



РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ – МСХА имени К.А. Тимирязева

Кафедра селекции и семеноводства полевых культур

Отчёт о производственной практике

Факультет:

Группа:

Студент:

Руководители:

**Москва
2006**

Оглавление

Место проведение летней практики	3
Цель.....	3
Материалы и методы.....	3
Определение оводненности тканей листа растения.....	3
Определение содержания свободного пролина.....	4
Приготовление проб для определения меди и цинка в тканях растений по методу Голубкиной	4
Трансформация растений рапса с помощью <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , несущих плазмиду COR15Myb4 и pGAMyb4.....	5
Состав питательных сред.....	6
S (для семян), на 1 л:	6
В (трансформация на агробактериальном фоне): на 1 л.....	6
D _{8/1} (для регенерации и каллусообразования), на 1л:	7
Витамины, конечная концентрация в р-ре:.....	7
Выращивание ночной культуры агробактерий для дальнейшего выделения плазмид	7
Проведение опыта	8
Выращивание растений.....	8
Среда Хогланда-Снайдерс	9
Результаты.....	10
Выводы	13

Место проведение летней практики

Практическая работа проводилась в Лаборатории Экспрессии Генома (ЛЭГ) Института Физиологии Растений (ИФР) РАН и лаборатории изучения биологических и молекулярных механизмов адаптации растений к стрессу.

Цель

Получение трансгенных растений рапса и изучение влияния абиотических факторов на них. На данный момент изучается воздействие тяжелых металлов и засоления на растения рапса, планируется анализ на холодостойкость, окислительный стресс, засухоустойчивость.

Материалы и методы

В качестве объекта в работе были использованы растения рапса (*Brassica napus*) сорта Вестар.

Микро- и макро выделение тотальной ДНК из растительной ткани, полимеразная цепная реакция, электрофорез ДНК в 1% агарозном геле были описаны в отчете о летней практике за 2005 год. Эти методы применялись и в данной работе, для обнаружения трансгенных растений.

Определение оводненности тканей листа растения

Предварительно бюксы промывают хромпиком, затем дистиллированной водой, сушат и доводят до постоянной массы, которую фиксируют.

Готовят среднюю пробу из измельченных бритвой листьев и отбирают навеску (около 1 грамма, ее записывают) и помещают в бюкс.

Бюксы сушат в термостате 1 сутки с открытой крышкой при температуре 80°, доводят до постоянной массы.

Затем рассчитывают оводненность тканей листа.

Определение содержания свободного пролина

Содержание свободного пролина определяли с помощью кислого нингидринового реактива (30 мл ледяной уксусной кислоты + 20 мл 6М H_3PO_4 + 1,25 г нингидрина) по методу Бейтса с соавт (Bates et al., 1973).

Навеску свежей растительной ткани листьев (200 мг) заливали в пробирке 5-20 мл кипящей дистиллированной воды и на 10 минут помещали в кипящую водяную баню. В чистую пробирку приливали 1 мл ледяной уксусной кислоты и 1 мл нингидринового реактива, затем приливали 1 мл экстракта. Пробы инкубировали в течение 1 часа в кипящей водяной бане, после чего быстро охлаждали во льду. Интенсивность окраски определяли спектрофотометрически при длине волны 520 нм на спектрофотометре СФ-46. Значения содержания пролина рассчитывали с помощью калибровочной кривой, используя для ее построения пролин фирмы «Serva». Определение содержания пролина проводили в 2-х биологической и 2-х аналитических повторностях.

Приготовление проб для определения меди и цинка в тканях растений по методу Голубкиной

Навеску воздушно-сухого растительного материала (30-50 мг) заливали смесью концентрированных азотной (1,5 мл) и хлорной (0,8 мл) кислот и оставляли на сутки. Затем с помощью аналогового термостата TDB-400-A фирмы BioSan пробы прогревали 3 часа при 180° и после охлаждения до 150° вносили в них по 5-6 капель концентрированной H_2O_2 . Через 10 минут к пробам приливали 1 мл HCl и выдерживали их 10 минут при температуре 110°. После обесцвечивания растворов концентрацию ТМ измеряли на атомно-абсорбационном спектофотометре Hitachi-207 фирмы Hitachi.

Трансформация растений рапса с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, несущих плазмиду *COR15Myb4* и *pGAMyb4*

1. Предварительно подготовили необходимую посуду, пинцеты, среду.
2. Разлили среду S без антибиотиков по колбочкам.
3. Прозезинфицировали семена рапса: обработали белизной (Доместос) в течение 20 минут, затем промыли спиртом и водой 5-6 раз.
4. Разложили семена по колбочкам (10 штук/колба) и поставили в темное место для прорастания.
5. Агробактерии разгоняем несколькими пересадками, проверяем вставку плазмиды и в день трансформации нужно иметь свежую культуру с плотностью 0,5-0,6 при 590 нм.
6. За 1 день до трансформации подготовили чашки Петри, пинцеты, шпатели, пипетки, носики, среду В.
7. Через 5 дней проводим трансформацию на газоне (2 дня семена стоят в темноте и 3 дня – на свету). Для этого разлили среду В по чашкам Петри без антибиотиков. Подготавливаем газон: наносим 50 мкл суспензии *Agrobacterium* на чашку Петри и размазываем шпателем по поверхности. У проростков срезаем листья не затрагивая точку роста. Каллус будет образовываться в месте поранения, на листовом черешке. Выкладываем листочки рапса в чашки Петри (40 штук/чашка).
8. Ставим на 2 дня в темное теплое место.
9. За день до пересадки готовим среду D, инструмент.
10. В растопленную среду добавляем антибиотики: клафоран (до 800 мг/л) и гормоны: АБК (до 3 мг/л), разливаем среду по чашкам.
11. Перекладываем экспланты рапса в чашки – по 8 штук.
12. Ставим на свет и тепло.
13. По состоянию растительного материала, примерно через 2 недели, пересаживаем подросшие экспланты на ту же среду D, без

добавления АБК, с добавлением AgNO_3 – 300 мкл, клафорана (500мг/л) – 1,25 мл , канамицина (15мг/л) – 37,5 мкл на 250 мл среды.

14.Ставим на 2 недели на свет и тепло.

15.Отрезаем каллус с регенерантом от экспланта и пересаживаем на среду D.

16.Отрезаем регенерант, перекладываем на 1/2MS + НУК в пластиковые горшочки.

17.После того, как регенерант достигнет больших размеров (3-5 листьев), отбираем пробы для выделения ДНК и анализа с помощью ПЦР на трансгенность.

Состав питательных сред

S (для семян), на 1 л:

Макро MS – 50 мл

Микро MS – 1 мл

сахароза – 10 г

агар – 14 г

pH 5,6-5,8

B (трансформация на агробактериальном фоне): на 1 л

Макро MS – 50 мл

Микро MS – 1 мл

CaCl_2 20% – 3,3 мл

Fe-хелат – 5 мл

витамины – 100 мкл

сахароза – 30 г

2,4-D – 25 мкл

кинетин – 250 мкл

агар – 7 г

<http://yadyra.ru>

pH 5,6-5,8

D_{8/1} (для регенерации и каллусообразования), на 1л:

Макро MS – 50 мл

Микро MS – 1 мл

CaCl₂ 20% – 3,3 мл

Fe-хелат – 5 мл

инозит – 100 мг

витамины – 100 мкл

сахароза – 10 г

БАП – 1 мг

НУК – 8 мг

агар – 7 г

pH 5,6-5,8

Витамины, конечная концентрация в р-ре:

пиридоксин – 1мг/л

тиамин – мг/л

никотиновая кислота – 1 мг/л

Все три компонента берем по 0,2г и растворяем в 20 мл воды. Для приготовления среды D_{8/1} на 1 л используем 100 мкл.

Выращивание ночной культуры агробактерий для дальнейшего выделения плазмид

Работу проводим в ламинар-боксе. Отдельную колонию агробактерий стерильной деревянной заостренной палочкой переносим в питательную среду следующего состава:

4 мл LB_{жидк} + Km 8 мкл + Tc 2,6 мкл

Пробирку закрываем, ставим на ночь в мешалку.

Проведение опыта

Для изучения влияния тяжелых металлов часть растений рапса выращивалась в пластмассовых горшочках в перлите, а часть – в водной культуре в стеклянных сосудах. Опыт, заложенный в перлите повторялся дважды, однако ожидаемых результатов не дал: в первом тяжелые металлы поглощались ЭДТА, входящим в состав питательной среды, во втором от ЭДТА отказались; однако из-за разбавления исходной концентрации питательным раствором, из-за колебания концентрации вследствие изменения влажности перлита (имеет низкую водоудерживающую способность) данные также не могли никак трактоваться.

Поэтому было предложено использовать водную культуру: возможно добиться точной, требуемой концентрации тяжелых металлов и нет проблем с ее изменением вследствие иссушения субстрата. В питательный раствор ЭДТА не добавляли, увеличили концентрацию Fe в 2 раза. Ниже представлен опыт, проведенный в водной культуре.

Опыт проводился с 9 вариантами, в двукратной биологической и двукратной аналитической повторности.

Варианты:

1. Контроль

2. Cu 50 мкМ

3. Cu 100 мкМ

4. Cu 200 мкМ

5. Zn 200 мкМ

6. Zn 300 мкМ

7. Zn 500 мкМ

8. NaCl 100 мМ

9. NaCl 200 мМ

Выращивание растений

Продезинфицировали семена рапса: обработали белизной (Доместос) в течение 20 минут, затем промыли спиртом и водой 5 раз.

Разложили семена по колбочкам (10 штук/колба) и поставили в темное место для прорастания. Через 3 дня пророщенные растения пинцетом пересадили на среду Хогланда-Снайдерс, по 9 штук на сосуд.

Среда Хогланда-Снайдерс

Маточный раствор	Вещество	Концентрация	На 1 л, г
1)	KNO_3	1 М	101,0
	KH_2PO_4	0,74 М	100,64
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,41 М	100,86
2)	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,42 М	99,12
3)	$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,77 мМ	0,426
	H_3BO_3	8,87 мМ	0,549
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,31 мМ	0,088
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,32 мМ	0,079
	$(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,026 мМ	0,032
4)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}^*$	3,59 мМ	0,998
	ЭДТА*	3,63 мМ	1,061

* В питательный раствор ЭДТА не добавляли, увеличили концентрацию Fe в 2 раза.

На 1 л питательной среды: 1) – 10 мл, 2) – 10 мл, 3) – 1 мл, 4) – 4мл.

Среду периодически (1 раз в 4-5 дней) заменяли на свежеприготовленную.

На 21 день – исходная точка: отбор растительных образцов для анализа перед опытом.

Далее – замена питательной среды на свежеприготовленную, с добавлением тяжелых металлов.

Через 5 дней – контрольная точка. Листья срезаются, готовится средняя проба, фиксируются навески по 200 мг для определения содержания пролина и ПДГ, взвешивается навеска около 1 грамма (ее масса записывается) для определения оводненности. После определения оводненности в высушенном растительном образце определяется содержание ТМ.

Результаты

Таблица 1. Оводненность листьев рапса через 5 дней после начала воздействия ТМ

вариант	m бюкса, г	m свеж, г	m бюкса+сух, г	m сух, г	W%
контроль	24,4907	1,0672	24,5674	0,0767	92,81
Cu 50	24,1716	0,812	24,2583	0,0867	89,32
Cu 100	22,7065	1,0251	22,8144	0,1079	89,47
Cu 200	23,1678	1,0478	23,3093	0,1415	86,50
Zn 200	21,2553	0,9923	21,3416	0,0863	91,30
Zn 300	24,7191	0,9801	24,805	0,0859	91,24
Zn 500	23,3826	1,0078	23,4729	0,0903	91,04
NaCl 100	23,5947	1,1488	23,6806	0,0859	92,52
NaCl 200	24,4935	1,0352	24,5774	0,0839	91,90

Таблица 2. Определение содержания свободного пролина в листьях рапса через 5 дней после начала воздействия ТМ

вариант	E1	E2	Еср	пролин, мкМ / г свежей массы	пролин, мкМ / г сухой массы	пролин, мкМ / г сухой массы, средн.
контроль 1	0,017	0,043	0,03	0,64	8,90	10,15
контроль 2	0,037	0,04	0,0385	0,82	11,40	
Cu 50 - 1	0,297	0,286	0,2915	6,19	57,96	65,82
Cu 50 - 2	0,372	0,369	0,3705	7,87	73,69	
Cu 100 - 1	0,117	0,138	0,1275	27,07	257,08	286,32
Cu 100 - 2	0,154	0,159	0,1565	33,23	315,57	
Cu 200 - 1	0,159	0,159	0,159	33,76	250,07	271,70
Cu 200 - 2	0,173	0,2	0,1865	39,60	293,33	
Zn 200 - 1	0,035	0,033	0,034	0,72	8,28	11,21
Zn 200 - 2	0,058	0,058	0,058	1,23	14,14	
Zn 300 - 1	0,046	0,049	0,0475	1,01	11,53	13,81
Zn 300 - 2	0,069	0,064	0,0665	1,41	16,10	
Zn 500 - 1	0,058	0,053	0,0555	1,18	13,17	12,17
Zn 500 - 2	0,046	0,048	0,047	1,00	11,16	
NaCl 100 - 1	0,116	0,112	0,114	2,42	32,35	33,36
NaCl 100 - 2	0,117	0,125	0,121	2,57	34,36	
NaCl 200 - 1	0,872	0,91	0,891	18,92	233,58	145,74
NaCl 200 - 2	0,209	0,233	0,221	4,69	57,90	

Таблица 3. Определение содержания металлов в листьях рапса через 5 дней после начала воздействия

вариант	E	содержание Zn, mM
контроль	15	24
Zn200	45	72
Zn300	82	131,2
Zn500	48	76,8
вариант	E	содержание Cu, mM
контроль	1	3,2
Cu 50	2	6,4
Cu 100	3	9,6
Cu 200	28	89,6



Контроль



Cu 50



Cu 100



Cu 200



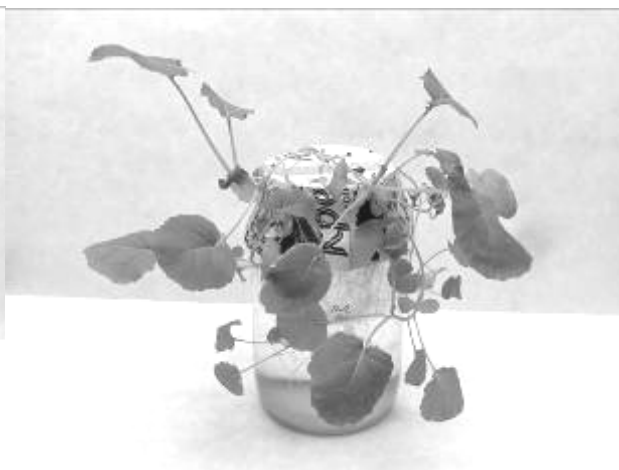
Zn 200



Zn 300



Zn 500

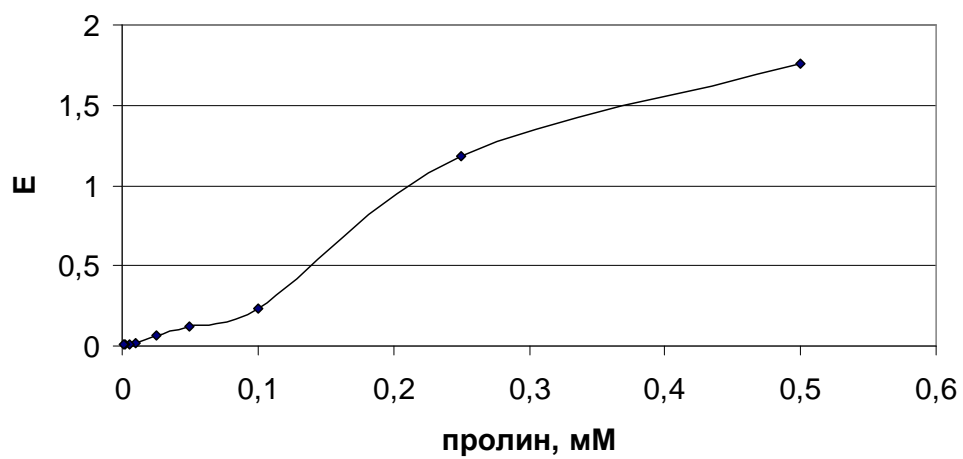


NaCl 100



NaCl 200

Калибровочная кривая для определения содержания пролина



Выводы

Визуально цинк не оказывал влияние на состояние растений в данных концентрациях, что явилось неожиданностью для нас. Это было объяснено тем, что растения рапса обладают некоторой устойчивостью к Zn, что обусловлено их принадлежностью к семейству крестоцветных. В последующих опытах планируется повысить концентрацию этого металла, для установления некоторых границ, в которых будут анализироваться трансгенные растения.

Медь и NaCl оказали свое негативное влияние сильно, визуально это наблюдалось и на 4-й день. Это означает то, что концентрации были выбраны правильно.

По оводненности листьев можно сказать следующее: у контроля она максимальна, что и должно соответствовать истине, в варианте с Cu 200 она минимальна, т.е. растение испытывает сильнейший стресс (видна визуально потеря тургора), NaCl оказывает среднее воздействие из всех вариантов, а влияние цинка минимально, хотя и улавливается.

Пролин – аминокислота, повышенно вырабатываемая при стрессе. Поэтому определение содержания пролина заслуживает особого внимания. По сравнению с контролем везде прослеживается повышенное содержание пролина, однако в варианте с цинком его не намного больше, что снова говорит об устойчивости растений к воздействию этого металла. Сильнее всего проявила себя медь, на втором месте – засоление.

Точное знание содержания тяжелых металлов в листьях дало бы еще большую пищу для размышлений. Однако, как видно из таблицы 3, этим данным нельзя верить. Я вижу проблему в большой ошибке прибора, поскольку аналогичное отсутствие закономерности уже наблюдалось.

В ходе работы поставлены две трансформации, получены 5 трансгенных растений.

<http://yadyra.ru>

В дальнейшем планируется применить отработанные методы для анализа полученных трансгенных растений на устойчивость к абиотическим факторам среды.