєнню ран. Однак багато однодомних рослин втратили здатність до утворення калюсу та вегетативного розмноження.

В експериментальних умовах *in vitro* при вирощуванні фрагментів тканин, органів (експлантів) або клітин на штучних живильних середовищах можлива реалізація супресованої (пригніченої) *in vivo* тотипотентності. Це здійснюється під дією регуляторів зростання та розвитку фітогормонів. Основною умовою перетворення рослин клітини на калюсну є присутність у живильному середовищі фітогормонів.

Ауксини викликають процес дедиференціювання клітини, що готують її до поділу, а цитокініни - проліферацію (розподіл) дедиференційованих клітин.

Якщо в живильне середовище без гормонів помістити шматочок стебла, листа, кореня (без верхівки) або будь-який інший експлант, що складається зі спеціалізованих (диференційованих) клітин, то поділ клітин не відбудеться і калюсна тканина не утворюється. Це пов'язано з нездатністю диференційованих клітин до розподілу.

Кожна клітина має три фази зростання: 1) розподіл; 2) розтяг; 3) диференціювання. Характерною рисою заключної фази зростання є потовщення вторинної клітинної оболонки та втрата клітиною здатності до поділу. А, щоб

диференційовані клітини знову придбали здатність до поділу, потрібно, щоб відбулося їх дедиференціювання, тобто, перетворення клітин на клітини як у меристематичному стані. Розмноження диференційованих клітин призводить до анархічного, неорганізованого зростання, внаслідок чого утворюється калюсна тканина. Таким чином, перетворення спеціалізованої тканини на калюсну пов'язане з індукцією клітинного поділу, здатність до якого вона втратила в процесі диференціювання.

Генетична різноманітність калюсних клітин дозволяє використовувати їх для клітинних селекцій на стійкість до несприятливих факторів середовища, фітопатогенів та на підвищену продуктивність.

Калюсні клітини *in vitro* зберігають багато фізіолого-біохімічних рис властивих нормальним клітинам, які входять до складу рослинного організму. Калюсні клітини зберігають здатність до синтезу вторинних метаболітів. Калюсам, які отримані від морозостійких рослин, притаманні морозостійкість і здатність до загартування. Такої властивості не мають калюси і тканини тропічних і субтропічних рослин. Отже, стійкість до низьких температур зберігається при переході клітини до калюсного росту.

Спільним у калюсних і нормальних клітин також є стійкість до дії високих температур, осмотично активних речовин, засолення.

Поряд з тим калюсні клітини можуть набувати деяких властивостей, які відрізняють їх від материнських. У них з'являються специфічні білки і зменшується кількість білків, які властиві фотосинтезуючим клітинам листка, або вони зовсім зникають. Калюсні клітини відрізняються значною генетичною гетерогенністю та фізіологічною асинхронністю.

В результаті виходу з під контролю організму калюсні клітини ростуть неорганізовано і асинхронно.

Клітинний цикл калюсних клітин довший, ніж у материнських клітин. Особливістю калюсних клітин є гетерогенність за віком. В калюсній тканині одночасно присутні клітини молоді в G₁-фазі, старі в G₂- і S-фазах циклу.

Значні відмінності спостерігаються в енергетичному обміні калюсних клітин. Вони споживають менше кисню у порівнянні з нормальними. Дихальний коефіцієнт калюсних клітин більший 1, що свідчить про зсув співвідношення між диханням і бродінням в бік посилення бродіння. Мітохондрії в калюсних клітинах розвинуті слабо, у них мало крист, що не може не впливати на активність аеробного дихання.

В калюсних клітинах спостерігається зсув в сторону пентозофосфатного шляху, який є джерелом пентоз, необхідних для клітин, що діляться.

Ізольований протопласт – це частина клітини, яка залишається після видалення клітинної стінки, здійсненої, як правило, ферментативним способом.

Для проведення ферментативного способу ізоляції цитопластів використовують препарати целюлаз і пектиназ, одержуваних з різних грибів - *Myrothecium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* та ін і з травного соку равлики *Helix pomatia*.

Залежно від походження рослини та взятої для ізоляції протопластів тканини підбирається вид ферментів, їх комбінація та концентрація. Для виділення протопластів використовують різні тканини рослини, а також калюсні та суспензійні культури.

Контрольні питання

1. Що таке калюс?
2. Які зміни відбуваються у спеціалізованій клітині при переході до дедиференціації?
3. Із яких органів рослини можна отримати калюсну тканину?
4. Яка основна особливість середовища для калюсогенезу у злаків?
5. Назвіть типи калюсної тканини.
6. Яке практичне використання пухких калюсів?
7. Який тип калюсної тканини Ви б використали для отримання рослин-регенерантів?
8. Наведіть приклади можливого використання калюсної тканини.
9. Що таке клітинна суспензія та яке її практичне значення?

10. Калюсній тканині якого типу надається перевага для отримання клітинної суспензії?
11. Назвіть методи культивування одиночних клітин.
12. Які показники визначають для оцінки росту суспензійної культури?

Лабораторна робота 7

Характерні особливості клітин тварин в культурі

У ранніх роботах (до 1961 р.) з культивування клітин тварин, дослідники вважали, що при підтримці соматичних клітин в умовах, максимально наближених до умов *in vivo*, клітини можуть ділитися протягом необмежено тривалого часу, зберігаючись у незмінній формі. Однак, подальші досліді Хейфліка та Мурхеда показали, що це далеко не так. Культури первинних клітин порівняно легко виходили з різноманітних тканин. Деякий час клітини експоненційно розмножуються, але приблизно через 6 місяців швидкість зростання культури знижується і вже за 10 місяців клітини дегенерують і гинуть. Це явище спостерігається після 50 генерацій, коли з однієї первинної клітини утворюється приблизно 10^{22} клітин. У разі отримання первинних культур з дорослих тканин, кількість подвоювань ще менша і становить приблизно 20. За цим явищем закріпилася назва «Межа Хейфліка», на честь вченого, який займався дослідженнями в цій галузі та висунув пояснення даному феномену. Межа Хейфліка пов'язана зі скороченням тіломірних ділянок ДНК на кінцях хромосом. Якщо клітина не має активної теломерази, як переважна більшість соматичних клітин, при кожному розподілі клітини теломери скорочуються, тому що ДНК-полімераза не здатна реплікувати кінці молекули ДНК. Коли після певного числа поділів теломери зникають зовсім, клітина зазвичай стає «арештованою» у певній стадії клітинного циклу або запускає програму апоптозу.

На ранніх стадіях клітини зберігають правильний набір хромосом диплоїдний, але вже на пізніших етапах більшість клітин стає анеуплоїдами. У

поодиноких випадках такі анеуплоїдні клітини виживають, починають розмножуватися і перетворюються на клітинний штам.

Клітинні штами мають специфічні властивості, які зберігаються протягом тривалого культивування. Багато стабільні клітинні штами здатні до невизначено тривалого зростання та розмноження в культурі, причому це пов'язано з анеуплоїдним каріотипом.

Особливості клітин, що культивуються, *in vitro* полягають в наступному:

1. Клітини тварин і, особливо, ссавців здатні зростати у стані клітинної культури лише прикріпленими до будь-якого субстрату. Як субстрат можна використовувати інші клітини, колаген, желатин (денатурований колаген), скло або пластик. У разі відокремлення культуральних клітин від субстрату, відбувається зупинка росту та розмноження, швидка дегенерація такої суспензійної культури.

2. Клітини зростаючої клітинної культури перебувають у клітинному циклі поділу і поділяються з періодичністю приблизно 1 раз на 24 години.

3. Клітини у своєму життєвому циклі проходять низку етапів (рис. 4)

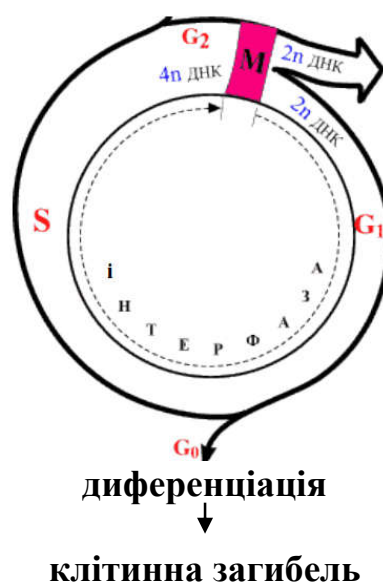


Рис. 4. Клітинний цикл

Клітинні культури перебувають під контролем свого зростання, що пов'язано з постійною дією факторів, що лімітують. Для стимуляції первинної культури, перш ніж клітини відновлять рух за циклом до фази розподілу, слід усунути обмеження зростання. У цьому випадку клітини повертаються у фазу G1 клітинного циклу, відбувається синтез ДНК, після чого клітина ділиться.

Клітини деяких швидкозростаючих пухлин втрачають чутливість до контролю зростання, і тому отримані з пухлин первинні клітини легко адаптуються до зростання в культурі і можуть зростати до більш високої щільності в порівнянні з клітинами з нормальних тканин.

4. Підтримка постійної щільності популяції клітинної культури внаслідок узгодження швидкості поділу. У разі епітеліальних клітин або фібробластів, поміщених у культуральний флакон, відбуватиметься «приклеювання» до поверхні флакона, «розпластування» клітин та їх поділ до утворення суцільного моношару з клітин, що стикаються один з одним.

5. Клітини, що діляться у культурі, зазнають у процесі зростання так зване *контактне гальмування*. При досягненні клітинами щільного моношару, при якому клітини щільно прилягають одна до одної, відбувається зупинка поділу клітин. Причому навіть нормальні клітини можуть залишатися в такому стані деякий час. Явище контактного розмноження тісно пов'язане з функціонуванням *адгезивних контактів*. Адгезивні контакти забезпечуються внаслідок утворення комплексів рецепторів поверхні мембрани клітин. У мембрану клітин вбудовані рецептори адгезії, основу яких лежить комплекс глікопротеїнів. Головним глікопротеїдом клітинної поверхні є фібронектин. Cig (*Cold insoluble globulin* – нерозчинний на холоді глобулін) та SP (*Cell surface protein* – клітинний поверхневий білок). Фібронектин характеризується молекулярною масою 220 000, але може існувати також у формі пов'язаних дисульфідними зв'язками димерів та більш високих олігомерів. Молекули фібронектину дуже гнучкі і складаються з кількох лабільно пов'язаних доменів. На клітинній поверхні фібронектин утворює відносно нерухому фібрилярну мережу, пов'язану через мембрану клітини з елементами цитоскелета. Фібронектин відсутній на поверхні

мітотичних клітин, і його кількість різко збільшується при досягненні нормальними клітинами повного моношару або при зупинці клітинної проліферації при низькій концентрації сироватки.

При дотику глікопротеїнових комплексів сусідніх клітин відбувається формування *бляшок адгезії*. Адгезивні бляшки починають виділяти різноманітні білки, основу яких становлять білки цитоскелету.

Білки цитоскелета, вбудовуючись у мембрану, зменшують її «плинність», клітини не округляються. Таким чином, при контакті клітини із сусідньою клітиною відбувається припинення руху в цьому напрямку, так зване *контактне інгібування*. При досягненні моношаровості клітини культури припиняють свій рух. Клітини стають більш скупченими та менш розпластаними, що призводить до зменшення частки клітинної поверхні, зверненої до середовища. Далі клітини перестають ділитись, відбувається гальмування проліферації. Якщо моношар клітин поранити голкою до утворення вільної зони від клітин, то в клітинах, що примикають до краю такої рани, відбувається стимуляція синтезу ДНК і поділів. В результаті клітини швидко займають поверхню «рани» у моношарі (рис. 5).

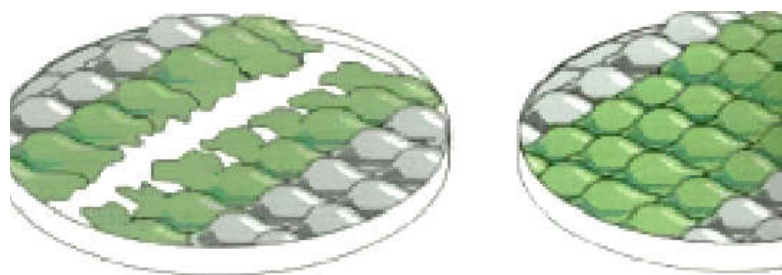


Рис. 5. Проліферація клітин після нанесення «рани» клітинному шару

6. Щільність клітинної популяції регулюється концентрацією чинника зростання.

Зазвичай фактор росту присутний в середовищі в дуже низькій концентрації, близько 10^{-9} - 10^{-10} М. Кожна клітина має на своїй поверхні приблизно 80-150 рецепторів для фактора росту, причому кожен рецептор має дуже високу спорідненість до нього. Після з'єднання «фактор росту – рецептор», комплекс, що утворився, поглинається клітиною шляхом ендоцитозу і

розщеплюється. Таким чином, між сусідніми клітинами існує жорстка конкуренція за фактори зростання, внаслідок чого виключається зростання клітинної популяції вище за деякий рівень її щільності.

У ході життєдіяльності клітинної культури у ряді випадків відбувається зміна ростових властивостей клітин, що культивуються, так звана *трансформація*. Як правило, трансформація – процес незворотній, при якому відбувається сукупність генетичних змін, що контролюють неопластичний фенотип.

Трансформовані клітини характеризуються такими особливостями:

1. Укорочення клітинного циклу (час подвоєння зменшується з 36 годин до 12 годин).
2. Зменшення залежності клітин від додавання сироватки.
3. Невимогливістю до якості субстрату.
4. Збільшенням потенції до утворення пухлин.
5. Морфологічними змінами (дрібніння або укрупнення, збільшення ядра).

Можна припустити, що зміна ростових властивостей є формою адаптації трансформованих тварин клітин до умов, за яких обмежується зростання та розмноження нормальних клітин. Трансформовані клітини здатні зростати в умовах, у яких відношення площі поверхні до об'єму менш сприятливе.

Трансформовані клітини здатні рости у суспензійних культурах. Причинами трансформації клітин є такі фактори:

- Вірусна (SV-40, поліоми).
- «Спонтанна» (результат активації онкогенів, вже присутніх у геномі клітини або точкові мутації у нормальних генах).

Контрольні питання

1. Проблеми розвитку культивування тваринних клітин.
2. Можливості одержання первинних культур.
3. Динаміка розвитку клітинних ліній та вплив фізичних, хімічних та біологічних факторів.

4. Специфічні особливості культивування клітинних ліній, отриманих із різних типів тканин вищих тварин.
5. Значення та можливості використання культивованих клітин тварин.
6. Класичні дослідження Хейфліка та Мурхеда щодо виділення лінії диплоїдних клітин людини WI-38. Межа Хейфліка і феномен старіння на лінії WI-38.
7. Особливості культури тваринних клітин. Гетерогенність клітинної популяції.
8. Характеристика первинних культур тваринних клітин. Пасивування.
9. Трансформація у постійну клітинну лінію.
10. Взаємодія клітин один з одним у культурі тваринних клітин. Швидкість поділу клітин. «Соціальний контроль» щільності популяції.
11. Трансформація клітин тваринної культури. Причини трансформації.

Лабораторна робота 8

Історія створення культур клітин рослин

Етапи становлення методу культивування клітин

I – 1802-1902 рр.

У ці роки здійснено перші дослідження культивування рослинних клітин та тканин.

II – 1902-1930 рр.

Розроблено поживні середовища для культивування рослинних клітин та способи їх культивування.

III – 1930-1940 рр.

Розроблено спосіб періодичного культивування тканин рослин (суттєвий внесок зробив Готрі).

IV – 1940-1960 гг.

Використання рослинних гормонів у розробці інтенсивного культивування калусних тканин.

V – 1960-1975 р.р.

Розроблено метод виділення протопластів, соматичної гібридизації та мікроклонального розмноження рослин.

VI – 1975 по теперішній час

Генна та клітинна інженерія клітин рослин.

Спроби культивування рослинних тканин розпочато досить давно, зупинимося на основних етапах становлення методу культивування рослинних тканин.

1 етап можна визначити як перші спроби культивування рослинних тканин (1892-1902 рр.). Німецькі дослідники Фехтінг, Рехінгер та Хаберландт спробували культивувати в розчині сахарози різні фрагменти рослинних тканин у культурі. З сегментів стебел кульбаби та тополі були отримані первинні калюси. На підставі скромних експериментальних результатів Хаберландт висловив гіпотезу про тотипотентність будь-якої рослинної клітини, тобто

здатність соматичних клітин забезпечити розвиток цілої рослини. Ця фундаментальна властивість рослинних клітин була доведена пізніше, хоча ця ідея була висловлена ще на початку ХХ століття.

II етап розвитку методу було присвячено розробці середовищ для культивування. Мабуть, найбільш значущими були результати Роббінса та Котте, які показали можливість культивування меристеми кінчиків томатів та кукурудзи на твердих живильних середовищах. Однак час культивування був нетривалим і тканини гинули. Найінтенсивніше розвиток цього почалося з 1932 р., який можна виділити на наступний етап.

III етап (1932-1940 рр.), у цей час французький вчений Готре показав можливість тривалого культивування рослинних тканин завдяки їх періодичному пересадженню на свіже живильне середовище. Таким чином, було розроблено основу періодичного культивування тканин рослин. Природно, це сприяло розвитку інтересу до методу культивування рослинних тканин.

IV етап (1940-1960 рр.). У 1955 р. було відкрито кінетик – новий клас фітогормонів – цитокінінів. Кінетин стимулював поділ клітин у культурі тканини, які позбавлені провідних пучків та камбію. У цей час розпочалися роботи з дослідження умов інтенсивного культивування калюсних тканин та стимуляції процесів морфогенезу.

V етап (1960-1975 рр.) характеризувався розробкою методу ферментативного виділення протопластів з коренів та плодів томату та його культивування. У 1970 р. Пауер із співробітниками здійснили штучне злиття отриманих протопластів, що дозволило отримувати соматичні гібриди рослинних клітин. Французький дослідник Ж. Морель та російський вчений Р.Бутенко розробили метод мікророзмноження рослин *in vitro* з метою оздоровлення посадкового матеріалу орхідей.

VI етап. Починаючи з 1975 р. дотепер інтенсивно розвивається техніка культивування клітин та тканин рослин. У цей час були розроблені методи електрозлиття протопластів, методи селекції, методи одержання культур гаплоїдних клітин, створені вектори на основі Ti- та Ri-плазмід *Agrobacterium*

tumefaciens та *A. rhizogenes*. Розроблено методи перенесення генів у клітини дводольних рослин. Отже, метод культури клітин та тканин рослин пройшов тривалий період свого становлення.

Завдання

Підготувати презентацію та реферат за темою: «Історія створення культур клітин рослин»

Методи створення клітинних культур рослин

Культура калюсних тканин

Калюс – тканина, що виникла в результаті неорганізованої проліферації клітин органів рослин (рис.6).



Рис. 6. Безформні шматочки рослинної тканини (калюс)

У природі калюс утворюється в результаті дедиференціації паренхімних клітин у відповідь на поранення. Утворення і ріст калюсу регулюються ауксинами і цитокінінами. За допомогою цих речовин можна індукувати утворення калюсу у тих тканин рослини, які не утворюють його у відповідь на поранення. Існують нові уявлення, згідно яких не ауксини і цитокініни, а полісахариди та якісь інші індуктори викликають ділення клітин, в результаті якого утворюється калюс.

Перехід клітини *in vitro* із диференційованого стану до дедиференціації і активних клітинних поділів обумовлений зміною активності генів (епігенетичною мінливістю). Активування одних генів і репресування інших приводить до зміни білкового складу клітин. В калюсних клітинах з'являються специфічні білки і водночас зникають або зменшуються в кількості білки, які характерні для фотосинтезуючих клітин листка.

На сьогодні калюсні культури індукуються практично із будь-якого органа і тканини рослин (листіків, стебел, коренів, квітконосів, частин квітки) і навіть таких спеціалізованих тканин рослин, як ендосперм насіння або мікроспори

ізолювані із пиляків. Однак простота цього процесу залежить від виду рослини і тканини. Здатність утворювати калюс в умовах *in vitro* у молодих, ювенільних, рослин вища, ніж у зрілих. У випадку спеціалізованих тканин, наприклад ендосперму, утворення і ріст калюсу залежать від віку насіння. Як правило, калюс погано утворюється на експлантатах старших 8-11 діб після запилення. Відрізки стебла деревних рослин звичайно є поганими експлантатами для отримання калюсу.

Варто зазначити, що для успішної ініціації первинного калюсу в живильне середовище часто необхідно додавати антиоксиданти (глутатіон – 5 мг/л, діетилдитіокарбамат – 5 мг/л, цистеїн – 5 мг/л, аскорбінову кислоту – 5 мг/л, полівінілпіролідон – 250-500 мг/л та інші), які будуть інгібувати ферменти, що окислюють феноли. Продукти окислення фенолів токсичні і пригнічують поділ клітин експлантата.

При отриманні первинного калюсу експлантати краще культивувати на кількох середовищах з різним співвідношенням ауксинів:цитокінінів. Успіх отримання калюсу у значній мірі залежить від підбору регуляторів росту, індукторів клітинного поділу.

Із ауксинів найчастіше використовують 2,4-дихлорфеноксоцтову кислоту (2,4-Д) або індоліл-3-оцтова кислота (ІОК), яка має меншу активність. Для індукції калюсогенезу співвідношення ауксинів до цитокінінів у живильному середовищі повинно бути 10:1.

Консистенція калюсу залежить, в значній мірі, від складу середовища: на середовищах з ауксинами, особливо з 2,4-Д, калюси стають пухкішими. Із пухких калюсів дуже легко отримати суспензійну культуру при розміщенні їх у рідке середовище. Із компактних калюсів можна отримати пухкі, але не навпаки. Найбільша здатність до морфогенезу характерна для компактних калюсів, які повільно ростуть.

Пухкі і щільні калюси відрізняються анатомічно: щільні калюси менш диференційовані, містять багато вакуолізованих клітин, які щільно упаковані. Крім цього у щільних калюсів загальна кількість полісахаридів клітинної стінки

вища, але вміст целюлози порівнюючи з пектиновими речовинами і геміцелюлозами занижений.

Калюсні тканини використовують для збереження у ростучому стані колекцій різних штамів, ліній, мутантів, із них отримують клітинні суспензії, які культивують в рідкому живильному середовищі, для регенерації рослин.

Культура клітинних суспензій

Культура клітинних суспензій або суспензійна культура – вирощування окремих або невеликих агрегатів у завислому (суспендованому) стані в рідкому середовищі при використанні апаратури, яка забезпечує їх аерацію і перемішування.

Клітинну суспензію отримують з шматочка калюсу в рідкому середовищі, яке перемішується. Для ініціації суспензійної культури необхідно 2-3 г свіжої калюсної маси на 60-100 мл рідкого живильного середовища. Первинну суспензію отримують на коловому шейкері зі швидкістю перемішування 100-120 об/хв.

Для отримання високо диспергованої суспензійної культури велике значення має тип вихідної калюсної тканини. Оптимальною є калюсна тканина пухкого типу, яка легко розсипається при внесенні в рідке середовище, що перемішується. Для цього калюс вирощують на середовищі з високою концентрацією ауксинів і зменшеною концентрацією або без цитокінінів і без іонів Ca^{2+} . Додавання в середовище фермента пектинази, який руйнує пектат кальцію, що склеює окремі клітини, полегшує отримання суспензії.

Необхідною умовою культивування клітинних суспензій є постійне перемішування середовища. Якщо клітинна суспензія перебуває в нерухомому стані, то ділення суспензійних клітин призводить до утворення калюсної тканини.

Первинну суспензійну культуру перед субкультивуванням фільтрують через 1-2 шари марлі, нейлонові або металічні сита, щоб позбутися від великих і щільних шматків калюсної тканини і крупних агрегатів.

Звичайно пасаж культивування клітинної суспензії становить 14-16 днів. За цей час щільність зростає від $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ кл/мл.

Якість суспензії залежить від ступеня агрегованості її клітин. Агрегати не повинні містити більше 10-12 клітин. Для видалення крупних агрегатів суспензії фільтрують через марлеві, нейлонові або металеві фільтри. Водночас це дозволяє позбутися від залишків експлантата або щільних шматків калюсної тканини.

Культивування ізольованих клітин

Для генетичних і фізіологічних досліджень, а також для практичного використання в клітинній селекції використовують ізольовані клітини.

Отримання одноклітинних клонів рослин складається з двох етапів:

1. виділення одиночних життєздатних клітин;
2. створення сприятливих умов для їх поділу і росту.

Для виділення життєздатних культур використовують такі методи:

1. вирощування калюсної маси і отримання із неї суспензії;
2. слабо агреговані суспензії;
3. виділення окремих клітин із тканин цілої рослини.

Отримання клітин із суспензійних культур пов'язане з меншим ризиком пошкодження порівняно з виділенням безпосередньо із органів рослини. Для отримання одноклітинної фракції суспензійної культури іноді достатньо простого відстоювання у колбі протягом 15-30 хв. При цьому крупні агрегати осідають на дно колби, а надосадова фракція містить тільки одинокі клітини або дрібні агрегати. Якщо при відстоюванні не вдається отримати одноклітинну фракцію, то застосовують ферменти для мацерації, центрифугування в градієнті сахарози або фільтрування через сита (нейлонові або металеві).

Труднощі культивування одиночних клітин пов'язані з тим, що окрема клітина не ділиться в тих умовах, в яких добре росте калюсна тканина. Для того, щоб змусити одиночні клітини ділитися, розроблені спеціальні методи:

1. метод культури «няньки»;
2. метод мікрокультури або висячих крапель;
3. метод плейтінга.

Метод культури «няньки» запропонував Джонсон у 1960 році. Функцію «няньки», яка стимулює поділ одиночної клітини, виконують шматочки калюсної тканини, відокремлені від неї фільтрувальним папером. У присутності «няньки» одиночна клітина ділиться і дає індивідуальну колонію клітин – клон (рис. 7).

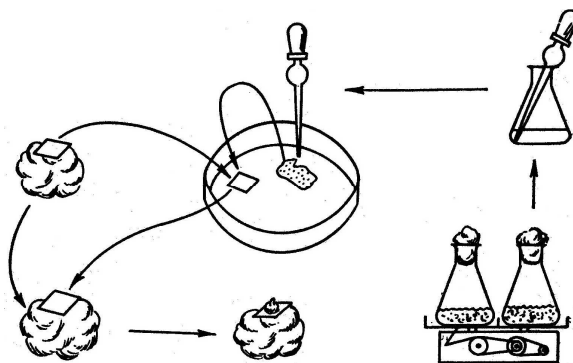


Рис.7. Метод культури «няньки» для вирощування культури із одиночної клітини.

Метод мікрокультури базується на використанні дуже малих об'ємів багатого живильного середовища і являє собою культивування одиночних клітин в мікрокраплі в чашці Купрака об'ємом 20 мл. Метод запропонував академік Глеба Ю.Ю. У мікрокраплях зручно спостерігати за отриманням і діленням клітин при соматичній гібридизації.

Метод плейтінга передбачає змішування клітин суспензії з розплавленим та охолодженим до 35°-40°C середовищем і розлив тонким шаром (1 мм) у чашки Петрі. Цей метод був розроблений Бергманом у 1960 році. Цей метод використовують для отримання одноклітинних клонів та оцінки життєздатності клітин.

Використання культури «няньки», мінімального об'єму середовища, в якому культивується окрема клітина, пов'язані з феноменом, який називають «дія фактора кондиціонування». Незважаючи на численні спроби визначити хімічну природу речовин (або речовини), які індукують ділення одиночної клітини, і механізм дії фактора кондиціонування, ця проблема залишається не

вирішеною. Дослідження показали, що цей фактор хімічної природи і включає низькомолекулярні речовини (~700 Д).

Методи оцінки результатів

Для характеристики росту культур *in vitro* в першу чергу визначають збільшення сирі маси ($W_t - W_0$). Результати можуть бути виражені відносно вихідної маси $\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0}$. Це дозволяє встановити у скільки разів збільшилася

маса протягом досліду. Величину приросту маси можна виразити у відсотках $\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot 100\%$. Якщо тривалість росту в окремих випадках неоднакова,

необхідно ввести у формулу фактор часу $\Delta W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \cdot \frac{1}{t}$.

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

Більше інформації про характер росту культури отримують при визначенні числа клітин на одиницю маси тканини. Підрахунок клітин дозволяє визначити збільшення маси тканини відбувається за рахунок поділу клітин чи їх росту. Це дає можливість розрахувати і середню вагу клітини. Кількість клітин визначають за методом розробленим Брауном, який полягає у мацерації і послідовному підрахунку краплі суспензії клітин у лічильній камері під мікроскопом (рис. 8).

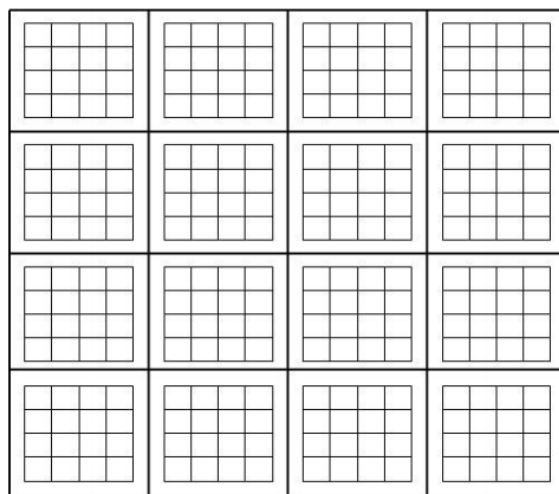


Рис. 8. Сітка лічильної камери Фукса-Розенталя

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

Кількість клітин в 1 г калюсної тканини обчислюють за формулою:

$$N = \frac{N \cdot V \cdot 10^3}{d \cdot 0,2}, \text{ де}$$

N – кількість клітин в 1 г тканини;

n – кількість клітин в одному великому квадраті;

d – наважка, г;

0,2 – об'єм камери;

10 – перерахунок;

V – об'єм суспензії, мл.

Для суспензійних культур визначають об'єм ущільнених клітин. Для цього в градуйовані центрифужні пробірки переносять певний об'єм суспензії (15-30 мл) і центрифугують при 1500g 10 хв або суспензію поміщають в градуйований циліндр і відстоюють впродовж доби. Об'єм ущільнених клітин виражають в мл клітинного осаду на мл культури.

Розмір клітин визначають вимірюючи їхню довжину та ширину під мікроскопом за допомогою шкали окуляр-мікрометра та об'єкт мікрометра.

Контрольні питання

1. Що таке калюс?
2. Які зміни відбуваються у спеціалізованій клітині при переході до дедиференціації?
3. Із яких органів рослини можна отримати калюсну тканину?
4. Яка основна особливість середовища для калюсогенезу у злаків?
5. Назвіть типи калюсної тканини.
6. Яке практичне використання пухких калюсів?
7. Який тип калюсної тканини Ви б використали для отримання рослин-регенерантів?

8. Наведіть приклади можливого використання калюсної тканини.
9. Що таке клітинна суспензія та яке її практичне значення?
10. Калюсній тканині якого типу надається перевага для отримання клітинної суспензії?
11. Назвіть методи культивування одиночних клітин.
12. Які показники визначають для оцінки росту суспензійної культури?

Лабораторна робота 10

Особливості культивування клітинних суспензій

Клітинні суспензії характеризуються низкою ознак: життєздатністю, щільністю клітин, ступенем агрегації, швидкістю росту. Життєздатність клітин визначають за допомогою барвників, зокрема метиленової сині або синій Еванса. На живі клітини барвники не діють, внаслідок непроникності клітинних мембран, а мертві клітини стають легкопроникними і забарвлюються в синій колір. Одним із основних показників стану клітинної суспензії є щільність клітинної популяції. Число клітин визначають у лічильних камерах Фукса-Розенталя або Горяєва під мікроскопом після мацерації суспензійної культури 10-20% розчином хромової кислоти, під впливом якої відбувається гідроліз серединних пластинок, що з'єднують клітини.

Клітинна суспензія, як і калюсна культура має S-подібну криву росту. Зазвичай тривалість пасажу становить 14-16 днів. При цьому щільність клітинної популяції зростає від 5×10^4 до 5×10^6 кл/мл. Суспензію для субкультивування беруть наприкінці експоненціальної фази. Основними критеріями росту суспензійних культур є збільшення числа клітин, їх сирої і сухої маси.

Якість суспензії залежить від ступеня агрегації клітин, згідно якого виділяють:

- дрібноагреговану суспензійну культуру, яка складається з поодиноких клітин (40%) і дрібних агрегатів (60%, що містять не більше 10-12 клітин);
- середньоагреговану суспензійну культуру до складу якої входять 40% одиночних клітин, 40% дрібних агрегатів і 20% великих агрегатів, що містять більше 12 клітин
- крупноагреговану суспензійну культуру, яка складається із дрібних (40%) і великих (60%) агрегатів. Для позбавлення від великих агрегатів, суспензії фільтрують (фракціонують) через марлеві, нейлонові або металеві фільтри. Водночас це дозволяє звільнитись від залишків експлантату або щільних шматочків калюсної тканини. Основними ознаками суспензійної культури є високий ступінь дезагрегації (5-10 клітин у групі), морфологічна

однорідність клітин (невеликі розміри, сферична або овальна форма, щільна цитоплазма) і відсутність диференціації (зокрема, трахеєподібних елементів).

Для вирощування клітинних суспензій використовують переважно живильні середовища для культивування калюсних культур. Найбільш поширеними способами вирощування клітинних суспензій є:

1. Вирощування калюсу на містках-підтримках із фільтрувального паперу.
2. Накопичувальне культивування – культура клітин, занурених в рідке живильне середовище на качалках ротаційного або шейкерного типу.
3. Безперервне культивування – вирощування клітин в рідкому поживному середовищі в культиваторах і ферментерах, шляхом барботажу в поєднанні з механічним переміщенням.

Індекс зростання (I) є найпростішим показником ростових процесів культур клітин та тканин, який визначають за формулою:

$$I = (x_t - x_0) / x_0,$$

де x_0 - початкове значення параметра зростання культури (маса, кількість клітин); x_t – значення параметра зростання наприкінці циклу вирощування.

Величини індексу зростання культур рослинних клітин зазвичай лежать у межах 5-15. Для однієї й тієї культури значення індексу зростання може різнитися залежно від обраного критерію (сира/суха маса).

Основним недоліком використання індексу зростання для характеристики ростових процесів є його залежність від рівня початкової біомаси інокулюма/транспланта. Відомо, що максимальний рівень накопичення біомаси визначається в основному кількістю вуглеводного субстрату в середовищі, але не початковою щільністю культури, яка впливає на тривалість лаг-фази ростового циклу. Таким чином, при високій початковій щільності клітин можна отримати дуже низький індекс зростання, незважаючи на те, що інші ростові характеристики (наприклад, питома швидкість росту) будуть дуже високими. Отже, індекс зростання є об'єктивним критерієм зростання лише за вирівняної початкової щільності культур.

Питома швидкість зростання (μ) – основний параметр, що характеризує зростання культури під час фази експоненційного чи логарифмічного зростання, протягом якої зростання культури підпорядковується наступному закону:

$$x = x_0 e^{\mu t}.$$

Для розрахунку питомої швидкості зростання можна використовувати два способи – графічний та аналітичний. Графічний спосіб дозволяє визначити μ_{\max} в експоненційній фазі зростання. Аналітичним способом можна визначити питому швидкість зростання у будь-якій фазі зростання за формулою:

$$\mu = (\ln x_2 - \ln x_1) / (t_2 - t_1),$$

де x_1 і x_2 – значення критерію зростання (сира і суха маса, концентрація клітин) в моменти часу t_1 і t_2 відповідно.

При цьому у всіх фазах зростання μ_x буде менше μ_{\max} , у стаціонарній фазі μ_x дорівнюватиме нулю, а у фазі деградації – мати негативне значення. Питома швидкість зростання вимірюється в одиницях, обернених часу ($1/t$). Цей параметр аналогічний до складних відсотків. Наприклад, питома швидкість зростання $0,1 \text{ сут}^{-1}$ означає приріст біомаси складає 10% за добу.

Для більшості культур значення μ_{\max} знаходиться в межах $0,1-0,4 \text{ діб}^{-1}$. Якщо μ_{\max} менше $0,1 \text{ сут}^{-1}$, необхідно проводити роботу з оптимізації зростання культури клітин, інакше використовувати цю культуру щодо експериментів навряд чи доцільно. При питомій швидкості зростання вище $0,4 \text{ діб}^{-1}$ (максимальне значення, відоме за даними літератури, знаходиться в межах $0,5-0,6 \text{ діб}^{-1}$) можна вважати, що культура дуже добре росте. Слід врахувати, що μ_{\max} зазвичай буває різною для різних ростових критеріїв.

Час подвоєння біомаси (τ) розраховують за формулою

$$\tau = \ln 2 / \mu \approx 0,692 / \mu.$$

Час подвоєння біомаси однозначно визначається питомою швидкістю зростання культури. Наприклад, при питомій швидкості зростання, що дорівнює $0,1 \text{ діб}^{-1}$, час подвоєння біомаси становить близько 7 діб.

Економічний коефіцієнт або вихід біомаси (Y) визначається з рівняння

$$Y = \Delta m / \Delta s,$$

де Δm – збільшення біомаси, що відповідає споживанню субстрату у кількості Δs .

Фізіологічний сенс економічного коефіцієнта у тому, що він свідчить про співвідношення енергетичного і пластичного метаболізму клітин чи ефективність використання вуглеводного субстрату середовища для будови біомаси клітин. Коли концентрація біомаси досягає свого максимуму, зазвичай субстрат середовища (сахароза чи інше джерело вуглецю) поглинається клітинами повністю; у цьому випадку економічний коефіцієнт можна з достатньою точністю визначити як

$$Y = (m_{\max} - m_0) / s_0.$$

Наприклад, при початковій концентрації сахарози в середовищі 3% (30 г/л середовища) та початковій біомасі культури 1 г/л (по сухій біомасі) в кінці вирощування отримали 11 г сухої біомаси, тоді економічний коефіцієнт Y становить $(11-1)/30=1/3=0,33$. Це означає, що третину субстрату клітини використовують на побудову біомаси (пластичний метаболізм), а дві третини – на енергетичний метаболізм (дихання).

Економічний коефіцієнт Y зазвичай знаходиться в межах від 0,2 до 0,5. Нижчі значення економічного коефіцієнта свідчать про менш ефективне використання культурою субстрату, а при значенні Y менше 0,15-0,20 необхідно оптимізувати умови вирощування культури.

Для проведення біотехнологічних досліджень доцільно визначення такого параметра, як продуктивність біомаси (P), що має розмірність г/л за добу.

$$P = (x_1 - x_0) / (t_1 - t_0),$$

де x_0 і x_1 – кількість сухої біомаси на початку культивування і момент часу t_1 , для якого відзначається максимальне накопичення біомаси культури.

Для суспензійних культур як параметр росту іноді використовують осаджений об'єм клітин або упакований об'єм клітин, який є відношенням обсягу суспензії після відстоювання або центрифугування до загального обсягу проби. Перевагою цього критерію є простота визначення. Недоліком – низька точність

методу та, як наслідок, невисока відтворюваність. Критерій можна використовувати лише для орієнтовного дослідження чи моніторингу.

Найбільш повне та досить точне визначення ростових характеристик можливе для суспензійної культури клітин. Для цього в процесі культивування щодня в той самий час (особливо це важливо в початкових фазах зростання) або через день відбирають з колб проби для аналізу.

На підставі даних щодо динаміки зміни сухої біомаси клітин різних суспензійних культур протягом ростового циклу та кривих зростання в напівлогарифмічному масштабі роблять розрахунок показників зростання: індекс зростання, питома швидкість зростання в експоненційну фазу, час подвоєння біомаси, економічний коефіцієнт, продуктивність біомаси.

Варіант завдання наведено у таблицю 4.

Таблиця 4

**Динаміка зміни сухої маси клітин суспензійної культури протягом
ростового циклу**

Время, сут	0	2	4	6	8	10	12	14
Сухая масса (m), г	1,80	2,14	3,54	6,98	12,48	16,81	18,00	17,10
$\ln m$, г	0,59	0,76	1,26	1,94	2,52	2,82	2,89	2,84

Результати розрахунків заносять до таблиці 5.

Таблиця 5

Показники зростання суспензійної культури

Вариант	I	μ , сут ⁻¹	τ , сут	Y	P , г/л · сут

Контрольні питання

1. У яких одиницях вимірюються індекс зростання, питома швидкість зростання, час подвоєння біомаси, економічний коефіцієнт, продуктивність по біомасі?

2. Вкажіть умову, за якої індекс росту можна використовувати для порівняння ростового потенціалу різних культур клітин.

3. За допомогою якого рівняння описується зростання культури клітин у фазу експоненційного росту? Що таке питома швидкість зростання культури?

4. Вкажіть перевагу, яка дає побудову кривої зростання в напівлогарифмічній системі координат, а також використання нормованого значення ростового критерію.

5. Опишіть способи визначення питомої швидкості зростання культури.

6. У яких межах зазвичай варіює питома швидкість росту культур клітин? Які її максимальні значення? У якому разі потрібна оптимізація зростання культури?

7. Як визначається час подвоєння біомаси?

8. У чому полягає фізіологічний зміст такого показника, як економічний коефіцієнт?

9. Вкажіть межі звичайного варіювання економічного коефіцієнта. У якому разі потрібна оптимізація зростання культури?

10. Яким чином розраховується продуктивність з біомаси культури?

11. У чому відмінність величини обложеного об'єму клітин від упакованого об'єму клітин? Які переваги та недоліки використання даних параметрів для характеристики зростання суспензійних культур?

12. Які особливості отримання даних для побудови кривих зростання суспензійних та калусних культур?

13. Яка тривалість окремих фаз ростового циклу культур клітин?

14. Як можна пояснити наявність «сходінки» в експоненційну фазу зростання для окремих культур клітин?

Лабораторна робота 11

Визначення життєздатності клітин суспензійних культур

При роботі з культурами рослинних клітин необхідно контролювати їхню життєздатність, особливо при зміні параметрів культивування. Частка життєздатних клітин у культурі має бути не менше 60%, для добре зростаючих культур – 80-90%. Життєздатність клітин зазвичай змінюється у циклі вирощування, суттєво знижуючись при переході у фазу деградації. При життєздатності клітин у популяції менше 50% використовувати культуру для експериментів недоцільно. В цьому випадку необхідно проводити роботи з оптимізації умов її вирощування.

Відомий ряд методів, що дозволяють визначити життєздатність клітин рослин. Цитологічні методи базуються головним чином оцінці нативності і проникності плазматичної мембрани. Існує група методів, які ґрунтуються на визначенні активності ферментів як показника метаболічної активності і, отже, життєздатності клітин.

Для визначення життєздатності клітин широко використовуються прижиттєві барвники. За оптичними властивостями розрізняють вітальні барвники для світла і флуоресцентні барвники – флуорохроми.

За хімічними властивостями виділяють основні, кислотні та електронейтральні вітальні барвники.

Як агент, що вибірково фарбує живі клітини, виступає нейтральний червоний – ліпофільний феназиновий барвник. Це кислотно-основний індикатор, який у кислому середовищі має інтенсивно червоний колір, а в лужному – блідо-жовтий. Інтервал рН переходу 6,8–8,0 (зміна забарвлення розчину: червоне → жовте).

Життєздатні рослинні клітини характеризуються наявністю градієнта рН між вакуолею та цитоплазмою. Вміст вакуолі має кислу реакцію (рН 5,5 або нижче). У життєздатних клітинах рослин, поміщених у слабколужний розчин, нейтральний червоний легко проходить через мембрани в непротонованій формі, приєднує протон у кислому середовищі та накопичується у вакуолях, набуваючи червоного забарвлення. У клітинах, що зберігають інтактність тонопласту та плазмалемі, нейтральний червоний в іонізованій формі не здатний вільно

дифундувати назад у зовнішній розчин. При нетривалому стані клітин у розчині нейтрального червоного цитоплазма не відмирає, у чому можна переконатися, викликавши плазмоліз забарвлених клітин (плазмолізуватися можуть лише живі клітини). У мертвих клітинах через порушення бар'єрних властивостей плазмалеми та тонопласту барвник не може акумулюватися у вакуолі, тому пошкоджені клітини мають блідо-оранжеве забарвлення аналогічно фону середовища. Життєздатність культури за допомогою нейтрального червоного визначають як відношення кількості пофарбованих клітин до їх загальної кількості в певному обсязі суспензії.

Для виявлення мертвих або пошкоджених клітин найчастіше використовується діазобарвник Еванс синій. Плазматична мембрана живих клітин не пропускає великих аніонів барвника, і клітини залишаються незабарвленими. Отже, в цьому випадку на відміну від методу, заснованого на використанні нейтрального червоного, незабарвлені клітини життєздатні і по відношенню до загального числа клітин можна судити про життєздатність суспензійної культури. Суспензія вважається життєздатною, якщо більше 70% клітин не забарвлюються у синій колір; агрегат життєздатний, якщо понад 50% його клітин не забарвилися. Подібним чином такі прижиттєві барвники, як метиленовий синій, індиго-кармін, кислий фуксин, еозин через оболонки живих клітин в цитоплазму не проникають, тоді як легко фарбують цитоплазму мертвих клітин.

Для кількісного визначення життєздатності можна використовувати речовини, що беруть участь у метаболізмі клітин. Метод визначення життєздатності клітинних культур за допомогою флуоресцеїндіацетату ґрунтується на тому, що його молекули легко проходять через плазматичну мембрану, але тільки в живих клітинах розщеплюються естеразами.

Розщеплення призводить до утворення флуоресцеїну, який затримується у клітинах з інтактними мембранами. При освітленні УФ світлом живі клітини можна візуально розрізнити за допомогою флуоресцентного мікроскопа по зеленому світінню.

Фарбування солями тетразолію дозволяє визначити інтенсивність дихання клітин. Метод визначення життєздатності клітинних культур за допомогою хлористого 2,3,5-трифенілтетразолію (ТТХ) полягає в тому, що окислювально-відновлювальні ферменти (дегідрогенази) живих клітин незворотно відновлюють безбарвний розчин ТТХ у забарвлену (червоний колір) речовину – 1,3,5-трифенілформаза, кількість якого пропорційна активності ферментів. Метод оцінки життєздатності клітин за допомогою ТТХ отримав назву тетразолієвого тесту.

Слід зазначити, що результати оцінки життєздатності клітин різними методами можуть не збігатися, оскільки різні методичні підходи дозволяють виміряти різні параметри. Наприклад, у разі флуоресцеїндіацетату – активність естераз, а у разі солей тетразолію – активність дегідрогеназ.

Провести порівняльний аналіз методів визначення життєздатності рослинних клітин.

Для визначення життєздатності клітин суспензії використовують барвники – синій Еванса, нейтральний червоний, ТТХ, флуоресцеїн діацетат. Застосовують суспензійні культури, що відрізняються за фізіологічним станом (у лог-фазі ростового циклу, стаціонарній фазі, фазі деградації).

В чашку Петрі переносять 1 мл суспензії і додають 1-2 краплі барвника синій Еванса, поміщають під мікроскоп і при невеликому збільшенні (x30) підраховують кількість живих незабарвлених клітин (вибірковість мембрани живих клітин) у полі зору мікроскопу. Дослідження життєздатності клітин іншими методами здійснюють відповідно до пропонованих методік.

На підставі отриманих даних заповнюють таблицю 6.

Таблиця 6

Методи визначення життєздатності рослинних клітин

Використовуваний агент	Життєздатні клітини		Мертві клітини	
	Накопичення*	Фарбування*	Накопичення*	Фарбування*
	*	*	*	*

Нейтральний червоний				
Еванса синій				
Флуоресцеїн - діацетат				
ТТХ				

* – знаком «+» відзначають здатність використовуваного агента чи препарату реакції акумулюватися у клітинах, «-» - Відсутність здатності проникати і накопичуватися в клітинах.

** – знаком «+» відзначають зміну забарвлення, вказують колір, а також назву продукту реакції, що обумовлює фарбування, «-» - відсутність фарбування.

Аналогічні таблиці заповнюють для суспензійних культур для кожної фази ростового циклу. Здійснити порівняння отриманих результатів та висновки щодо ефективності обраних методів.

Контрольні питання

1. Які підходи використовують для визначення життєздатності рослинних клітин?
2. Перерахуйте типи прижиттєвих барвників, наведіть приклади.
3. Якими властивостями характеризується нейтральний червоний у кислому та лужному середовищах?
4. На чому заснований метод визначення життєздатності клітин за допомогою нейтрального червоного?
5. У чому полягає принцип методу визначення життєздатності клітин за допомогою Еванса синього?
6. Опишіть принцип методу визначення життєздатності клітин на основі використання флуоресцеїндіацетату.
7. На чому заснований тетразолієвий тест визначення життєздатності клітин?
8. Чому для коректної оцінки життєздатності клітин доцільно використання кількох методів?

9. Яким чином визначення електропровідності інкубаційного середовища може свідчити про життєздатність клітин?

Лабораторна робота 12

Методи клонального розмноження рослин

Досягнення галузі культури клітин і тканин призвели до створення принципово нового методу вегетативного розмноження – клонального мікророзмноження. Клональне мікророзмноження – отримання *in vitro*, нестатевим шляхом, генетично ідентичних вихідному екземпляру рослин. В основі методу лежить унікальна здатність рослинної клітини реалізовувати властиву їй тотипотентність.

Порівняно із традиційними способами вегетативного розмноження, метод клонального мікророзмноження має ряд переваг, а саме:

- забезпечує одержання генетично однорідного посадкового матеріалу, одержання безвірусних рослин;
- високий коефіцієнт розмноження (10^5 – 10^6 – для трав'янистих і квіткових рослин, 10^4 – 10^5 – для чагарникових, деревних, 10^4 – для хвойних);
- скорочення тривалості селекційного процесу;
- прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
- розмноження рослин, які не дають життєздатного насіння;
- можливість проведення робіт протягом року та економію площ, необхідних для вирощування посадкового матеріалу;
- автоматизацію процесу вирощування.

На ефективність мікроклонального розмноження впливають: фізіологічні особливості рослини, що вводиться в культуру, хімічні та фізичні умови культивування. Найбільш важливим моментом є вибір материнської рослини та експланту.

Успіх введення у культуру часто визначається ефективністю стерилізації. Вибір стерилізуючого агента визначається особливостями експланту. Для ніжних тканин концентрація стерилізуючого агента повинна бути знижена, щоб зберегти життєздатність експланту. Часто внутрішнє зараження вихідних експлантів буває набагато сильнішим, ніж поверхнєве, тому експланти попередньо обробляють фунгіцидами та антибіотиками проти грибною та

бактеріальної інфекцій. Хороші результати дає обробка рослин натрію бензоатом.

Склад живильного середовища необхідно підбирати для кожного виду рослин. На клональне мікророзмноження впливають гормони, мінеральні солі, вітаміни та вуглеводи.

До фізичних факторів вирощування відносяться температура та умови освітлення. На перших двох етапах освітленість коливається від 1000 до 3000 Лк, фотоперіод 14-16 годин, але ці параметри залежать від культури. Висока інтенсивність світла може викликати хлорози і затримувати розвиток, але при перенесенні в ґрунт ці рослини почуваються краще і енергійніше ростуть. Спектральний склад також відіграє важливу роль. Деякі дослідники вказують на синє світло як основний компонент морфогенезу. Червоне світло стимулює утворення нирок у тютюну, у салату – утворення пагонів, у берези – укорінення, синє світло посилює закладку вегетативних нирок у пагонів тютюну в умовах *in vitro*, а червоний стимулює розвиток квіткових нирок. Важливе значення має також поєднання спектрального складу світла та гормональних факторів середовища. Температура культивування зазвичай варіює в інтервалі 22-26°C вдень та 18-22°C вночі. У деяких випадках зниження температури призводить до підвищення ефективності розмноження. Для підвищення коефіцієнта розмноження необхідно кожному виду з урахуванням його природного ареалу зростання підбирати індивідуальні умови культивування. Відносна вологість повітря – 65-70%.

Етапи клонального мікророзмноження.

1. Вибір рослини-донора, ізолювання експлантів та отримання добре зростаючої стерильної культури.
2. Власне мікророзмноження, коли досягається отримання максимальної кількості клонів меристематичних.
3. Укорінення розмножених пагонів з подальшою адаптацією їх до ґрунтових умов, а при необхідності депонування рослин-регенерантів за зниженої температури (+2°C, +10°C).

4. Вирощування рослин в умовах теплиці та підготовка їх до реалізації або посадки в полі.

Для культивування тканин кожному з чотирьох етапів потрібно застосування певного складу живильного середовища.

На першому етапі необхідно домогтися отримання стерильної культури, що добре росте. Якщо важко отримати вихідну стерильну культуру експланту, рекомендується вводити до складу живильного середовища антибіотики (тетрациклін, бензилпеніцилін та ін.) у концентрації 100-200 мг/л. Це насамперед відноситься до деревних рослин, у яких спостерігається тенденція до накопичення внутрішньої інфекції.

На першому етапі використовують середовище, що містить мінеральні солі за рецептом Мурасіга і Скуга, а також різні біологічно активні речовини та стимулятори росту (ауксини, цитокініни) в різних поєднаннях залежно від об'єкта. токсичних речовин, використовуються антиоксиданти (омивання протягом 4-24 годин, або додавання в живильне середовище. В якості антиоксидантів використовують: аскорбінову кислоту (1мг/л), глутатіон (4-5 мг/л), дитіотріетол (1-3 мг/ л), діетилдітіокарбомат (2-5 мг/л), полівінілпіролідон (5000-10000 мг/л).

Тривалість першого етапу може коливатися від 1 до 2 місяців, в результаті якого спостерігається зростання меристематичних тканин та формування первинних пагонів.

Другий етап – власне мікророзмноження. На цьому етапі необхідно досягти максимальної кількості мериклонів, враховуючи при цьому, що зі збільшенням субкультивувань збільшується кількість рослин-регенерантів з ненормальною морфологією і можливо спостерігати утворення рослин-мутантів. Використовують живильне середовище за рецептом Мурасіга та Скуга, що містить різні біологічно активні речовини, а також регулятори росту. Основну роль при доборі оптимальних умов культивування експлантів відіграють співвідношення та концентрація внесених у живильне середовище цитокінінів та

ауксинів. З цитокинінів найчастіше використовують БАП у концентраціях від 1 до 10 мг/л, та якщо з ауксинов—ИУК і НУК у концентраціях до 0,5 мг/л.

Третій і четвертий етапи - укорінення мікропагонів, їх подальша адаптація до ґрунтових умов і висаджування в полі є найбільш трудомісткими етапами, від яких успіх клонального мікророзмноження залежить. На третьому етапі, як правило, змінюють основний склад середовища: зменшують у два, а іноді й у чотири рази концентрацію мінеральних солей за рецептом Мурасига та Скуга або замінюють її середовищем Уайта, зменшують кількість цукру до 0,5-1% і повністю виключають цитокиніни, залишаючи лише ауксин. Як стимулятор коренеутворення використовують β -індоліл-3-масляну кислоту (ІМК), ІУК або НУК.

Укорінення мікропагонів проводять двома способами:

1. Витримування мікропагонів протягом кількох годин (2-24 години) у стерильному концентрованому розчині ауксину (20-50 мг/л) і подальше їх культивування на агаризованому середовищі без гормонів або безпосередньо у відповідному ґрунтовому субстраті (імпульсна обробка).

2. Безпосереднє культивування мікропагонів протягом 3-4 тижнів на живильному середовищі, що містить ауксин у невисоких концентраціях (1-5 мг/л залежно від об'єкта, що досліджується). Останнім часом запропоновано метод укорінення пробіркових рослин в умовах гідропоніки.

Пересадка рослин-регенерантів у субстрат є відповідальним етапом, що завершує процес клонального мікророзмноження. Найбільш сприятливий час для пересадки пробіркових рослин – весна чи початок літа.

Рослини з двома-трьома листям і добре розвиненою кореневою системою обережно виймають із колб або пробірок пінцетом з довгими кінцями або спеціальним гачком. Коріння відмивають від залишків агару і висаджують у ґрунтовий субстрат, попередньо простерилізований при 85-90° С протягом 1-2 год. Для більшості рослин як субстрати використовують торф, пісок (3:1); торф, дерновий ґрунт, перліт (1:1:1); торф, пісок, перліт (1:1:1). Виняток становлять

сімейство орхідних, для яких готують субстрат, що складається із сфагнового моху, суміші торфу, листя бука, або дуба, соснової кори (1:1:1).

Приготовленим заздалегідь ґрунтовим субстратом заповнюють пікірувальні ящики або торф'яні горщики, в яких вирощують рослини-регенеранти. Горщики з рослинами поміщають у теплиці з регульованим температурним режимом (20-22°C), освітленістю не більше 5 тис. Лк і вологістю 65-90%. Для кращого зростання рослин створюють умови штучного туману. У випадках, коли немає можливості створити такі умови, горщики з рослинами накривають скляними банками або поліетиленовими пакетами, які поступово відкривають до повної адаптації рослин.

Через 20-30 днів після посадки рослини, що добре укорінилися, підгодовують розчинами мінеральних солей Кнудсона, Мурасига і Скуга, Чеснокова, Кнопа (залежно від виду рослин) або комплексним мінеральним добривом. У міру зростання рослин їх розсаджують у великі ємності зі свіжим субстратом. Подальше вирощування акліматизованих рослин відповідає прийнятій агротехніці вирощування кожному за індивідуального виду рослин.

Процес адаптації пробіркових рослин до ґрунтових умов є найбільш дорогою та трудомісткою операцією. Нерідко після пересадки рослин у ґрунт спостерігається зупинка у рості, опадіння листя та загибель рослин. Ці явища пов'язані, насамперед, про те, що з пробіркових рослин порушена діяльність устьичного апарату, унаслідок чого відбувається втрата великої кількості води. По-друге, у деяких рослин в умовах *in vitro* не відбувається утворення кореневих волосків, що призводить, у свою чергу, до порушення поглинання води та мінеральних солей із ґрунту. Тому доцільно на третьому чи четвертому етапах клонального мікророзмноження застосовувати штучну мікорізацію рослин (для мікотрофних), враховуючи їхню позитивну роль у постачанні рослин мінеральними та органічними поживними речовинами, водою, біологічно активними речовинами, а також у захисті рослин від патогенів.

Контрольні питання

1. Дати визначення терміну «клональне мікророзмноження». Які переваги характерні для даного методу, порівняно із традиційними методами розмноження рослин?
2. Ким, коли і на якому об'єкті, вперше започатковано роботи з клонального мікророзмноження рослин?
3. Охарактеризуйте основні етапи клонального мікророзмноження рослин.
4. Які можливості дає метод термотерапії і на чому він заснований?
5. Що таке хемотерапія та її застосування.
6. Дати перелік методів *in vitro*, які використовуються для селекції рослин.
7. Що таке ембріокультура і для чого вона використовується?
8. Назвіть способи одержання гаплоїдів в умовах *in vitro*.
9. Які методичні прийоми використовують при проведенні клітинної селекції?
10. Які умови необхідно створити для одержання стабільно стійких ліній клітинних культур?
11. Назвіть переваги клітинної селекції в умовах *in vitro*, порівняно з традиційними методами селекції.
12. Від яких чинників залежить мікроклональне розмноження?
13. Які фітогормони краще використовувати для розмноження рослин?
14. Які фізичні чинники впливають на успіх мікроклонального розмноження?

Історія культивування тваринних клітин

На початку 20 століття виникає низка напрямів у наукових дослідженнях, пов'язаних із можливістю виділення з організму тваринного ряду клітин, з метою їхнього подальшого культивування в умовах *in vitro*. Ідея культивування тварин клітин пройшла низку історичних етапів:

1 етап – визнання ідеї про можливість культивування тварин клітин в умовах *in vitro*.

2 етап – культивування тварин клітин як необхідного середовища для зростання і розмноження вірусів, що фільтруються, і практичне отримання значних кількостей вірусного матеріалу для потреб вірусології та практичної медицини.

3 етап – можливість впливу на геном тваринної клітини з метою отримання гібридних клітин з бажаними властивостями. Виникнення гібридомної технології та методу отримання моноклональних антитіл.

Для успішної реалізації методів клітинної інженерії необхідна суворона наукова база, заснована на низці поглядів та концепцій видатних вчених 19-20 ст. Основною концепцією, що знаходиться в основі клітинної інженерії, є теорія Клода Бернара «Про сталість внутрішніх умов клітини поза організмом», згідно з якою:

1.) Клітина поза організмом тварини прагнучим підтримувати свій внутрішній гомеостаз, поряд з живим організмом.

2.) Клітина поза організмом здатна до зростання і поділу, у разі подібності умов її існування всередині та поза організмом.

3.) Існує реальна можливість забезпечення тваринної клітини умовами її життєдіяльності, максимально наближених до умов *in vivo*. Це досягається шляхом ретельної розробки поживних середовищ; підбором ростових факторів; антибіотиків, що пригнічують зростання супутньої мікрофлори; умов вологості, газового складу та температури.

Основні історичні досягнення клітинної інженерії протягом 19-20 століття:

1885 У. Ру. Збереження в життєздатному стані оболонки курячого ембріона в теплому фізіологічному розчині.

1897 рік Підтримка в життєздатному стані клітин крові та сполучної тканини в пробірках із сироваткою та плазмою крові.

1898 Люнгрен. Підтримка експлантатів шкіри людини в життєздатному стані в кислому середовищі зі збереженням здатності до реімплантації.

1903 Джоллі. Робота з клітинами, що діляться у висячій краплі, що містить лейкоцити саламандри.

1906 Біб і Евінг. Роботи з пересадки лімфосаркомних тканин собаки.

1907 Росс Харрісон. Удосконалення методики «висячої краплі». Культивування шматочків тканини, відірваних від медулярної судини жаби, їх впровадження в лімфатичний тромб та культивування на нижній стороні покривного скла, розташованого над заглибленням у предметному склі. Вперше спостерігало зростання нервових клітин протягом кількох тижнів.

1911 Рід. Вирощування експлантів клітин кісткового мозку на середовищі спеціального хімічного складу.

1913 Алексис Каррель. Застосування плазми крові, збагаченої екстрактом ембріона, як основи для культивування тканин. Введення методів асептики у процедури культивування тканин. Досягнення явного успіху у пересадці клітин з використанням хірургічної техніки.

1928 Канті. Розробка методу кінофотомікрографії.

1937 Сіммс і Стилдман. Застосування трипсину для вивільнення клітин з тканинної матриці і пасивування клітин між культурами плазми.

1948 Ерл зі співр. Отримання клонів клітин із одиночної клітини

1952 Джей. Виділення лінії карциноми шийки матки, що перевивається, так звана лінія HeLa.

1955 Ігл. Систематичні дослідження харчових потреб клітин в умовах *in vitro*.

1961 Хейфлік і Мурхед. Виділення лінії диплоїдних клітин людини (ДКЛ) WI-38. Формування «Концепції межі Хейфліка» та розробки теорії феномена старіння

1975 Жорж Келер та Сезар Мільштейн розробили метод виробництва моноклональних антитіл.

Завдання

Підготувати презентацію та реферат за темою: «Історія створення культур клітин тварин»

Перелік літератури

1. Загальна біотехнологія : підручник / Пирог, Т. П., Ігнатова, О. А. – Київ : НУХТ, 2009. - 336 с.
2. Подгаєцький А. А., Мацкевич В. В., Подгаєцький А.Ан. Особливості мікроклонального розмноження видів рослин : монографія. – Біла Церква : БНАУ, 2018. – 209 с.
3. Biotechnological research in the creation and production of antirabic vaccines / Krasnopolsky Yu. M., Pylypenko D. M. // *Biotechnologia ACTA*. – 2021. – V. 14, No 4. – P. 28–37.
4. Licensed liposomal vaccines and adjuvants in the antigen delivery system / Krasnopolsky Yu., Pylypenko D. // *BioTechnologia – Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology*. – 2022. – V. 103(4). – P. 409-423.
5. Загальна цитологія і гістологія : підручник / за ред. М. Е. Дзержинського ; упорядкування Н. В. Скрипник – Київ : Видавничо-поліграфічний центр "Київський університет", 2010. – 575 с.
6. Ботаніка : курс лекцій / В.Г. Миколайчук. – Миколаїв : МНАУ, 2016. – 57 с. Методичне забезпечення
7. Фармацевтична біотехнологія: сьогодення та майбутнє : навчальний посібник для студентів біотехнологічних спеціальностей / Ю. М. Краснопольський, Д. М. Пилипенко. – Харків : НТУ ХПІ : ТОВ «Друкарня Мадрид», 2022. – 151 с.
8. Біотехнологія в рослинництві : курс лекцій / Т. М. Манушкіна. – Миколаїв : МНАУ, 2014. – 51 с.
10. Основи біотехнології рослин. Методичні рекомендації. / Манушкіна Т.М.– МНАУ, 2017. – 48 с.
11. Гарманчук Л. В. Методичні рекомендації до спецпрактикуму «Культура клітин та клонування». – Київ: 2012 – 51 с.
12. Основи генетичної та клітинної інженерії. Частина III. Застосування клітинних культур в біотехнології і вірусології: Методичні вказівки до виконання лабораторних робіт для студентів спеціальності 162 – Біотехнології та біоінженерія / Уклад.: Клечак І. Р., Трохименко О. П., Ліновицька В. М., Тітова Л. О. – Київ : КПІ імені Ігоря Сікорського, 2017. – 36 с.
13. Конспект лекцій з дисципліни “ Біотехнологія рослинних і тваринних клітин”. Для здобувачів другого магістрського рівня зі спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія, Укладачі: Корнієнко І. М. Кам’янське: ДДТУ, 2017. – 133с.

Навчальне видання

КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИННИХ КУЛЬТУР

Методичні рекомендації

Укладачі: **Юлевич** Олена Іванівна

Формат 60x84 1/16. Ум. друк. арк. 5,4.

Тираж 20 прим. Зам. № ____

Надруковано у видавничому відділі
Миколаївського національного аграрного університету
54020, м. Миколаїв, вул. Паризької Комуни, 9

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4490 від 20.02.2013 р.