



**Использование метода
культуры клеток, тканей и
органов растений для
сохранения генофонда**

Принципы криобиологии

- В настоящее время один из наиболее перспективных способов
- сохранения генофонда высших растений представляет с
- **культивирование *in vitro*** клеток, тканей и органов растений.

- **Для сохранения генофонда могут быть использованы:**
 - протопласты;
 - суспензионные культуры клеток;
 - каллусные культуры;
 - пыльца и пыльники;
 - культуры меристем побегов;
 - зародыши;
 - асептически выращиваемые целые растения.

- При работе с растущими коллекциями **необходимо стабильно поддерживать условия выращивания** (температуру, влажность, освещенность), **состав питательной среды** также не должен меняться.

- **Периодическое субкультивирование** **трудоемко** и значительно удорожает содержание коллекции.

- **Недостатки субкультивирования:**
 - - **возможны генетические изменения коллекционных объектов,**
 - - **снижение их способности к регенерации.**

- Сейчас достаточно интенсивно разрабатываются различные способы депонирования коллекций - приемы, позволяющие изменить кинетику роста культуры увеличить время между пересадками.

- **Депонирование коллекций** – сохранение коллекций без частых пересадок.

- Существует несколько способов лимитирования ростовых процессов.

- Наиболее доступный и широко распространенный - **снижение температуры, при которой происходит культивирование.**

- Выбор температуры определяется холодостойкостью вида растения.

- Для депонирования коллекции картофеля использовалась температура **9–10°C**, а для яблони - **1°C**.

- Для культур обычно растущих при **20–25 °C** рекомендуют использовать температуры **4–10 °C**,

- а для культур, нормально растущих при температуре около **30 °C**, – **плюс 15–20 °C**.

- Другой прием - добавление к среде для культивирования соединений, способных замедлять рост растений.
- В качестве таких регуляторов могут выступать вещества, оказывающие осмотическое действие на клетки:
 - - маннит,
 - - сорбит,
 - - сахароза в повышенных концентрациях
- или вещества гормональной природы:
 - - абсцизовая кислота,
 - - гидразид малеиновой кислоты - используется для предуборочной обработки картофеля и овощных культур в целях задержки прорастания клубней, корнеплодов или луковиц, применяется как гербицид, регулятор роста растений

- - **диметилгидразид янтарной кислоты** - полученный искусственно фитогормон.
- Его относят к системным пестицидам.
- Эти вещества применяют для борьбы и подавления роста сорных растений.
- - **хлорхолинхлорид** - торможении растяжения клеток субапикальной меристемы

Способы депонирования коллекций

Способы лимитирования ростовых процессов

Атм.давл ↓ O₂ ↓

Гипоксия

90% N + 10% O₂

Снижение температуры, при которой происходит культивирование

Добавление к среде для культивирования соединений, способных замедлять рост растений

Определяется холодостойкостью вида растения

Вещества, оказывающие осмотическое действие на клетки

Вещества гормональной природы

Для культур растущих при 20–25 °С

Для культур растущих при 30 °С

маннит
сорбит
сахароза

абсцизовая кислота, гидразид малеиновой кислоты, диметилгидразид янтарной кислоты, хлорхолинхлорид

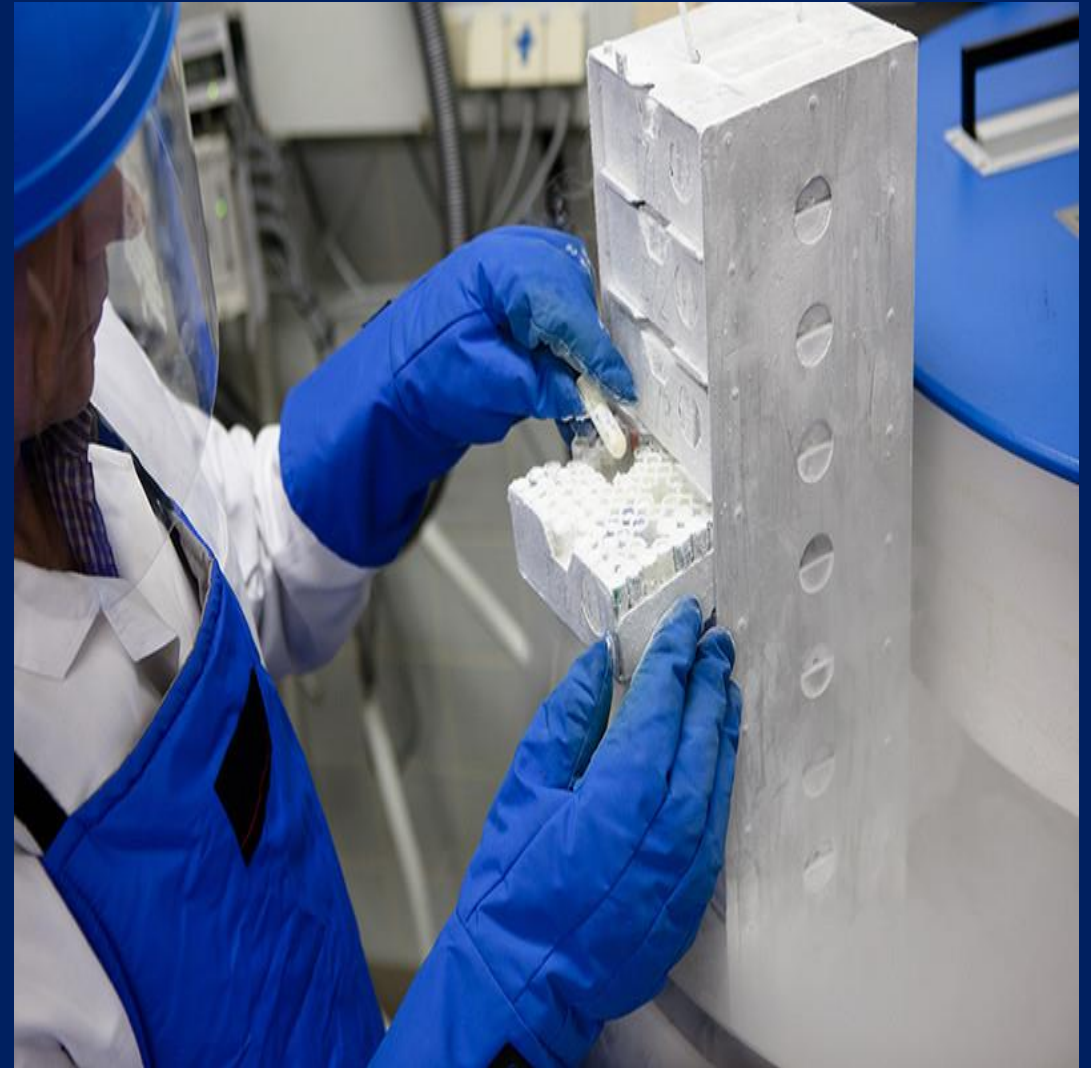
Температура 4–10 °С

Температура плюс 15–20 °С

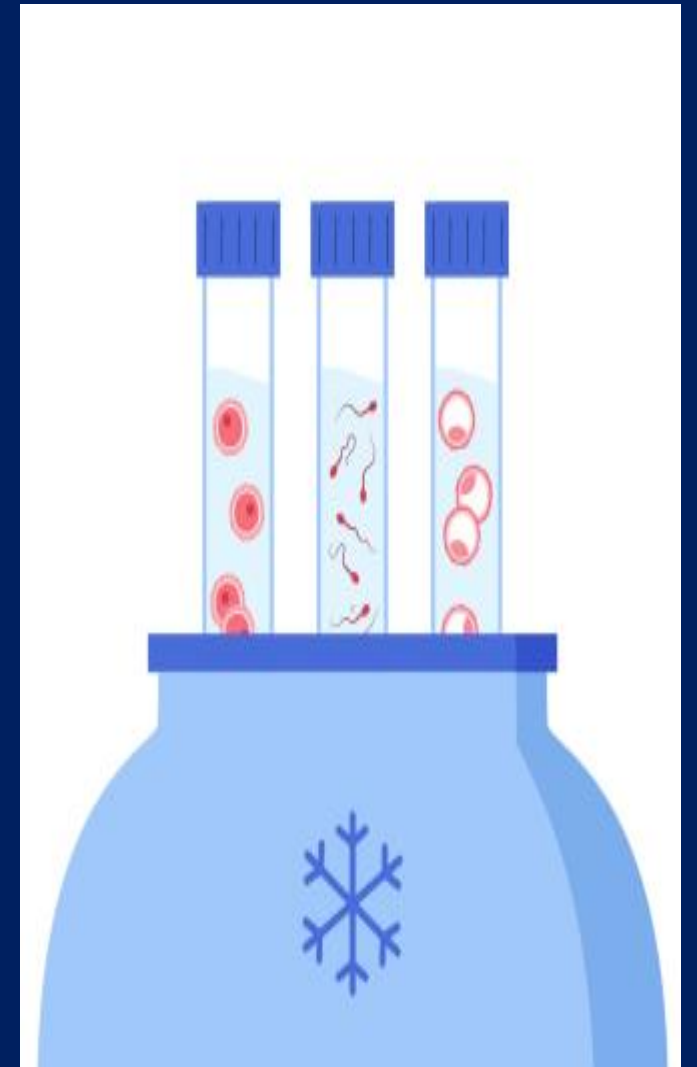
- **Основные принципы криобиологии.**

- **Криопротекторы.**

- **Криобиология** - раздел биологии, изучающий действие на живые системы низких и сверхнизких температур (от 0°C до близких к абсолютному нулю).
- **Криосохранение** - длительное хранение штаммов клеток растений при температуре жидкого азота (-196 °C) в целях создания банка генов редких и исчезающих видов, ценных селекционных объектов и штаммов-продуцентов веществ вторичного происхождения.



- **Основные задачи криобиологии:**
- -Изучение жизни в условиях холода,
-
- -выяснение причин устойчивости организмов к переохлаждению и замерзанию,
- - исследование повреждающего действия отрицательных температур и способов защиты клеток и тканей при замораживании.



- Одна из основных проблем криобиологии - **это выяснение процессов, сопровождающих охлаждение живых систем и ведущих к необратимым повреждениям.**
- Причин, вызывающих повреждения при охлаждении и замерзании, много.
- Большое значение имеет **скорость охлаждения и отогревания.**
- При медленном охлаждении сначала переходит в **лёд вода окружающей клетку жидкости.**



- **Это приводит:**

- - к потере клеткой воды,
- -нарушению солевого равновесия между вне- и внутриклеточной жидкостью,
- - повышению концентрации электролитов в клетке.
- Некоторые клетки вследствие этого погибают.

-

- Для того чтобы сохранить живыми клетки растений и некоторые ткани животных, требуется **очень медленное охлаждение**, при котором не происходит резкого изменения концентрации веществ в клетке.


- Для неадаптированных к холоду клеток особенно **опасно обезвоживание**, т. к. возникают **контакты внутриклеточных компонентов**, которые при нормальных условиях разобщены;

-

- После окончания процесса охлаждения, при температурах выше -120°C , начинается рост кристаллов (перекристаллизация, рекристаллизация).
- Увеличение их размеров особенно значительно при отогревании.
- Считают, что во время отогревания и оттаивания происходят основные повреждения в клетках.
- Как правило, при образовании внутри клетки кристаллов льда она погибает; однако клетки некоторых закалённых насекомых и злокачественных опухолей переносят внутриклеточную кристаллизацию воды (рис.).





 Механизмы повреждения клетки при охлаждении

- При **сверхбыстром охлаждении со скоростью нескольких сот градусов в 1 сек** большая часть воды превращается в аморфный лёд, структура которого мало отличается от структуры воды.
- Благодаря этому клетки не повреждаются и выживают независимо от своего происхождения.
- Но после сверхбыстрого глубокого охлаждения клетки **сохраняют жизнеспособность лишь при очень быстром отогревании (за 3—10 сек), при котором можно избежать рекристаллизации.**
- На практике этот метод сохранения клеток почти не применим ввиду невозможности сверхбыстрого охлаждения и отогревания более или менее крупных объектов.

- Для сохранения живых систем в условиях низких температур применяют защитные вещества — **криопротекторы.**
- Среди них наиболее известны:
 - - **глицерин,**
 - - **диметилсульфоксид,**
 - -**сахара,**
 - - **гликоли** (диóлы, двухáтомные спирты — класс органических соединений, содержащих в молекуле две гидроксильные группы. имеют общую формулу $C_nH_{2n}(OH)_2$), **которые способны проникать в клетку, и некоторые полимерные соединения** (поливинилпирролидон, полиэтиленоксид и др.), **не проникающие в неё.**

• Криопротекторы:

- - ослабляют эффект кристаллизации, изменяя её характер,
- - препятствуют слипанию и денатурации макромолекул,
- - способствуют сохранению целостности мембран клеток (табл.).

- **Криопротекторы** получили широкое применение в медицине и животноводстве для длительного хранения при низких температурах крови, тканей, органов, а также спермы домашних животных, используемой для искусственного осеменения

Механизм действия криопротектора

Наименование криопротектора	Механизм действия.
Пролин	Связывания воды в клетке
Аспарагин	
γ-аминомасляная кислота	
2-6% маннит или сорбит	Уменьшение размера вакуолей в растительных клетках.
Диметилсульфоксид (ДМСО) 2,5 - 10%	Увеличение проницаемости цитоплазматической мембраны

- **Криосохранение** - замораживание биологического материала при сверхнизких температурах.
- Обычно его проводят в жидком азоте, при температуре **-196°C**.
- **Успех криосохранения зависит от множества факторов:**
 - 1. Типа замораживаемых клеток
 - 2. Особенности биохимического метаболизма клеток.
 - 3. Составы среды при культивировании клеток и криоконсервации.
 - 4. Вида клеточной культуры: суспензионная или монослойная.
 - 5. Качества, концентрации и вида криопротектора.
 - 6. Особенности охлаждения.
 - 7. Режима хранения клеток.
 - 8. Способа и скорости оттаивания замороженной клеточной культуры

- **Основные принципы криоконсервации, хранения и размораживания:**
- 1. Криоконсервированию подвергают клетки, находящиеся в виде **суспензии, в концентрации $10^5 - 10^6$ клеток / 1 мл.**
- 2. Клетки для замораживания **отбирают в середине экспоненциальной фазы ростовой кривой**, так как клетки в стационарной фазе менее устойчивы к повреждающему действию криоконсервации.
- 3. Процесс замораживания животных клеток отличается от процесса заморозки растительных клеток.
- Так в случае растительных клеток применяется **предварительное культивирование в специальных условиях, с добавлением различных добавок (криопротекторов).**

- 4. В обязательном порядке применяются **криопротекторы**.
- 5. Процесс замораживания культуры клеток осуществляется по определённой программе.
- В результате замораживания возникают **две противоречивые проблемы**:
 - с одной стороны **медленное замораживание** приводит к образованию **внеклеточного льда** и, как результат, к **обезвоживанию и гибели клетки**,
 - с другой стороны, **быстрая заморозка** приводит к образованию **кристаллов льда** **внутри клетки** и к **массированному повреждению** **внутриклеточных структур**.

- **Замораживание** **проводят в два этапа:**

- **1 этап** - производят **охлаждение** от **+ 37⁰ С** до **- 28⁰С** со скоростью **V = 10⁰ С/мин**,
- **2 Этап** - производят **погружение** в **жидкий азот**
- **- 196⁰ С** (**мгновенная заморозка**).

- 6. При температуре жидкого азота (-196°C) клетки можно хранить в течение ряда лет без существенной потери жизнеспособности.
- 7. При размораживании следуют принципу как можно более быстрой разморозки клеточной культуры при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в культуральной среде для роста

Как же происходит криоконсервация?



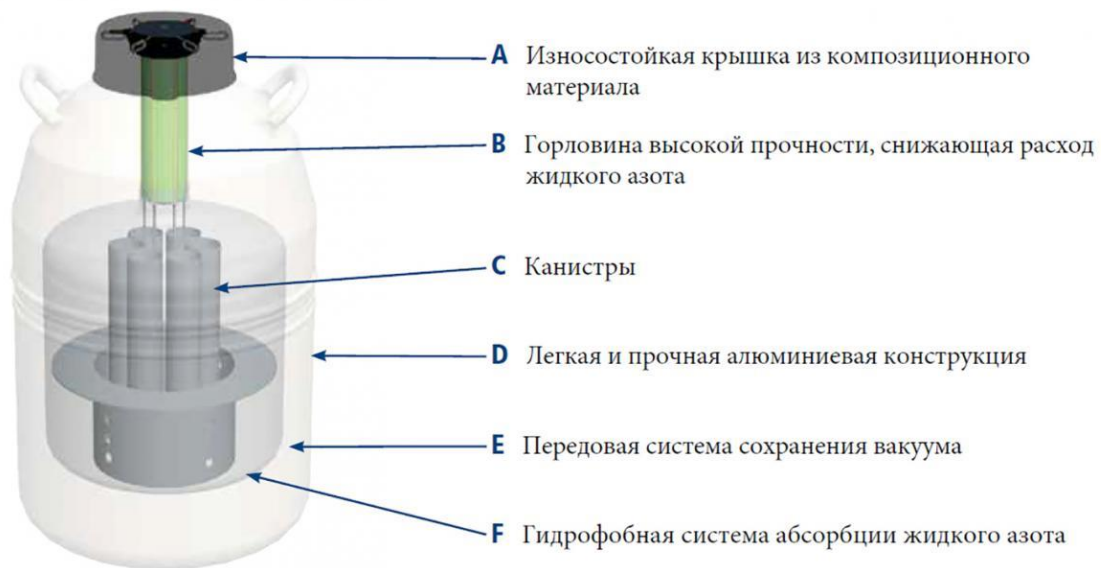
Криоконсервация ооцитов



Криоконсервация спермы

- 1 Проверка материала для криоконсервации
- 2 Обработка специальными растворами (криопротекторами)
- 3 Помещение материала в криопробирки
- 4 Помещение пробирок в сосуды Дьюара, заполненные жидким азотом

Сосуд криогенный (сосуд Дьюара)



криопротекторы

вещества, защищающие живые объекты от повреждающего действия замораживания.

проникающие

непроникающие

**глицерин
пропиленгликоль
этиленгликоль
диметилсульфоксид**

**сахароза
трегалоза**

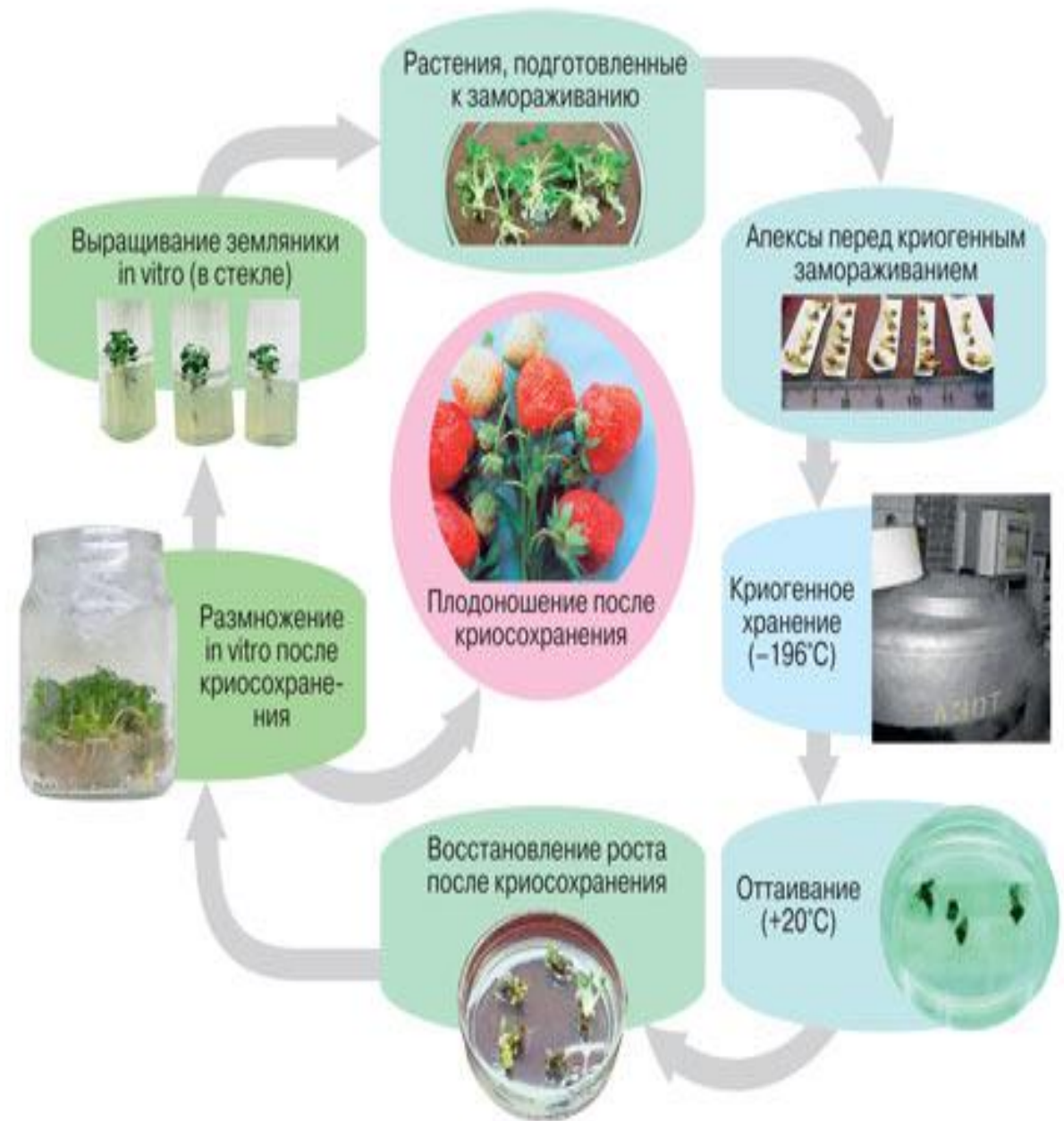
КРИОПРОТЕКТОРЫ (~100)

ПРОНИКАЮЩИЕ —
ЭНДОЦЕЛЛЮЛЯРНЫЕ (диметил-
сульфоксид, глицерин, глюкоза,
...):

- Снижают температуру замерзания
- Образуют водородные связи с молекулами воды, чем и препятствуют формированию кристаллов льда
- Связывают часть свободной воды, что уменьшает общую дегидратацию клеток
- Разбавляют образующийся при кристаллизации «рассол», не давая белкам денатурироваться
- Стабилизируют структуру макромолекул клетки за счёт образования с ними водородных связей

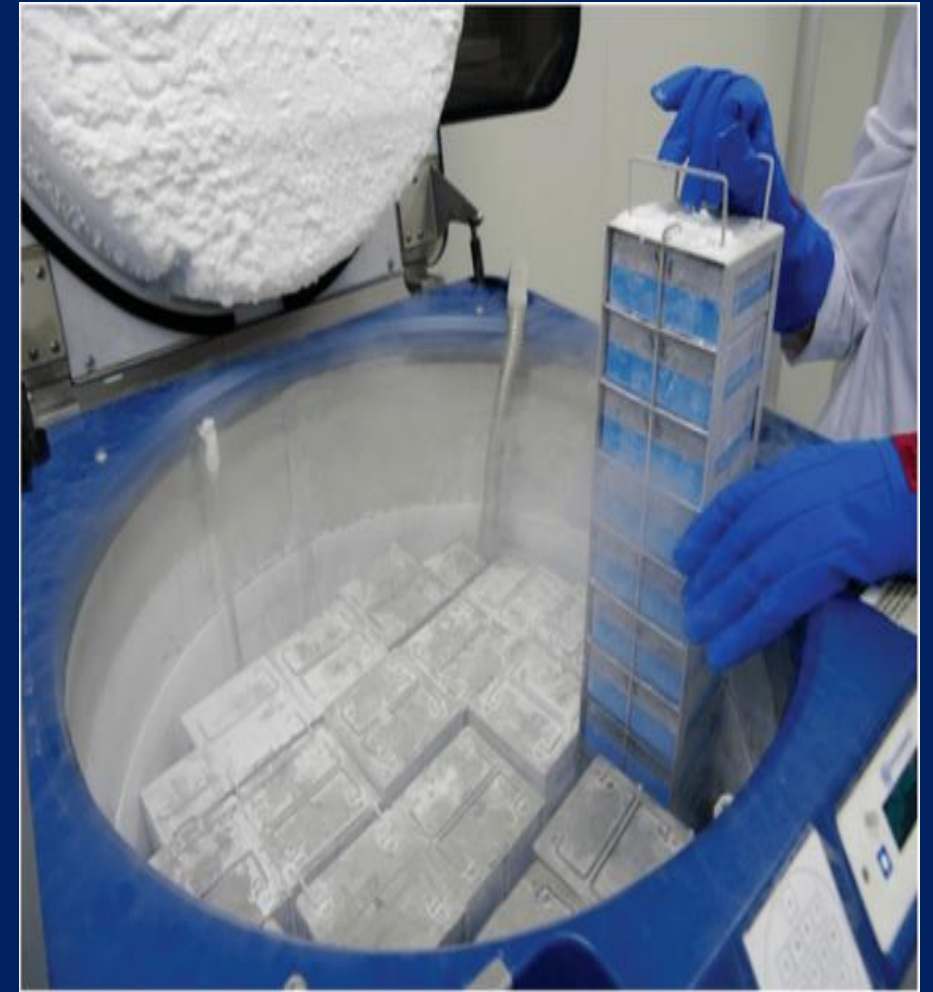
НЕПРОНИКАЮЩИЕ —
ЭКЗОЦЕЛЛЮЛЯРНЫЕ
(полиэтиленоксид,
поливинилпирролидон, ...):

- Препятствуют росту кристаллов внеклеточного льда
- Препятствуют осмотическим перепадам
- Способствуют снижению концентрации **ПРОНИКАЮЩИХ**, а значит и токсичности последних
- Защищают плазматические мембраны



- Обычно кристаллы льда вначале образуются в **межклеточном пространстве**, а затем **внутри клетки**.

- Их рост оказывает **механическое воздействие** на клетки, разрушая клеточные мембраны.



Работа по криосохранению

Подготовки культуры клеток

**Добавление
криопротектора**

Замораживание

**Хранения в жидком
азоте**

Оттаивание

**Регенерации
растений**

Рекультивирование

**Удаление
криопротектора**

Подходы и условия для криосохранения

Факторы выживаемости клеток

Выбор наиболее подходящей фазы развития культуры

Критических фактор -
степень их вакуолизации

Культивирование в условиях, способствующих образованию мелких клеток и синхронизации их деления

Для суспензионных культур важным моментом подготовки -
концентрирование

Увеличение плотности культуры в 2–3 раза значительно повышает выживаемость клеток.

Предварительное культивирование с некоторыми аминокислотами, благодаря увеличению уровня эндогенных сахаров в клетках