Выделение протопластов.

**Цель задачи:** выделить протопласты, изучить влияние среды выделения, вида растения, тканевой принадлежности клеток на выделение и сохранность протопластов.

**Объекты исследования**: *Crassula arborea*, *Kalanchoe manginii*, *Kalanchoe diagremontiana*, *Kalanchoe tubiflora*, *Sedum* sp.

**Реактивы и оборудование**: 25 мМ Mes-KOH (рН 5.5-5,7), маннит, фермент (целлюлаза или/и пектиназа) 1 навеска 10-30 мг, пробирки «Эппендорф» (1,5 мл), маленькие чашки Петри (d=3 см), препаровальные иглы, лезвие, микроскопы.

**Ход работы:**

* 1. *1. Приготовление инкубационных смесей*:

1.1. Приготовление растворов целлюлазы в буфере (навески целлюлазы растворяют в необходимых объемах буфера). Раствор целлюлазы в буфере центрифугируют при 4000 об/мин. 2-4 минуты до растворения целлюлазы.

1.2. Раствор целлюлазы распределяют в нужном объеме по пробиркам.

1.3. К растворам целлюлазы приливают раствор маннита в буфере согласно результатам расчетов для получения нужных концентраций маннита и целлюлазы. Растворы размешивают.

2. *Приготовление препаратов:*

2.1. Отрезают небольшой кусочек листа у выбранного объекта.

2.2. Вырезают 6-8 кусочков мезофилла (≈3\*3\*2мм) из отрезанного кусочка листа.

2.3. Сразу помещают по 3-4 кусочка мезофилла в инкубационные смеси.

*3. Инкубация*:

пробирки с кусочками ткани оставляют в термостате на 2,5 часа при 370С.

4. Под микроскопом (объектив х10) исследуют раствор в чашках Петри. Зарисовывают найденные протопласты. Оценивают их примерное количество в поле зрения.

**Результаты:**

**Обсуждение результатов:**

В зависимости от "степени выделенности" протопластов (количество и целостность) оценивают влияние среды выделения и

особенностей объекта на процесс и результат.

**Выводы**:

**Оформление работы.**

Отчет о работе:

название задачи,

цель работы,

объект,

реактивы и оборудование,

ход работы,

результаты,

обсуждение результатов: влияние фермента на выделение протопластов.

влияние количества маннита на сохранность протопластов, определение оптимальной концентрации маннита для выделения протопластов у данного объекта.

влияние особенностей объекта на выделение протопластов

выводы:

**К зачету:**

1) особенности растительной клетки;

2) строение первичной клеточной стенки, функции составляющих клеточной стенки, типы клеточной стенки, вакуоль, тонопласт;

3) плазмолиз;

4) индивидуальный отчет.

ЛИТЕРАТУРА к зачету:

«Физиология растений» под ред. И. П. Ермакова. - Учеб. для студ. вузов. М.: Изд. Центр "Академия", 2005.

Р. Г. Бутенко Биология клеток высших растений in vitro и биотехнологии на их основе. М., ФБКПРЕСС, 1999.