



МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ – МСХА ИМЕНИ К.А. ТИМИРЯЗЕВА

А.В. ВОРОНИНА, А.В. ВИШНЯКОВА, Р.А. КОМАХИН, С.Г. МОНАХОС

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ САДОВЫХ КУЛЬТУР

Учебное пособие

Допущено Учебно-методическим объединением вузов Российской Федерации по агрономическому образованию в качестве учебного пособия для подготовки бакалавров, обучающихся по направлению 35.03.05 «Садоводство»

Москва

2023

УДК 631.52:634
ББК 40.06:28.54
О 75

Рецензенты:

Тороп Е.А., доктор биологических наук, профессор, директор Центра биотехнологических исследований ФГБОУ ВО Воронежский ГАУ;

Нгуен М.Л., кандидат с.-х. наук, декан факультета биологии и науки об окружающей среде, Данангский университет – университет Науки и Образования.

Авторский коллектив:

А.В. Воронина, А.В. Вишнякова, Р.А. Комахин, С.Г. Монахос

Иллюстрации Ворониной А.В.

Основы биотехнологии садовых культур: учебное пособие [Электронный ресурс]. – Электрон. текстовые, граф. данные (7,1 Мб). / А.В. Воронина, А.В. Вишнякова, Р.А. Комахин, С.Г. Монахос; ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева» – Москва: Издательство РГАУ - МСХА, 2023. – 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM): цв. – Систем. требования: ПК 500 и выше; 256 Мб ОЗУ; Windows XP; SVGA с разрешением 1024×768; AdobeAcrobat; CD-ROM дисковод; мышь. – Загл. с экрана.

М 77

ISBN 978-5-9675-1981-9

DOI 10.26897/ 978-5-9675-1981-9-2023-138

Рассмотрены основные методы культивирования растительных клеток и тканей в условиях *in vitro* и генетической инженерии, возможности интенсификации плодоводства, овощеводства, декоративного садоводства и селекционной работы с их применением. Учебное пособие объединяет в себе теоретические материалы и лабораторный практикум для освоения обучающимися методов культуры клеток и тканей растений, применяемых для микроклонального размножения и получения новых генотипов, а также сохранения генофонда и производства ценных метаболитов.

Издание предназначено для студентов бакалавриата и магистратуры высших учебных заведений по агрономическому образованию в качестве учебного пособия для направления подготовки 35.03.05 «Садоводство», а также для специалистов в области селекции и семеноводства овощных растений, плодоводства, декоративного садоводства.

Допущено Учебно-методическим объединением вузов Российской Федерации по агрономическому образованию в качестве учебного пособия для подготовки бакалавров, обучающихся по направлению 35.03.05 «Садоводство».

Ил. 58. Табл. 4. Прил. 2. Библиогр.: 26

**УДК 631.52:634
ББК 40.06:28.54**

*Издается по решению редакционно-издательского совета
Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А.Тимирязева»*

ISBN 978-5-9675-1981-9

DOI 10.26897/ 978-5-9675-1981-9-2023-138

© Воронина А.В., Вишнякова А.В.,
Монахос С.Г., Комахин Р.А., 2023

Reviewers:

Torop E.A., Doctor of Biological Sciences, Professor, Director of the Center for Biotechnological Research, Voronezh State Agrarian University;
*Nguyen M.L., Ph.D. Sci., Dean of the Faculty of Biology and Environment, University of Danang - University of Science and Education.*³

Writing team:

A.V. Voronina, A.V. Vishnyakova, R.A. Komakhin, S.G. Monakhos

Illustrations by A.V. Voronina

Basics of tissue culture techniques for horticultural crops: laboratory manuals. [Electronic resource]. – Electronic text, graphic data (7.1 Mb). / A.V. Voronina, A.V. Vishnyakova, R.A. Komakhin, S.G. Monakhos; Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy – Moscow: Publisher RGAU - MSHA, 2023. – 1 electronic optical disc (DVD-ROM). - System requirements: PC 500 and above; 256 MB RAM; Windows XP; SVGA with a resolution of 1024×768; Adobe Acrobat; CD-ROM drive; mouse. - Screen caption.

ISBN 978-5-9675-1981-9

DOI 10.26897/ 978-5-9675-1981-9-2023-138

The manual covers the basics of in vitro plant cell and tissue culture and genetic engineering as well as the efficiency of accelerating the breeding process of horticultural crops using this methodology. It combines theory and a laboratory workshop for undergraduate and graduate students. The manual is intended to master the methods of plant cell and tissue culture used for clonal micropropagation and the new germplasm generation, as well as germplasm preservation and the production of metabolites.

The “Basics of tissue culture techniques for horticultural crops: laboratory manuals” is intended for undergraduate and graduate students specializing in the agronomic field 35.03.05 "Horticulture", as well as for professionals in breeding and seed production of horticultural crops.

The manual is approved by the Educational and Methodological Association of Universities of the Russian Federation for Agronomic Education as a teaching aid for undergraduate students specializing in 35.03.05 "Horticulture".

Fig.58. Table 4. Appendix 2. Bibliography 26.

Оглавление

Введение	7
Глава 1. Культура тканей, предмет и задачи, история	9
1.1. Биотехнология, основные направления развития биотехнологии.....	9
1.2. Краткая история развития и направления использования культуры клеток и тканей.....	10
Контрольные вопросы	11
Глава 2. Основы культивирования клеток и тканей растений	12
2.1. Организация биотехнологической лаборатории	12
2.2. Безопасность при работе в лаборатории	13
Контрольные вопросы	15
Глава 3. Принципы культивирования тканей и клеток	16
3.1. Использование питательных сред	16
3.2. Соблюдение стерильности	18
3.3. Соблюдение физических условий культивирования	23
Лабораторная работа № 1. Приготовление питательной среды Мурасиге- Скуга.....	25
Контрольные вопросы	27
Глава 4. Типы культур тканей растений	28
4.1. Культивирование существующих меристем.....	28
4.2. Получение каллуса и клеточной суспензии	28
4.3. Морфогенез в каллусной культуре	31
4.4. Факторы, определяющие направление морфогенеза <i>in vitro</i>	34
4.5. Микрклональное размножение.....	35
4.6. Культура меристем в производстве растений, свободных от вирусной инфекции.....	39
Лабораторная работа № 2. Активация меристем мяты.....	41
Лабораторная работа № 3. Культура меристем картофеля	42
Лабораторная работа № 4. Микрочеренкование побегов мяты или картофеля	43
Лабораторная работа № 5. Получение каллуса моркови.....	45
Лабораторная работа № 6. Положение экспланта на питательной среде .	46
Лабораторная работа № 7. Прямой органогенез. Микрклональное размножение сенполии.....	48
Контрольные вопросы	49

Глава 5. Биология растительных клеток, культивируемых <i>in vitro</i>	50
5.1. Динамика роста клеток, культивируемых <i>in vitro</i>	50
5.2. Различия клеток каллуса	51
Лабораторная работа № 8. Получение суспензионной культуры клеток моркови	53
Лабораторная работа № 9. Платирование	54
Контрольные вопросы	55
Глава 6. Типы дифференцирования. Регуляторы роста в культуре клеток	57
6.1. Ауксины	58
6.2. Цитокинины.....	60
6.3. Гиббереллины.....	62
6.4. Абсцизовая кислота	63
6.5. Этилен	64
6.6. Другие регуляторы роста растений.....	65
6.7. Регуляторы роста в культуре клеток и тканей растений	66
Контрольные вопросы	66
Глава 7. Культура изолированных тканей в селекции и генной инженерии растений	67
7.1. Производство удвоенных гаплоидов	67
7.2. Эмбриокультура	73
7.3. Соматическая гибридизация	74
Лабораторная работа № 10. Получение удвоенных гаплоидов капусты белокочанной в культуре изолированных микроспор	77
Лабораторная работа № 11. Проращивание семян фаленопсиса <i>in vitro</i> ..	79
Контрольные вопросы	80
Глава 8. Генетическая трансформация	81
8.1. История открытия явления генетической трансформации и разработки методов генетической модификации	81
8.2. Получение гена.....	82
8.3. Клонирование гена.....	88
8.4. Генетическая трансформация и получение трансгенных растений ...	89
8.5. Методы генетической трансформации	91
8.6. Система непрямой генетической трансформации.....	92
8.6.1. Агробактериальная трансформации	93
8.6.2. Вирусные векторы	96

8.7. Методы прямого переноса генов.....	97
8.8. Временная (транзистная) и стабильная экспрессия рекомбинантного гена	99
8.9. Генетические маркеры (селективные и репортерные гены) в трансформации.....	99
8.10. Получение трансгенных растений, не содержащих маркерных генов	101
8.11. Подтверждение генетической трансформации.....	102
8.12. Снижение или прекращение (замолкание) экспрессии гена в трансгенных растениях.....	103
8.13. Создание культурных растений с хозяйственно полезными признаками.....	104
8.13.1. Создание культурных растений, устойчивых к насекомым.....	105
8.13.2. Создание культурных растений, устойчивых к гербицидам.....	105
8.13.3. Создание культурных растений, устойчивых к болезням	106
Лабораторная работа № 12. Агробактериальная трансформация растений табака.....	108
Лабораторная работа № 13. Агробактериальная инфильтрация растений <i>Nicotiana benthamiana</i>	111
Контрольные вопросы	113
Глава 9. Культура тканей растений в сохранении генофонда.....	114
Контрольные вопросы	117
Глава 10. Культивирование клеток и тканей для производства ценных веществ.....	118
Контрольные вопросы	122
Глоссарий.....	123
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Приготовление растворов.....	131
ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Состав питательных сред.....	134
Библиографический список.....	136

Введение

Целью освоения дисциплины «Основы биотехнологии садовых культур» является освоение студентами теоретических и практических знаний и приобретение умений и навыков в области современных биотехнологий. Рассмотрены основные методы культивирования растительных клеток и тканей в условиях *in vitro* и генетической инженерии, возможности интенсификации плодоводства, овощеводства, декоративного садоводства и селекционной работы с их применением. Особое внимание уделено таким методам как: микроклональное размножение, оздоровление посадочного материала, микрочеренкование, биология растительных клеток *in vitro*, эмбриокультура, производство удвоенных гаплоидов, агробактериальная трансформация, сохранение генофонда садовых культур. Представлены вопросы интеграции биотехнологических и классических методов садоводства и селекции, позволяющих создавать, идентифицировать и поддерживать ценные генотипы.

Список сокращений

АБК – абсцизовая кислота

ГК – гиббереллиновая кислота

БАП – 6-бензиламинопурин

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИМК – индолилмасляная кислота

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

НУК – нафтилуксусная кислота

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РНК – рибонуклеиновая кислота

MS – питательная среда Мурасиге-Скуга

B5 – питательная среда Гамборга

Глава 1. Культура тканей, предмет и задачи, история

Культура тканей – метод культивирования изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях *in vitro*. Термин *in vitro* означает выращивание живого материала в асептических условиях на искусственных питательных средах с использованием пластиковых или стеклянных сосудов (рис. 1). Культуру клеток и тканей растений используют для теоретических и прикладных исследований, а также коммерческой деятельности.



Рис. 1. Картофель в культуре *in vitro*

Культивирование клеток и тканей – одно из направлений биотехнологии.

1.1. Биотехнология, основные направления развития биотехнологии

Технология – это совокупность методов, процессов и средств, используемых для производства, изготовления какого-то ценного продукта. Если для производства ценного продукта используют клетки живых организмов, говорят о *биотехнологии*.

Биотехнология – технологические процессы, осуществляемые с использованием клеток (растений, животных и микроорганизмов) и их компонентов (неклеточных систем).

Термин «биотехнология» звучит ново и современно, но сами биотехнологические методы использовали уже несколько тысячелетий до нашей эры для закваски теста, производства кисломолочных продуктов и виноделия. То, что именно микроорганизмы участвуют в этих процессах, обнаружил Луи Пастер (1822 - 1895 гг.) на примере пивоварения. Это стало возможным благодаря появлению достаточно качественных увеличительных линз. В качестве примеров продуктов биотехнологии можно назвать вакцину от бешенства (Л. Пастер), антибиотик из плесневого гриба (А. Флеминг, Х. Флори, Э. Чейн). В 1982 г. началось производство человеческого инсулина, синтезируемого генетически модифицированными бактериями. В настоящее время биотехнологические методы используют во многих сферах производства (таблица 1): для производства продуктов питания, биосинтеза медикаментов, ферментов и других веществ, переработки отходов с возможностью производства биогаза, в сельском хозяйстве.

Таблица 1. Направления биотехнологии и примеры получаемых продуктов

Направления производства	Примеры получаемых продуктов
Пищевая промышленность	молочнокислые продукты, пекарное производство, пивоварение, аминокислоты, белок одноклеточных организмов
Фармакология, производство медикаментов	антибиотики, ферменты, гормоны, аминокислоты, витамины
Ферментные технологии	мультиферментные пятновыводители, пектиназы для гомогенизации соков, сычужный фермент для производства сыра
Биосинтез химических веществ	этанол, ацетон, бутиловый спирт, глутаминовая кислота, лимонная кислота
Переработка отходов	переработка бумажных, нефтяных, токсичных, сельскохозяйственных, твердых бытовых отходов, сточных вод
Производство топлива	биогаз (смесь метана и углекислого газа)
Сельское хозяйство	силос, препараты для азотификации, биологические средства борьбы с болезнями и вредителями, клоны ценных растений, растения новых генотипов

1.2. Краткая история развития и направления использования культуры клеток и тканей

Клетки и ткани культивируют на питательных средах. Первыми были разработаны относительно простые питательные среды для культивирования микроорганизмов, затем – тканей животных (1902-1922 гг.). Питательные среды для культивирования клеток, тканей и органов растений были разработаны в 1922-60 гг. (В. Роббинс, В. Коте, Р. Готре, Ф. Уайт, Ф. Скуг, С. Миллер и др.). В 1940-60 гг. были открыты регуляторы роста растений, которые также добавляют в питательные среды, благодаря чему расширяются возможности использования культуры тканей растений (табл. 2).

Многие методы и термины, которые мы используем, разработала Раиса Георгиевна Бутенко (рис. 2). Она одна из первых в мире получила целое



Рис. 2. Раиса Георгиевна Бутенко (1920 – 2004 гг.)

растение из одиночной клетки.

Таблица 2. История развития культуры клеток и тканей растений

Год	Событие	Автор
1838-39	Клеточная теория	Schleiden, Schwann
1902	Первая попытка культуры тканей. Концепция тотипотентности	Haberlandt
1939	Растущая каллусная культура	White
1946	Развитие растения из побеговой точки роста	Ball
1950	Регенерация органов из каллуса	Ball
1954	Растение из одиночной клетки	Muir
1962	Питательная среда MS	Murashige - Skoog
1964	Микроклональное размножение орхидей	Morel
1964	Гаплоидное растение из мужского гаметофита	Guha
1970-71	Слияние протопластов, растения из протопластов	Power, Takebe

В настоящее время можно выделить **три направления использования культуры клеток и тканей растений:**

1. **Размножение и оздоровление растений** – получение клонов ценных генотипов, при этом возможно освобождение от вирусных инфекций.

2. **Использование в селекции** – получение новых генотипов. Например, создание удвоенных гаплоидов, спасение зародышей, соматическая гибридизация, трансгенез.

3. **Производство ценных веществ** – производство ценных вторичных метаболитов в культуре клеток и тканей.

Контрольные вопросы

1. Насколько давно биотехнологические методы используют для производства ценных продуктов?
2. В каких отраслях производства используют биотехнологические методы?
3. Приведите примеры продуктов, получаемых с помощью биотехнологических методов производства.
4. Назовите три основных направления использования культуры клеток и тканей растений.

Глава 2. Основы культивирования клеток и тканей растений

Культивирование клеток и тканей растений возможно благодаря их тотипотентности и способности к регенерации.

Тотипотентность - способность клетки дифференцироваться в клетку любой ткани организма.

Регенерация - морфогенетическая реакция на стимулирующие факторы, приводящая к образованию эмбрионов, органов или целых растений в культуре тканей.

Проявление тотипотентности растительных клеток и способности к регенерации позволяет получить целое растение из одной клетки. Каждая клетка растения несет в себе информацию о целом организме, так как этот многоклеточный организм когда-то сформировался из одной клетки – зиготы в результате митотических делений. Если поместить соматическую клетку в определенные условия, можно снова получить целое растение. Эти условия зависят от многих факторов. Успех культивирования клеток и тканей растений зависит от **генотипа** исходного растения, **возраста** растения, **ткани**, которую ввели в культуру, **физических факторов** культивирования (температуры, освещения, влажности), **длительности** культивирования, **состава питательной среды**.

2.1. Организация биотехнологической лаборатории

Для приготовления питательных сред, соблюдения стерильности и культивирования клеток и тканей в определенных условиях освещения и температуры нужны специально оборудованные помещения – биотехнологическая лаборатория. Это должны быть просторные, изолированные, хорошо освещенные помещения. Лаборатория состоит из нескольких зон (табл. 3).

Таблица 3. Помещения или зоны лаборатории

Помещение или зона	Необходимая мебель и оборудование
Моечная комната для мытья посуды	мойки с горячей и холодной водой; место для канистр с дистиллированной водой для ополаскивания лабораторной посуды после мытья; место для сушки посуды; шкафы для хранения чистой посуды;

		мусорное ведро
Помещение для приготовления питательных сред	для	лабораторные столы; холодильники для хранения компонентов питательных сред и реактивов; аналитические весы; рН-метр; магнитные мешалки; электрические плитки для подогревания растворов и сред; набор посуды (колбы, стаканы, мерные цилиндры, пробирки и др.); необходимый набор химических реактивов надлежащей степени чистоты (ХЧ, Ч, ЧДА)
Помещение стерилизации (автоклавирования)	для	автоклавы; стеллажи или столы; шкафы для хранения стерильных материалов
Помещение посадки растительных эксплантов на питательные среды	для на	ламинарные боксы; лабораторные столы, стеллажи; бактерицидные лампы; шкафы для материалов и оборудования
Культуральная (световая, климатическая) комната		стеллажи, на которых размещают контейнеры/чашки Петри с культивируемыми тканями растений; источники освещения со спектром, близким к дневному свету (от 3 до 10 кЛк); кондиционер для регуляции температуры (25 ± 2 °С) и влажности воздуха (70 %); темновое отделение – с тем же оборудованием без источника света

2.2. Безопасность при работе в лаборатории

При работе в биотехнологической лаборатории возможно воздействие таких неблагоприятных факторов, как **реактивы, горячие жидкости и предметы, пар, открытое пламя горелки, острые инструменты, электроприборы**. Чтобы сохранить здоровье и работоспособность, а также исправность приборов и порядок в лаборатории, необходимо соблюдать правила работы.

Правила работы в лаборатории:

- Находиться в лаборатории необходимо в спецодежде: в чистом халате и сменной обуви/бахилах. При выходе из лаборатории спецодежду снимают. Сумки и верхнюю одежду складывают в специально отведенном месте вне лаборатории.
- В лаборатории нельзя пить и есть.
- При входе в лабораторию нужно мыть руки. При выходе из лаборатории мыть руки ещё важнее.
- Реактивы нельзя нюхать и пробовать на вкус.
- Все емкости с реактивами должны быть подписаны. Вещества в неподписанных емкостях утилизируют.
- Пролитые на пол и стол химические вещества обезвреживают и убирают под руководством преподавателя.
- Если в процессе работы реактив попал на кожу, слизистую оболочку глаз или в рот, необходимо срочно поставить в известность преподавателя и при его непосредственном участии принять необходимые меры.
- Нужно соблюдать осторожность при работе с горячими предметами и жидкостями.
- При использовании спиртовок необходимо делать это в отдалении от легковоспламеняющихся жидкостей. Горящую спиртовку не оставляют без надобности, пламя гасят только колпачком.
- При незначительных ожогах (горячими предметами, жидкостями или паром) место ожога необходимо поместить под холодную воду, приложить флягу со льдом, поставить в известность преподавателя. При более тяжелых ожогах следует немедленно обратиться к врачу.
- Необходимо соблюдать осторожность при использовании стеклянной посудой, в случае необходимости осколки убрать с пола веником и совком, а со стола – бумажной салфеткой. В случае пореза нужно сначала внимательно осмотреть рану и извлечь из нее осколки стекла, если они есть, затем обмыть раненное место 2% раствором перманганата калия и завязать бинтом или заклеить лейкопластырем.
- Все работы, связанные с применением электроприборов, должны проходить под наблюдением преподавателя (лаборанта). При неисправности в работе электроприбора необходимо обратиться к преподавателю. Запрещается чинить приборы самостоятельно.
- Нельзя выносить за пределы лаборатории посуду и материалы.
- Приступать к работе можно только с разрешения преподавателя. Работу проводят в строгом соответствии с изучаемой методикой.

➤ Приступая к работе, необходимо: осознать методику работы, правила ее безопасного выполнения; проверить соответствие взятых веществ тем веществам, которые указаны в методике работы. При работе в лаборатории следует соблюдать следующие требования: выполнять работу нужно аккуратно, добросовестно, внимательно, экономно, быть наблюдательным, рационально и правильно использовать время, отведенное для работы.

➤ Во время занятий каждый студент ведет тетрадь лабораторных работ, в которую заносит следующие данные: название работы, дату проведения, цель работы, ход работы, полученные данные, выводы и необходимые зарисовки.

➤ По окончании работы следует привести рабочее место в порядок: помыть посуду, протереть поверхность лабораторного стола, выключить электрические приборы, помыть руки. Рабочее место оставляют в том виде, в котором оно было до работы.

➤ Если что-то непонятно, нужно спросить преподавателя!

Контрольные вопросы

1. На каких двух свойствах основано культивирование клеток и тканей растений?
2. Что такое тотипотентность?
3. Какие основные зоны должны быть в биотехнологической лаборатории?
4. С какими неблагоприятными факторами можно столкнуться при работе в лаборатории?
5. К кому необходимо обратиться, если что-то не понятно?

Глава 3. Принципы культивирования тканей и клеток

Отмечают **три принципа культивирования** клеток и тканей растений: использование искусственных питательных сред, соблюдение стерильности, соблюдение физических условий культивирования.

3.1. Использование питательных сред

Клетки, ткани и органы растений культивируют на питательных средах. Питательные среды представляют собой водный раствор солей макро- и микроэлементов, витаминов, аминокислот, источника углеводного питания (обычно сахарозы), при необходимости добавляют регуляторы роста, другие органические вещества и агар, если среда должна быть твердой. Значение рН раствора обычно доводят до 5,8 (рис. 3).

Азот, фосфор, серу, калий, кальций, магний и железо относят к макроэлементам, так как каждого их них в сухой массе растения содержится более 0,01%. Марганец, медь, цинк, бор, молибден, кобальт, йод – микроэлементы, их содержание в сухой массе растения менее 0,01%.

Каждый из макро- и микроэлементов необходим, недостаток одного из них не может быть восполнен избытком другого, так что все они должны быть в составе питательной среды. Для некоторых культур также «полезны» натрий, кремний, селен, алюминий, хлор. Элементы питания поступают в растение в виде ионов, поэтому в состав питательных сред входят водорастворимые соли.

В состав питательных сред входят витамины, это могут быть тиамин, рибофлавин, биотин, пантотеновая кислота, пиридоксин, аскорбиновая кислота, никотиновая кислота, фолиевая кислота и др. Также могут быть добавлены аминокислоты и другие органические вещества, например, жидкий эндосперм кокосового ореха или гидролизат казеина.

Для удобства приготовления сред заранее готовят концентрированные маточные растворы солей и витаминов, разливают их по пробиркам и хранят в морозильной камере. Обычно готовят 5 стоковых растворов: Stock 1 -

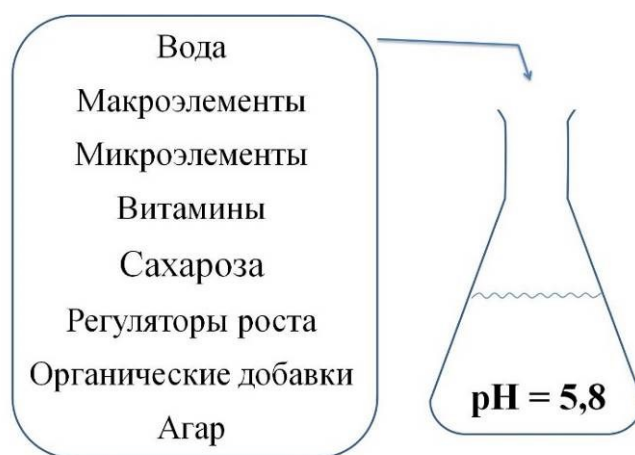


Рис. 3. Компоненты питательной среды для культуры клеток и тканей растений

раствор солей макроэлементов; Stock 2 - раствор солей микроэлементов; Stock 3 - раствор сульфата магния (готовят отдельно от 1 стока, чтобы не выпадал осадок малорастворимого сульфата кальция); Stock 4 - раствор хелатированной формы железа; Stock 5 - раствор витаминов.

Питательные среды различаются по составу и соотношению солей макро- и микроэлементов, витаминов. В зависимости от цели и культуры выбирают ту или другую среду. Часто питательные среды называют по фамилиям исследователей, разработавших и опубликовавший их состав. Сравните составы двух распространенных питательных сред В5 (читается «бэ пять»), разработанной Гамбург О.Л., и MS (читается «Мурасиге-Скуга», «эм эс»), составленной исследователями Т. Мурасиге (или Мурашиге) и Ф. Скугом (Приложение 2).

Основную долю элементов в составе растения составляют углерод, кислород, водород и азот. Первые три элемента растение получает из воздуха и гидролиза воды. Однако, когда на питательную среду помещают лишь небольшие части или клетки растения, они не могут питаться автотрофно, как целые растения, поэтому в качестве источника углеводного питания в среду добавляют сахар: сахарозу, глюкозу, мальтозу или др. Еще одна причина добавления углеводов - поддержание необходимого осмотического давления.

В зависимости от цели культивирования клеток и тканей, в питательную среду могут добавлять регуляторы роста растений, чаще всего это ауксины, цитокинины, гиббереллины. Однако во многих случаях используют питательные среды без добавления регуляторов роста.

Значение рН питательной среды влияет на поступление питательных веществ внутрь клетки, а также на активность инвертазы (фермента, расщепляющего сахарозу) и других ферментов. Значение рН питательной среды доводят до необходимого значения, добавляя щелочь или кислоту.

По консистенции питательные среды могут быть жидкими либо твердыми. Если необходимо приготовить твердую питательную среду, в нее добавляют гелеобразователь - агар или фитагель.

Готовую питательную среду стерилизуют автоклавированием. Если в состав среды входят компоненты, разрушающиеся при нагревании, такой раствор стерилизуют фильтрованием. Горячую среду разливают по пробиркам, чашкам или контейнерам, при остывании среда застывает.

3.2. Соблюдение стерильности

В состав питательной среды входят элементы минерального питания и органические вещества, на них прекрасно растут не только растительные клетки и ткани, но и микроорганизмы. Если на питательную среду попадут живые микроорганизмы, они будут потреблять питательные вещества и выделять в среду продукты своей жизнедеятельности, и состав питательной среды изменится. Поэтому при культивировании клеток и тканей растений необходимо соблюдать стерильность.

Стерильность – это отсутствие всех видов микроорганизмов на поверхностях, оборудовании, в продуктах.

Контаминация – это попадание микроорганизмов из окружающей среды в чистые культуры, питательные среды. Данное явление является большой проблемой при работе с клеточными культурами. Чтобы контаминация не происходила, нужно соблюдать правила работы в асептических условиях.

Источниками попадания микроорганизмов на питательную среду могут быть вода, растение-эксплант, воздух, руки, инструменты, посуда. Чтобы избежать попадания микроорганизмов на питательную среду, используют следующие способы стерилизации: высокая температура, стерилизующие растворы, ультрафиолет, радиация, фильтрация.

3.2.1. Стерилизация высокой температурой

Жидкости и предметы можно стерилизовать высокой температурой с помощью автоклавирования, сухожара, пламени горелки, электрического стерилизатора, фламбирования.

Автоклавирование производят с помощью специальных аппаратов — автоклавов. Принцип работы автоклава основан на стерилизации горячим паром, стерилизация осуществляется при давлении 1,5-2 атм. и температуре 121 °С в течение 15 мин. При нормальном давлении вода кипит при 100 °С, при дальнейшем подводе тепла температура воды не повышается, начинается интенсивное парообразование. Если сосуд закрыт герметично, то давление пара начинает расти, начинает расти и температура воды и пара. В сбалансированной системе процесс испарения прекращается, высокая температура убивает микроорганизмы и их споры. В автоклавах стерилизуют жидкости (например, питательные среды, воду), стеклянную посуду (чашки Петри, банки, пробирки), выдерживающий нагревание пластик (контейнеры). Емкости с жидкостями должны быть закрыты крышками, чтобы после автоклавирования их внутреннее содержимое оставалось стерильным, но

крышки нельзя закручивать плотно, чтобы емкость не разорвало при изменении давления. При стерилизации чашек Петри, контейнеров и т.п., их заворачивают в фольгу или крафтовую бумагу, также возможно использование специальных чехлов или пакетов. Металлические инструменты (пинцеты, скальпели, иглы) автоклавируют не рекомендуется во избежание коррозии металла, однако, если этого требуют обстоятельства, их автоклавируют, завернув в фольгу.

Пламя горелки или электрический стерилизатор (рис. 4) используют для стерилизации инструментов – пинцетов, скальпелей и др. Перед использованием необходимо дать инструментам остыть, чтобы не травмировать ткани эксплантов.

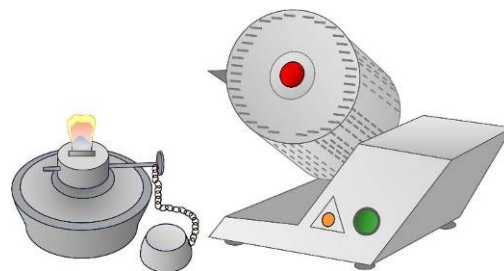


Рис. 4. Спиртовка и электрический стерилизатор

Сухожар, сушильный шкаф можно использовать для стерилизации большого количества сухой стеклянной посуды и металлических предметов, стерилизация проходит при температуре +160...+200 °С.

Фламбирование можно использовать для стерилизации металлических инструментов. Инструмент окунают в емкость с 95% спиртом и затем поджигают. При такой стерилизации необходимо соблюдать особую осторожность.

3.2.2. Стерилизующие растворы

Стерилизующие растворы используют для оперативной обработки и в случаях, если невозможно использовать другие методы стерилизации. В качестве стерилизующих растворов чаще всего используют этиловый спирт, изопропиловый спирт, соединения хлора, соединения тяжелых металлов, например, ртути.

Этиловый спирт в виде 70% раствора используют для стерилизации поверхностей и рук.

Хлорсодержащие и ртутьсодержащие вещества используют для поверхностной стерилизации эксплантов – частей растений, которые вводят в культуру и помещают на питательные среды. Микроорганизмы присутствуют на поверхности растений, сильный восковой налет или опушение задерживают их на своей поверхности. Микрофлора растений делится на эпифитную (развивается на поверхности растения и не наносит ему вреда), ризосферную (прикорневые симбионты) и фитопатогенную (вызывает заболевания растений).

Наиболее часто в биотехнологии используют стерилизующие вещества на основе хлора - гипохлорит натрия (NaClO) и гипохлорит кальция ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$) в концентрации 0,5 - 5% в течение 1 - 20 мин. Для стерилизации менее загрязненных объектов используют раствор хлорамина в концентрации 0,2-6-10% в течение 20-30 мин. Эффективность стерилизации повышается при добавлении в стерилизующий раствор поверхностно-активного вещества Твин-20 (1 капля на 250 мл раствора), который способствует снижению поверхностного напряжения и лучшему контакту стерилизующего раствора со всей поверхностью экспланта. Дезинфицирующие растворы на основе активного хлора быстро теряют стерилизующую способность на открытом воздухе за счет перехода хлора в газообразное состояние и его испарения, поэтому эти растворы используют сразу после приготовления.

Из стерилизующих растворов, содержащих ртуть, чаще всего используют 0,1% раствор сулемы (HgCl_2). При использовании ртутьсодержащих веществ не следует забывать об их токсичности для человека.

Поверхностная стерилизация эксплантов делится на три этапа:

1) Предварительная стерилизация – удаление лишних частей растения, мытье водопроводной водой с мылом. Этот этап позволяет избавиться от частиц пыли и почвы. После промывания в воде некоторые типы эксплантов, имеющие опушение или восковой налет (семена, листья, стебли), помещают в спирт на несколько секунд. Предварительной стерилизации можно не подвергать молодые проростки, бутоны и цветки, нежные ткани, которые могут повреждаться при механическом воздействии и не имеют прямого контакта с почвой.

2) Собственно стерилизация – части растений помещают в стерилизующий раствор. Для успешной стерилизации важны оптимальная концентрация раствора и время обработки (экспозиция). При недостаточной стерилизации микроорганизмы не погибнут, при избыточной – повредятся растительные ткани (рис. 5). Оптимальной считается, например, такая стерилизация: обработка

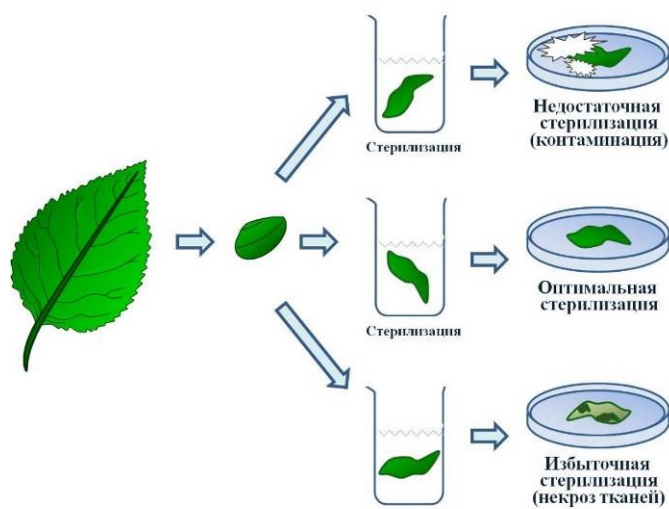


Рис. 5. Последствия недостаточной, оптимальной и избыточной стерилизации экспланта

эксплантов в 2% растворе гипохлорита натрия (NaOCl) с добавлением 2-3 капель поверхностно активного вещества Твин 20 в течение 10 минут.

3) Трехкратное промывание эксплантов в автоклавированной воде – этот этап нужен, чтобы смыть остатки стерилизующего раствора (рис. 6), иначе остатки агрессивного стерилизующего вещества вызовут некроз растительных тканей.



Рис. 6. Стерилизация растительного материала

Если микроорганизмы находятся не только на поверхности, но и внутри тканей экспланта, получить чистую культуру сложно. Добавление антибиотиков или фунгицидов в питательную среду может помочь, но часто недостаточно эффективно и может угнетать растительные ткани.

Одна из проблем в культуре тканей растений – мелкие насекомые и паукообразные, в основном трипсы и клещи. Насекомые могут попасть в лабораторию с растительным материалом, персоналом, семенами и т.д. Основным источником насекомых в культуре *in vitro* могут стать крупные бутоны некоторых растений, например, лука, внутри которых насекомые могут пережить стерилизацию, а также экспланты стеблей и листьев, покрытые опушением или восковым налетом. Клещей и трипсов сложно обнаружить невооруженным глазом, их присутствие в асептической культуре выдают бактериальные или грибные отпечатки, оставляемые ими на питательной среде. Контейнеры и чашки Петри, в которых обнаружены насекомые, необходимо удалять из лаборатории во избежание перекрестной контаминации.

3.2.3. Стерилизация ультрафиолетом

Кварцевые лампы используют для стерилизации воздуха и поверхностей. Существует два основных типа облучателей: облучатель открытого типа и рециркулятор. Открытые лампы-облучатели используют для стерилизации поверхностей и воздуха внутри ламинарного бокса перед

работой и после работы в нем. При использовании рециркулятора происходит засасывание воздуха из помещения в корпус прибора, стерилизация ультрафиолетом внутри корпуса, после чего воздух вновь возвращается в лабораторию. При работе данного типа облучателя в соответствии с требованиями техники безопасности возможно нахождение людей в помещении лаборатории. При работе облучателя открытого типа продолжительное нахождение людей в помещении во время работы прибора запрещено из-за риска возникновения ожогов кожи и сетчатки глаз.

3.2.4. Стерилизация радиацией

Гамма-излучение применяют в специальных производственных помещениях для стерилизации одноразового пластика (пластиковых чашек Петри, шприцов). В лабораторию закупают уже стерильные упакованные предметы.

3.2.5. Стерилизация фильтрацией

Фильтры применяют для стерилизации воздуха в ламинарном боксе. **Ламинарные боксы** предназначены для создания асептических условий во время посадки/пересадки эксплантов на питательную среду. Стерильность внутри ламинара создается за счет тока воздуха, проходящего через специальную систему фильтров, и поступающего на рабочую поверхность направленном потоком (рис. 7). Существуют модели ламинарных боксов с вертикальным и горизонтальным воздушным потоком.

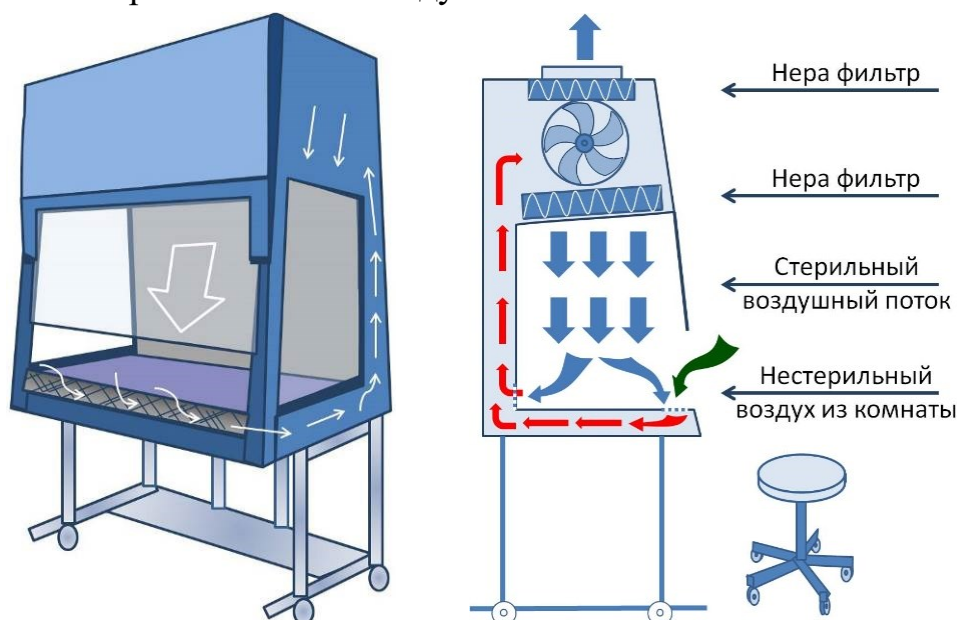


Рис. 7. Внешний вид и устройство ламинарного бокса с вертикальным воздушным потоком, стрелками отмечено направление движения воздуха

Перед работой внутреннюю часть ламинара необходимо обработать ультрафиолетом, для этого включают бактерицидные лампы на 15-25 минут,

после их выключения включают воздушный поток и ждут 1-2 минуты, затем обрабатывают стол и внутренние поверхности стенок ламинара 70% этанолом. Руки и все предметы, вносимые в ламинар, также обрабатывают 70% этанолом. Рабочая зона не должна быть переполнена, это снизит эффективность воздушного потока. При работе в ламинаре старайтесь не наклоняться и не проводить руками над открытыми контейнерами с питательной средой, эксплантами и инструментами.

По окончании работы все предметы убирают из ламинара, рабочую поверхность и стенки обрабатывают спиртом, закрывают ламинар, выключают воздушный поток включают ультрафиолетовую лампу на 20 минут.

Фильтры также применяют для стерилизации растворов. Стерилизация питательных сред может осуществляться двумя способами: термическая стерилизация и холодная фильтрующая стерилизация. Термическая стерилизация осуществляется в автоклаве при давлении 1,5-2 атм. и температуре 120 °С в течение 15 мин. При наличии в составе питательной среды компонентов, которые разрушаются при нагревании (некоторые витамины, антибиотики, гиббереллины), среду пропускают через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Также можно отдельно стерилизовать через фильтр растворы термолабильных веществ, и затем добавлять их в негорячую проавтоклавированную среду в стерильных условиях ламинарного бокса.

Чтобы минимизировать риск контаминации, необходимо неукоснительно следовать правилам работы в лаборатории: перед работой в лаборатории нежелательно работать в поле или теплице, находиться в лаборатории необходимо в халате и сменной обуви или бахилах, длинные волосы рекомендуется собрать в прическу, перед работой в лаборатории необходимо тщательно вымыть руки с мылом, уделяя внимание пространству под ногтями. Микроорганизмы могут попасть в лабораторию с потоками воздуха, поэтому важно исключить сквозняки. Вентиляцию лаборатории осуществляют принудительную, нельзя открывать окна, чтобы проветрить помещение.

При несоблюдении правил работы на питательной среде будут расти грибы и бактерии, при правильной работе - клетки, ткани и органы растений.

3.3. Соблюдение физических условий культивирования

К физическим условиям культивирования относят температуру, свет (интенсивность, спектр, фотопериод), влажность, соотношение воздух/среда в культивационном сосуде, расстояние между эксплантами на питательной

среде, плотность клеточной суспензии, скорость перемешивания клеточной суспензии. Значение каждого из этих факторов определяет результат культивирования клеток и тканей растений.

Клетки, ткани и органы растений в культуре *in vitro* культивируют в световой (климатической) комнате, климатической камере, термостате или на шейкере.

В климатической комнате контейнеры, чашки или пробирки располагают на стеллажах, для освещения используют люминисцентные лампы белого света либо светодиодные лампы белого, красного и синего света. В настоящее время в большинстве лабораторий в световых комнатах установлены лампы белого света, но есть устойчивая тенденция перехода на светодиоды. Необходимо отметить, что оптимальный спектр для разных культур может различаться, а соотношение светодиодных ламп красного и синего света можно установить разное, например, 50:50 или 30:70. Специальный таймер контролирует фотопериод, то есть продолжительность светлого периода суток. Обычно устанавливают фотопериод 16 часов день, 8 часов ночь.

Оптимальная интенсивность освещения для большинства культур составляет 1000–4000 лк. Но для некоторых целей необходимо культивирование в темноте, например, изолированные микроспоры капусты, моркови, баклажана культивируют в темноте до появления эмбриоидов. Каллус часто получают в темноте или при небольшом освещении, интенсивность освещения влияет на плотность, окраску каллуса и его способность к морфогенезу.

Необходимая температура в световой комнате поддерживается с помощью кондиционера, оптимальная температура для большинства культур +24...25°C. В ряде случаев клетки и ткани необходимо культивировать при повышенной или пониженной температуре. Например, для получения удвоенных гаплоидов рапса и капусты изолированные микроспоры 2 суток инкубируют при температуре +33°C в термостате, а для получения удвоенных гаплоидов перца пыльника 7 суток выдерживают при температуре +9°C в холодильнике.

Клетки, ткани и органы растений можно культивировать в чашках Петри, пробирках, пластиковых контейнерах, стеклянных банках или колбах разного объема. Вполне логично использовать чашки Петри для небольших эксплантов (пыльников, каллуса) и сосуды большего объема для регенерации целых растений. Крышка, закрывающая культивационный сосуд, может быть сделана из фольги, прозрачной пленки или пластика, из ваты и марли, что будет влиять на освещенность внутри сосуда.

Культивирование эксплантов в жидкой питательной среде часто происходит на шейкере, при этом устанавливают определенную интенсивность движения платформы. Так, для получения клеточной суспензии из каллуса необходимо интенсивное перемешивание 100-120 об./мин. Для спасения зародышей после отдаленной гибридизации незрелые семена надсекают и культивируют в жидкой среде при 60-80 об./мин. При получении удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор капусты и моркови, суспензию микроспор сначала инкубируют в покое, а после появления видимых эмбриоидов - на шейкере при 80 об./мин.

Плотность клеточной суспензии – количество клеток в единице объема среды – обязательно учитывают при получении удвоенных гаплоидов в культуре изолированных микроспор. Для капустных культур оптимальной является плотность 40 000 шт. микроспор на мл жидкой среды, для баклажана – 500 000 шт./мл.

Лабораторная работа № 1. Приготовление питательной среды Мурасиге-Скуга

Цель: приготовить 1 л питательной среды Мурасиге-Скуга с добавлением 30 г/л сахарозы, 0,1 мг/л ИУК и 0,5 мг/л БАП для активации прорастания почек мяты (лабораторная работа № 2) и разлить ее по контейнерам.

Ход работы:

1. Достать из морозильной камеры и разморозить заранее приготовленные стоковые растворы 1, 2, 3, 4, 5.
2. Банку или мерный стакан объемом 1000 мл заполнить бидистиллированной водой примерно на 2/3 объема. Поставить банку на магнитную мешалку и поместить в неё магнитный якорь.
3. Последовательно добавить в стакан:
 - 1) Stock 1 (раствор солей макроэлементов) – 50 мл;
 - 2) Stock 2 (раствор солей микроэлементов) – 5 мл;
 - 3) Stock 3 (раствор сульфата магния, отдельный сток готовят, чтобы не выпадал в осадок малорастворимый сульфат кальция) – 10 мл;
 - 4) Stock 4 (раствор сульфата железа, отдельным стоком готовят хелатированную форму железа, более доступную для растений) – 10 мл;
 - 5) Stock 5 (раствор витаминов) – 1 мл.
4. Включить аналитические весы. Сухие вещества взвешивать на глянцевой бумаге или в пластиковых чашках. Каждый компонент добавлять в раствор после полного растворения предыдущего.

Добавить в раствор:

- 1) 100 мг миоинозитола;
- 2) 30 г сахарозы.

5. С помощью автоматической пипетки-дозатора добавить 0,1 мг/л ИУК и 0,5 мг/л БАП.

6. Бидистиллированной водой довести объем раствора до 1 л.

7. Включить рН-метр, снять колпачок с электрода, промыть шарик электрода дистиллированной водой из промывалки. Поместить электрод в раствор так, чтобы он не касался стенок банки. Добавляя щелочь или кислоту довести значение рН до 5,8. Достать электрод из раствора, промыть дистиллированной водой из промывалки, надеть на него колпачок с заполняющим раствором.

8. Вытащить магнитный якорь длинным пинцетом.

9. Добавить 7 г агара (агар при комнатной температуре не растворяется).

10. Неплотно закрыть банку крышкой.

11. Подписать и наклеить этикетку.

12. Автоклавировать 15 мин при температуре 121°C (автоклавирование будет продолжаться около 1,5 ч).

Ход работы схематично представлен на рисунке 8.

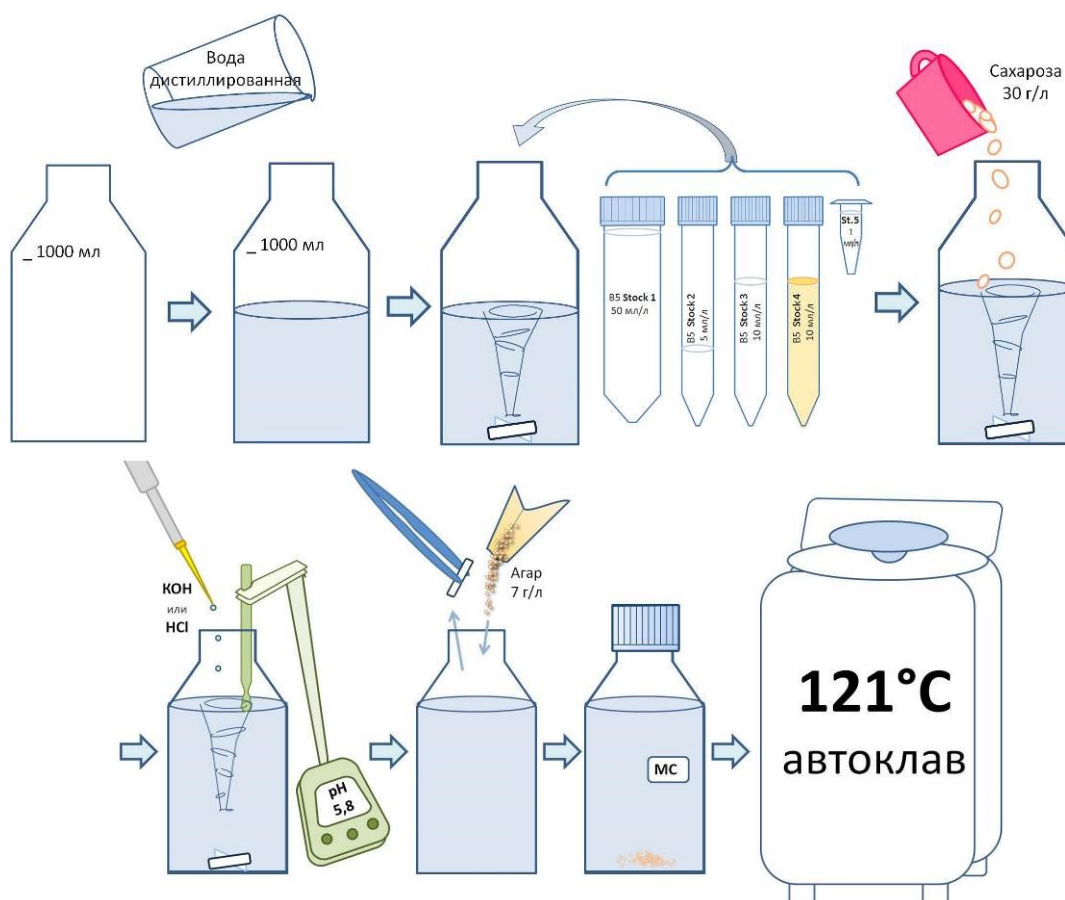


Рис. 8. Схематичное изображение процесса приготовления питательной среды

13. Подготовить ламинарный бокс к работе: включить ультрафиолет на 20 минут, после выключения кварцевой лампы включить свет и воздушный поток, открыть ламинар, внести в ламинар салфетку и пульверизатор с 70% этанолом, обработать руки, салфетку, пульверизатор, поверхности стола и стенок ламинара 70% этанолом.

14. Внести в ламинар банку с автоклавированной питательной средой, остывшей до температуры около 50°C, автоклавированные контейнеры и автоклавированные крышки, упакованные в фольгу или крафт-бумагу. Все предметы, вносимые в ламинар, обработать 70% этанолом.

15. Достать контейнеры, разлить в них питательную среду. Каждый контейнер с питательной средой размещать таким образом, чтобы не проносить над ним руки и другие предметы. Контейнеры с застывающей средой не встряхивать и не передвигать.

16. После полного застывания питательной среды закрыть контейнеры крышками, вынести из ламинара и подписать.

17. Вынести из ламинара все предметы, обработать поверхности стола и стенок ламинара 70% этанолом, закрыть ламинар, выключить воздушный поток, включить ультрафиолетовую лампу на 20 минут.

18. Помыть посуду изнутри и снаружи, используя губку и ершик. Сполоснуть посуду дистиллированной водой и разместить ее для просушки.

Контрольные вопросы

1. Что входит в состав питательной среды для культивирования клеток и тканей растений?
2. Зачем в состав питательной среды добавляют сахарозу?
3. Почему необходимо соблюдение стерильности при культивировании клеток и тканей?
4. Источники попадания микроорганизмов на питательную среду.
5. Как стерилизуют питательную среду?
6. Почему при автоклавировании жидкости не выкипают?
7. Как стерилизуют воздух в ламинарном боксе, руки, инструменты, эксплант?

Глава 4. Типы культур тканей растений

В зависимости от цели работы в культуру вводят разные части растений, эти части называют эксплантами (рис. 9). Эксплант - клетка, ткань или орган, изолированные и помещенные на искусственную питательную среду для роста или поддержания жизнеспособности.

Типы эксплантов:

- ❖ Органы (узлы, почки, бутоны, завязи, семязачатки, пыльники);
- ❖ Ткани (меристемы, высечки листа, фрагменты стеблей, фрагменты гипокотилей проростков, кусочки корнеплода, части цветка);
- ❖ Клетки (протопласты, микроспоры), группы клеток (клеточная суспензия);
- ❖ Эмбриокультура (культивирование зрелых или незрелых зародышей)

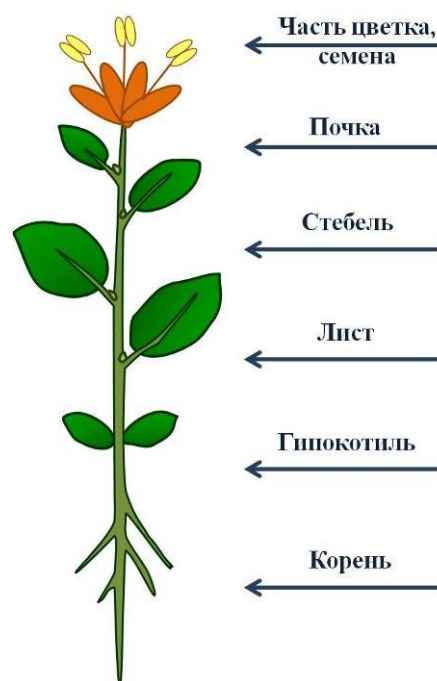


Рис. 9. Части растения, инокулируемые на питательную среду

4.1. Культивирование существующих меристем

При культивировании семян, узлов, почек и меристем можно получить быструю регенерацию целых растений или побегов. Эти побеги можно микрочеренковать – разделить на части, включающие узел с почкой и поместить эти части на свежую питательную среду (рис. 10). Это один из способов микроклонального размножения.

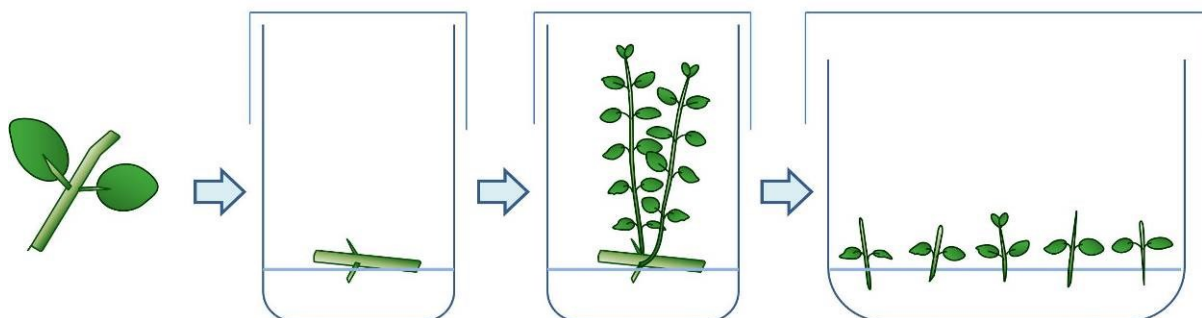


Рис. 10. Микрочеренкование мяты

4.2. Получение каллуса и клеточной суспензии

Часто эксплант вводят в культуру для получения каллуса. Получение каллуса - первый этап многих экспериментов по культивированию изолированных тканей растений. **Каллус** — ткань, образующаяся

неорганизованным делением клеток растений. Характерные черты клеток каллуса – большая центральная вакуоль и ядро клетки, смещенное в сторону. Клетки каллуса отличаются между собой размером, формой, пигментацией, в отдельных случаях экспрессией генов.

В отличие от клеток каллуса **недифференцированные** меристематические клетки – округлые, маленькие, в них отсутствует видимая вакуоль и имеется крупное центральное ядро. Меристемы обеспечивают рост растения делением клеток. Иногда меристематические клетки возникают в массе клеток каллуса и называются меристематическими областями. Меристематические области могут давать начало адвентивным корням, побегам или соматическим эмбриоидам.

Чтобы получить каллус, в качестве эксплантов можно использовать фрагменты корней, стеблей, листьев или цветков, то есть, теоретически, любую живую ткань растения (рис. 11). Экспланты поверхностно стерилизуют и помещают на питательную среду подходящего состава.

Для формирования каллуса необходимо механическое повреждение тканей, достаточное количество ауксинов и цитокининов.

Каллус формируется путем пролиферации, то есть разрастания ткани организма путем деления клеток. В норме клетки дифференцированных тканей не должны делиться, однако в определенных условиях это происходит. Так, каллус развивается в месте травмирования тканей растения, в этом случае его так и называют – раневой каллус. Раневой каллус можно увидеть у плодовых культур в месте срастания подвоя и привоя. Для того чтобы спровоцировать каллусообразование в культуре *in vitro*, эксплант тоже травмируют, то есть разрезают на фрагменты и помещают на питательную среду с добавлением регуляторов роста. Каллусообразование контролируют следующие факторы: количество и соотношение регуляторов роста в составе питательной среды, генотипа, возраста и условий выращивания донорного растения, тип экспланта,

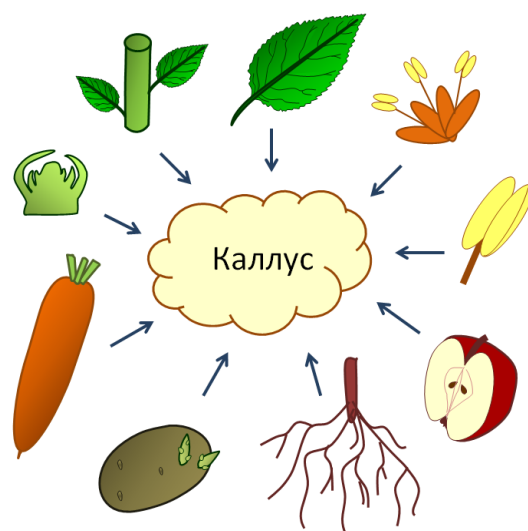


Рис. 11. Для получения каллуса в качестве эксплантов можно использовать практически любую живую ткань

условия культивирования (температура, консистенция питательной среды, свет и др.).

Пролиферация обуславливается изменением экспрессии генов клетки. Каждая клетка несет в себе генетическую информацию о целом организме, но в дифференцированных клетках работают те группы генов, которые обеспечивают выполнение определенных функций (например, фотосинтез в столбчатом мезофилле листа, транспорт углеводов во флоэме). Под воздействием экзогенных регуляторов роста, добавленных в питательную среду, одни группы генов репрессируются, другие активируются. В клетках начинают синтезироваться другие белки, происходят биохимические изменения. В результате изменяется морфология, внешний вид клеток. Клетка снова становится способной к делению.

Изучение научной литературы подтверждает, что не существует универсального метода получения каллуса разных видов растений. В связи с этим, говорят о видоспецифичности (различии в отзывчивости разных видов растений). В научных журналах можно найти сотни статей, описывающих исследования индукции каллусообразования с использованием различных комбинаций регуляторов роста, эксплантов, условий культивирования. Есть виды, которые особенно хорошо растут в культуре *in vitro*, у которых легко получить и каллус, и регенерацию. Такие виды (например, морковь, табак) часто используют в качестве модельных объектов при обучении и проведении исследований. С другой стороны, злаковые и хвойные культуры признаны наиболее сложными для культуры тканей.

В конце 1970-х и 1980-х многие исследователи сообщали о сильном влиянии генотипа на способность к регенерации в каллусной культуре. Была высказана идея о том, что некоторые генотипы не отзывчивы в культуре тканей. Однако в дальнейшем отдельные сорта, которые были признаны неспособными к регенерации в одной лаборатории, были признаны вполне отзывчивыми в других лабораториях, что поставило под сомнение эту идею.

Предполагают, что ядерные гены контролируют чувствительность к типу и концентрации регуляторов роста в питательной среде. Различия в отзывчивости разных генотипов (генотипспецифичность) также связаны с уровнем эндогенных гормонов, который контролируется генетически и эпигенетически. Поэтому эксплантаты разных растений одного сорта и даже гибрида на среде одного и того же состава могут реагировать по-разному.

Разные экспланты (листья, корни, пыльники, стебли и т.д.) одного растения на среде одного и того же состава также реагируют по-разному (тканеспецифичность). Вероятно, это происходит из-за различного распределения эндогенных гормонов в тканях растений.

Каллус состоит главным образом из рыхлых, крупных, сильно вакуолизированных клеток. Эти клетки могут быть дифференцированные, но при этом неорганизованные. Каллус может быть плотным и твердым, может быть рыхлым, различаться по цвету, может содержать области с группами так называемых компетентных клеток. Именно эти клетки способны формировать соматические эмбриониды или органы (побеги или корни).

Если кусочек каллуса поместить в колбу с жидкой питательной средой и культивировать на шейкере при постоянном покачивании, деления клеток будут продолжаться, группы клеток могут отделяться от рыхлого каллуса и получится клеточная суспензия (рис. 12).

Суспензионная культура клеток – тип культуры тканей, при котором клетки или агрегированные клетки размножают суспендированием в жидкой питательной среде.

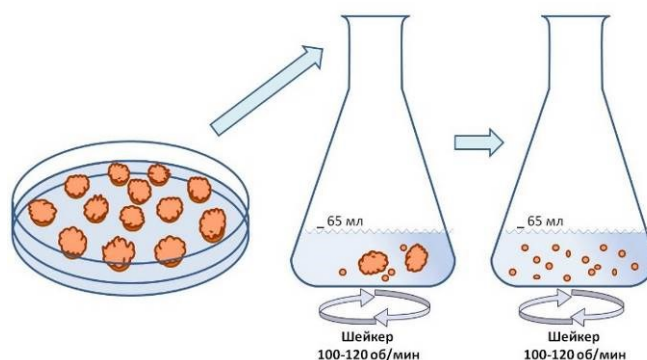


Рис. 12. Схема приготовления клеточной суспензии

4.3. Морфогенез в каллусной культуре

Управлять процессами морфогенеза в культуре тканей необходимо при реализации методов генетической трансформации растений, слияния протопластов, культуры пыльников и микроспор и т.д. Регенерация целых растений из клеток экспланта или клеток каллуса является ключевым этапом микроклонального размножения.

Теоретически все клетки растительного организма тотипотентны и способны к формированию полноценного растения, однако на практике не все клетки способны реализовать этот потенциал. Тотипотентность меристематических клеток реализуется в ходе их деления и дифференциации, тогда как тотипотентность специализированных клеток – посредством дедифференциации с последующей новой дифференциацией. Это означает, что ткань растения нужно поместить в особые условия для каллусообразования, а затем пересадить на питательную среду другого состава, чтобы из клеток каллуса формировались органы или зародышеподобные структуры (эмбриониды). В зависимости от генотипа, состава питательной среды, температуры, освещенности, частоты пересадки на свежие среды и других факторов возможны следующие пути развития каллусной клетки:

- онтогенез каллусной клетки, заканчивающийся ее старением и гибелью;
- утрата способности к дифференцировке, приобретение способности расти без гормонов;
- морфогенез, редифференциация и регенерация.

При пересадке каллуса на питательную среду другого состава можно наблюдать **морфогенез** - процесс формообразования растительных структур различного уровня. Это может быть цитогенез, гистогенез, эмбриогенез, органогенез (рис. 13).



Рис 13. Морфогенез в каллусной культуре

Цитогенез – появление специализированных клеток,

имеющих специфическое морфологическое строение, например, клеток, в которых запасаются вторичные метаболиты.

Гистогенез – формирование в каллусе различных тканей (элементов сосудистой системы – трахеи и трахеиды ксилемы, ситовидные трубки и клетки-спутницы флоэмы).

Эмбриогенез – формирование и развитие зародышеподобной структуры (эмбриоида). Эмбриоид и зародыш различаются по происхождению: зародыш (эмбрион) формируется из зиготы, а эмбриоид из клетки, не являющейся зиготой. Различают **прямой эмбриогенез** – формирование эмбриоидов непосредственно из клеток экспланта и **непрямой эмбриогенез** – формирование эмбриоидов из клеток каллуса. Выделяют следующие **стадии развития эмбриоида** (стадии развития зародыша такие же): глобулярная, сердцевидная, торпедо, семядольная (рис. 14).

Органогенез – формирование органов (геммогенез – развитие почки, ризогенез - развитие корня). Различают два типа органогенеза в культуре *in vitro* - **прямой и непрямой**. При непрямом органогенезе из экспланта сначала формируется каллус, а затем в каллусной массе образуются меристематические области, способные к формированию стеблей, корней и других органов. При прямом органогенезе стадия каллуса исключается и меристематические области формируются непосредственно в тканях

экспланта, что приводит к возникновению органов непосредственно из экспланта.

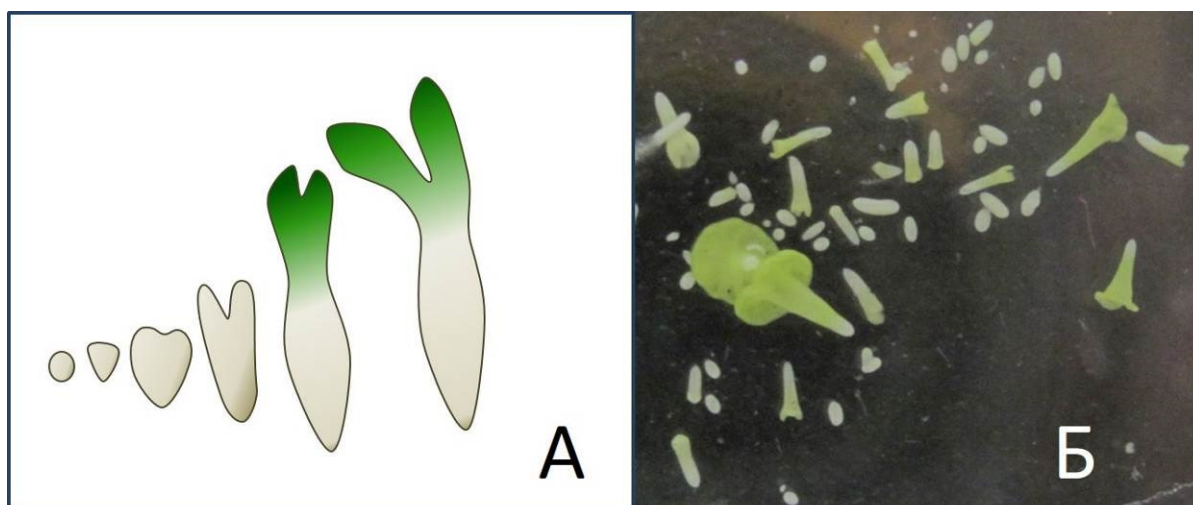


Рис. 14. А - Стадии развития эмбриоида: слева направо глобулярная, сердцевидная, торпедовидная, семядольная; Б - эмбриоиды капусты разных стадий развития

Контроль морфогенеза важен для направленного получения целого растения из каллуса и эксплантов. Различают гормональный и физиологический контроль морфогенеза. Классическая концепция гормонального контроля морфогенеза была выдвинута Скугом и Миллером в 1955 г. Согласно данной концепции, изменяя относительное содержание ауксинов и цитокининов, можно получить образование стеблей, корней или недифференцированный рост каллуса. В самом простом случае (табак) при сбалансированном соотношении ауксинов и цитокининов наблюдали индукцию и образование каллуса, при повышении уровня цитокининов по отношению к ауксинам формировались стеблевые почки, при высоком содержании ауксинов в среде наблюдали формирование корней.

В большинстве случаев формирование органов в культуре клеток можно объяснить гормональной теорией регуляции, но для целого ряда растений не удастся изменением баланса фитогормонов регенерировать почки или корни. Например, морфогенез *in vitro* в каллусах ряда злаков зависит от концентрации иных, помимо ауксинов и цитокининов, экзогенных фитогормонов: абсцизовой кислоты (Zur I, 2015), гиббереллиновой кислоты (Colebrook E.H., 2014), этилена (Kiviharju E., 2005). Кроме того, на взаимодействие гормонов при регуляции дифференцировки почек или корней могут влиять другие факторы, например, пурины, содержание сахаров и фосфатов, источник азота и другие компоненты среды.

4.4. Факторы, определяющие направление морфогенеза *in vitro*

Направление морфогенеза зависит от генотипа исходного растения, возраста растения, ткани, использованной в качестве экспланта, физических факторов культивирования (температуры, освещения, влажности), длительности культивирования, состава питательной среды.

Генотип растения оказывает огромное влияние на успех культуры *in vitro*. Различают видоспецифичность, сортоспецифичность и генотипспецифичность. Части растений разных видов и даже генотипов в пределах вида различаются по отзывчивости в культуре клеток и тканей. С этим связана необходимость разрабатывать протоколы микроклонального размножения для каждого вида и даже для каждого сорта. Регенерационная способность растения зависит от генетических особенностей (семейство, вид, сорт). Двудольные растения обычно легче образуют каллус и регенерируют, чем однодольные. Самыми отзывчивыми видами считаются табак и морковь, они традиционно служат модельными объектами для отработки методик в культуре *in vitro*.

Возраст материнского растения и экспланта имеет большое значение. Наилучшие результаты дают экспланты из тканей молодых, вновь формирующихся органов. Растения, вступившие в генеративную фазу, обычно имеют сниженный регенерационный потенциал в сравнении с растениями, находящимися в вегетативной фазе. Почки, взятые с растения, находящегося в состоянии покоя (поздняя осень или ранняя зима) труднее регенерируют в сравнении с почками, взятыми весной. Физиологический возраст экспланта является еще одним фактором, влияющим на органогенез. Например, у эхеверии на эксплантах молодых листьев возникают только корни, старых листьев – только побеги, а листья срединной формации образуют и корни, и побеги (Черевченко и др., 2008). К тому же во многих случаях старые ткани формируют каллус, который не способен к регенерации.

Сезон года может влиять на контаминацию и отзывчивость в культуре *in vitro*. Например, экспланты, взятые в весенний период активного роста побегов более отзывчивы, чем спящие почки. Данное явление связано с состоянием физиологического покоя, в котором зимой пребывают многие растения. Ткани в состоянии физиологического покоя, как правило, не отзывчивы в культуре тканей, пока не выполняются условия покоя.

Ткань, использованная в качестве экспланта. Способность к морфогенезу различна у разных тканей и органов одного и того же растения.

Например, для лилии лучшими эксплантами являются луковичные чешуи, а листья и стебли не дают положительного результата.

Размер и расположение экспланта также является фактором, определяющим успех микроклонального размножения. Чем меньше эксплант, тем меньшей регенерационной способностью он обладает. Оптимальная величина экспланта зависит от видовых особенностей растения-донора и свойств органа, из которого изолирован эксплант. Установлено, что размер первичного экспланта малины должен иметь размер 2 мм, при таких условиях 60% апикальных меристем регенерируют на питательной среде. Для хмеля этот показатель колеблется от 0,1 до 0,2 мм, а для лука и чеснока – от 0,5 до 0,8 мм. Для каждого вида растений существует минимальный критический размер экспланта – минимальная масса экспланта, при которой идет каллусогенез. При его уменьшении невозможно индуцировать образование каллуса. Он сильно варьирует у разных видов, например, экспланты из флоэмы корней моркови массой всего 3,8 мг вполне жизнеспособны для активного роста каллуса, тогда как масса аналогичного экспланта земляной груши слишком мала для индукции каллусогенеза. Это зависит от размеров и, следовательно, числа клеток у эксплантов разных видов растений.

Органы и ткани растений обладают полярностью, поэтому ориентация экспланта на поверхности питательной среды также может иметь значение.

Качество материнского растения. Экспланты, взятые с угнетенных растений со слабыми ростовыми процессами, развиваются значительно хуже, чем изолированные со здоровых растений. Условия культивирования материнского растения изменяют его физиологическое состояние, способствуя накоплению запасных веществ и регуляторов роста, что влияет на рост *in vitro*. Например, экспланты из растений, подготовленных в теплице или ростовой камере, обычно регенерируют лучше эксплантов из растений этого вида, выращенных в открытом грунте.

4.5. Микроклональное размножение

Микроклональное размножение - метод вегетативного размножения *in vitro*, позволяющий получить большое количество клонов исходного растения даже при ограниченном количестве исходного материала. Необходимое условие – разработка технологии для конкретной культуры, возможно даже сорта. Для микроклонального размножения необходимы дорогостоящее оборудование и материалы, поэтому выбор этого метода должен быть экономически целесообразным. Широкий интерес к использованию культуры тканей для массового клонирования декоративных

культур появился в 1960-х годах. Тогда к Тошио Мурасиге (одному из составителей питательной среды MS - Murashige & Skoog), который работал в Университете Калифорнии, обратился производитель посадочного материала герберы. Проблема производства посадочного материала многих декоративных культур (в том числе герберы) заключается в том, что растения с ценными интересными признаками часто являются гетерозиготами и при семенном размножении в потомстве наблюдается расщепление. В частности, у герберы это затрудняет производство выровненного посадочного материала с определенной окраской цветков.

Т. Мурасиге помог предприимчивому растениеводу, после чего занялся разработкой протоколов микрклонального размножения других декоративных растений. Вскоре многие производители посадочного материала декоративных культур организовали свои лаборатории.

Необходимо отметить, что фундаментальные исследования морфогенеза в культуре тканей растений проводили ещё в пятидесятых годах в Москве, этой работой руководила Раиса Георгиевна Бутенко¹. Многие термины и методики, которые мы сейчас используем и видим в учебниках, предложила именно она. Основное внимание при разработке технологий группа уделяла важнейшим сельскохозяйственным культурам - пшенице, кукурузе, рису и картофелю. Помимо микрклонального размножения, группа проводила работы по соматической гибридизации, отбору *in vitro* (клеточной селекции), получению ценных веществ в культуре клеток и тканей.

Р.Г. Бутенко (1964) и Т. Мурасиге (1974) независимо определили основные этапы процесса размножения *in vitro*.

Первый этап – стерилизация растительного материала, инокуляция эксплантов на/в питательную среду, инкубирование *in vitro*.

Второй этап – индукция побегообразования или соматических эмбриоидов. Как правило, добавление в среду цитокининов провоцирует прорастание множества побегов из уже существующих пазушных почек, или же происходит формирование эмбриоидов из клеток листьев, черешков или стеблей. Второй этап можно повторять несколько с использованием выращенного в стерильных условиях *in vitro* растительного материала для

¹ Раиса Георгиевна Бутенко в 1937 г. поступила в ТСХА, после окончания работала агрономом в совхозе под Ташкентом. В 1944 г. поступила в аспирантуру на кафедру ботаники ТСХА. Кандидатскую диссертацию на тему "Эмбриология диплоидных и экспериментально полученных полиплоидных форм капусты" защитила в 1948 г. Докторскую диссертацию по теме "Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений" защитила в 1963.

получения необходимого количества клонов. Но при этом важно учитывать, что при каждом субкультивировании увеличивается вероятность появления нежелательных нетипичных растений. Предпочтительно инокулировать на питательную среду эксплянты с существующими меристемами и использовать микрочеренкование либо прямой эмбриогенез, так как каллусообразование как промежуточная стадия увеличивает риск возникновения мутаций (особенно хромосомных aberrаций) и проявления соматональной изменчивости.

Третий этап – укоренение полученных растений. Обычно для этого полученные побеги помещают на питательную среду с добавлением ауксина.

Четвертый этап – адаптация (акклиматизация). На этом этапе растения с несколькими развитыми листьями и корнями осторожно извлекают из пробирки или контейнера, аккуратно отмывают растение от остатков питательной среды. Отрезают 2/3

длины корней и высаживают в торфяной или иной субстрат в кассеты либо горшки. Первые несколько дней (3 - 5) растениям необходимы условия повышенной влажности и температура около 24 °С. Для этого их накрывают пленкой или нетканым материалом (рис. 15). Обычно через 3-5 дней растения адаптируются и могут переносить условия климатической комнаты или теплицы (рис. 16).

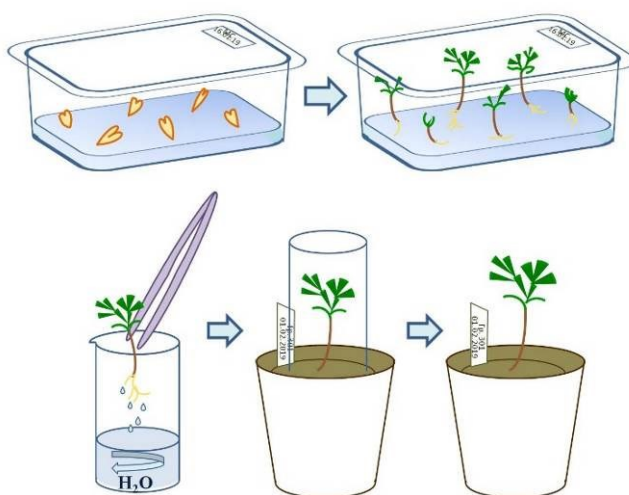


Рис. 15. Адаптация растений-регенерантов



Рис. 16. Непрямой эмбриогенез, доращивание и акклиматизация в культуре тканей моркови

Микроклональное размножение имеет преимущество для многих растений, но не для всех. **Основным преимуществом** является высокий коэффициент размножения. Это значит, что, имея хоть одно ценное растение, можно достаточно быстро получить тысячи идентичных клонов. Другое преимущество размножения *in vitro* – получение растений, свободных от вирусной инфекции. **К недостаткам** можно отнести использование большого количества дорогостоящего лабораторного оборудования и реактивов, а также генотипспецифичность (необходимость оптимизировать технологию для каждого вида и даже сорта). Так что в большинстве случаев растение целесообразнее и эффективнее размножать семенами или вегетативно черенками, отводками. Не существует единого простого протокола, который можно было бы универсально применять для микроклонального размножения различных видов растений и даже разных сортов одного вида.

Микроклональное размножение широко используют для получения посадочного материала декоративных, плодовых, ягодных и овощных культур, которые затруднительно размножать другими способами (фаленопсис, антуриум, голубика), только желательных женских растений (финиковая пальма) или мужских растений (тополь, спаржа).

Способы микроклонального размножения растений (рис. 17):

❖ **Активация существующих меристем.** В качестве эксплантов используют почки либо апикальные меристемы, узлы побегов.

❖ **Прямой ограногенез** – формирование органов (желательно побегов) непосредственно из соматических клеток экспланта (высечек листа, фрагмента стебля или корня). Побеги микрочеренкуют и укореняют.

❖ **Прямой эмбриогенез** - формирование эмбриоидов (зародышеподобных структур) непосредственно из соматических клеток экспланта (высечек листа, фрагмента стебля или корня). Эмбриоиды прорастают в растения, аналогичные сеянцам.

❖ **Непрямой ограногенез** – формирование органов (желательно побегов) из каллуса, сформировавшегося из тканей экспланта.

❖ **Непрямой эмбриогенез** - формирование эмбриоидов (зародышеподобных структур) из клеток каллуса, сформировавшегося из тканей экспланта. Эмбриоиды прорастают в растения, аналогичные сеянцам.

❖ **Эмбриогенез в суспензионной культуре клеток** - формирование эмбриоидов из клеток, культивируемых во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде.

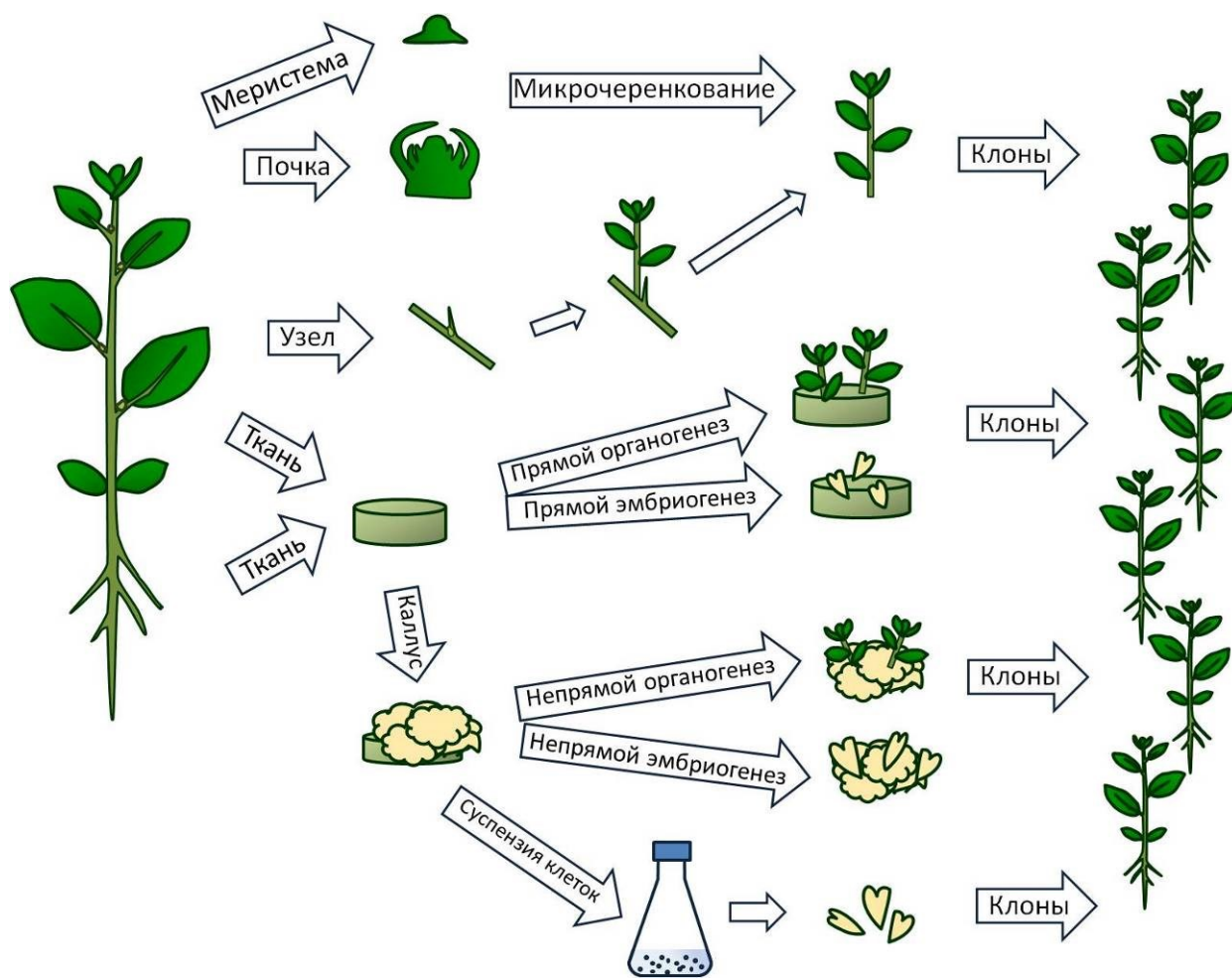


Рис. 17. Способы микроклонального размножения

4.6. Культура меристем в производстве растений, свободных от вирусной инфекции

Вирусные заболевания широко распространены и встречаются практически повсеместно. Вирусы – мельчайшие неклеточные организмы, которые могут воспроизводиться только внутри живых клеток, используя генетический материал хозяина для собственного размножения. Инфицирование вирусами редко приводит к гибели растения, но неизбежно приводит к его угнетению и снижению продуктивности. Вирусные заболевания, как правило, сопровождаются пятнистостью (мозаичностью), скручиванием или морщинистостью листьев, могут даже проходить бессимптомно. Передача вирусной инфекции осуществляется различными путями: насекомыми с колюще-сосущим ротовым аппаратом (тля, трипсы), при механическом контакте здоровых и инфицированных растений, инструментами и т.д.

Большинство вирусов не передаются семенному потомству, а от тех, которые проникают в семена можно избавиться, прогревая семена при 52°C в

течение 3 суток. Особенно вредоносны вирусы для вегетативно размножаемых культур. Из года в год они сохраняются и накапливаются в клубнях картофеля и черенках плодовых, распространяются с посадочным материалом и в конечном итоге приводят к вырождению и гибели сорта.

Профилактика и борьба с вирусными заболеваниями сводится к использованию здорового посадочного материала. Для того чтобы избежать распространения вирусной инфекции проводят диагностику посевного материала картофеля, маточных растений плодовых, ягодных и декоративных культур.

Апикальная меристема и первые листовые примордии побега, как правило, не связаны с проводящей системой растения и свободны от вирусной инфекции. Если использовать меристемы инфицированных растений для микрклонального размножения, то можно получить оздоровленный, безвирусный посадочный материал. Morel and Martin (1952) описали работу по использованию культуры меристем для получения безвирусных растений георгины. С помощью этого метода получают оздоровленный посадочный материал многих значимых культур, например, картофеля (рис. 18), земляники.

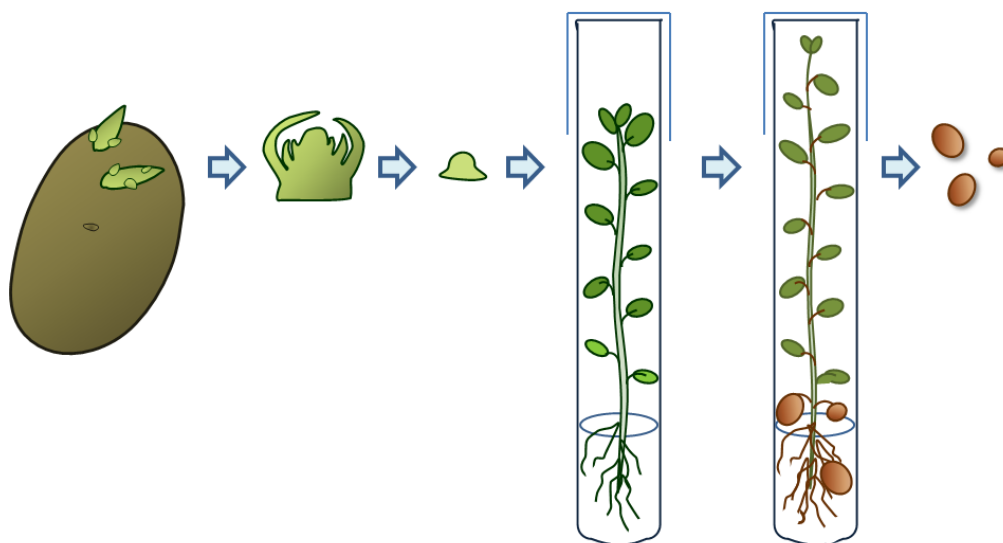


Рис. 18. Культура меристем для получения микроклубней картофеля

Вирусы могут распространяться в растении как по проводящей системе, так и непосредственно от живой клетки к клетке и присутствовать даже в меристемах. Поэтому для ряда культур (картофель, лилия) в сочетании с культурой меристем используют термотерапию – воздействие на растения повышенной температурой, или химиотерапию – добавление в питательную среду препаратов-ингибиторов вирусов (виразол, хитозан, интерферон, циклоферон). Можно применять сочетание этих двух методов.

Описанный метод не всегда позволяет избавиться от инфекции, так что полученные пробирочные растения необходимо протестировать на наличие/отсутствие вирусов с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР) либо иммунохроматографического анализа (ИХА).

Лабораторная работа № 2. Активация меристем мяты

Регенерацию легче получить, если использовать в качестве эксплантов части растения с существующими меристемами, например, узлы, почки, семена. В данной лабораторной работе это будут узлы мяты, из пазушных почек в течение 2-3 недель формируются побеги, которые можно микрочеренковать (Лабораторная работа № 4).

Цель: освоение навыка работы в асептических условиях ламинара и инокуляции растительных эксплантов на питательную среду для культуры *in vitro*. Индуцировать побегообразование из пазушных почек узлов мяты. Изучить влияние режима поверхностной стерилизации на эффективность стерилизации и состояние экспланта.

Ход работы:

1. Приготовить питательную среду MS с добавлением 30 г/л сахарозы, 0,1 мг/л ИУК, 0,5 мг/л БАП и 7 г/л агара, разлить ее по контейнерам (см. лабораторную работу № 1).

2. Подготовить ламинар к работе - включить бактерицидную лампу на 20 минут, после автоматического выключения бактерицидной лампы включить воздушный поток и свет. Открыть ламинарный бокс и обработать поверхности 70% спиртом с помощью пульверизатора. Внести в ламинар инструменты для работы: электрический стерилизатор или спиртовку с зажигалкой, пинцеты, скальпели, банки с автоклавированной водой, матрасики (автоклавированная бумага или чашки Петри), контейнеры с питательной средой. При внесении в ламинарный бокс все предметы обработать 70% спиртом.

3. Подготовить побеги мяты: удалить листья, не травмируя почки, вымыть побеги с мылом, промыть проточной водопроводной водой.

4. Приготовить по 300 мл растворов для 3 вариантов стерилизации:

- 1) 5% гипохлорит натрия с добавлением 1-2 капли Твин 20;
- 2) 2% гипохлорит натрия с добавлением 1-2 капли Твин 20;
- 3) 0,5 % гипохлорит натрия с добавлением 1-2 капли Твин 20

5. Поместить побеги в стерилизующие растворы, засечь время экспозиции – 10 минут. При необходимости побеги разрезать, чтобы они были полностью погружены в стерилизующий раствор.

6. Внести стаканы с побегами в стерилизующем растворе в ламинарный бокс, обработать стаканы спиртом.

7. После окончания времени стерилизации (10 мин.) стерильным пинцетом переложить мяту в банку с дистиллированной водой на 1 минуту, затем в следующую банку на 5 минут и в третью на 10 минут.

8. Стерильными инструментами достать побег мяты на стерильный матрасик, обновить места срезов, разрезать побеги на узлы.

9. Открыть контейнер, разместить узлы мяты по 4-5 шт. горизонтально на поверхности питательной среды. Закрыть контейнер крышкой.

10. Вынести контейнер из ламинара, наклеить этикетку, подписать карандашом культуру, номера группы, фамилию и дату.

11. Разместить контейнеры с мятой в световой комнате, культивировать при температуре 24°C и фотопериоде 16 ч. день, 8 ч. ночь.

12. Через 3-7 дней оценить эффективность стерилизации, наличие/отсутствие на питательной среде колоний бактерий и грибов.

Лабораторная работа № 3. Культура меристем картофеля

Существует множество заболеваний картофеля, вызываемых вирусами. Посадочный материал высоких репродукций (оригинальный, элитный) должен быть свободен от вирусов 5 типов: Y, L, X, M, S. Лаборатории, занимающиеся производством микроклубней - безвирусного посадочного материала картофеля, постоянно поддерживают коллекцию безвирусного материала *in vitro* многих популярных сортов. Новые сорта вводят в культуру *in vitro* при необходимости.

Как правило, чтобы получить растение, не содержащее вирусов, в культуру вводят эксплант, включающий меристематический бугорок и два-четыре листовых примordia. Для повышения вероятности успеха используют апекс побега, который находится в стадии быстрого роста. В таком случае вирусы не успевают проникнуть в активно делящиеся клетки меристемы. Экспланты в данной работе очень маленькие и нежные, для их выделения следует использовать стереомикроскоп (бинокуляр). Чтобы меристемы не высыхали, растительный материал помещают на влажную фильтровальную бумагу. Срезы должны быть сделаны тонкими и острыми скальпелями, инструменты не должны быть горячими.

Цель: освоение навыка подготовки экспланта и инокуляции его на питательную среду и культивирования *in vitro*, работы в асептических условиях ламинара. **Задачи:** получить побеги из меристем картофеля; изучить влияние размера экспланта на эффективность инокуляции растительного материала на среду.

Ход работы:

1. Помыть клубни картофеля, поместить в теплое место на 2 недели для активации меристем.

2. Приготовить питательную среду MS с добавлением 30 г/л сахарозы и 7 г/л агара, разлить по чашкам Петри.

3. Подготовить ламинар к работе. Поместить в ламинар электрический стерилизатор или спиртовку с зажигалкой, пинцеты, скальпели, банки с автоклавированной водой, матрасики (автоклавированная бумага или чашки Петри), чашки Петри с питательной средой.

4. Срезать меристемы с клубней, и поместить их в чайные ситечки. Поверхностно стерилизовать меристемы в чайных ситечках в 2% растворе гипохлорита натрия с добавлением 1-2 капель Твин 20, затем переместить ситечки с меристемами в банку с автоклавированной водой на 1 минуту, во вторую банку с автоклавированной водой на 5 минут и в третью банку на 10 минут.

5. Стерильными инструментами достать меристемы из чайных ситечек, обновить места срезов и разместить на поверхности питательной среды, соблюдая полярность. Закрыть чашку, замотать по окружности пленкой, подписать, разместить в световой комнате.

6. Через 2 недели извлечь проросшие побеги из чашек Петри и разместить в пробирках. Полученные побеги можно микрочеренковать (Лабораторная работа № 4). Если побеги не пересаживать на свежую питательную среду, примерно через 5 недель культивирования в пробирке будут формироваться микроклубни.

Лабораторная работа № 4. Микрочеренкование побегов мяты или картофеля

Один из способов микроклонального размножения – активация существующих меристем с последующим микрочеренкованием. В культуру вводят узлы, почки или меристемы. Через 3-4 недели сформировавшиеся побеги извлекают из культивационного сосуда и микрочеренкуют – разрезают на части, включающие узел с почкой. Микрочеренки помещают на

свежую питательную среду, из почек микрочеренков формируются новые побеги, которые через несколько недель снова можно микрочеренковать.

Цель: микроклонально размножить мяту или картофель микрочеренкованием.

Ход работы:

1. Приготовить питательную среду MS с добавлением 30 г/л сахарозы и 7 г/л агара, разлить по контейнерам для мяты или по пробиркам для картофеля.

2. Подготовить ламинар к работе.

3. Поместить в ламинар контейнеры или пробирки с растениями, контейнеры или пробирки со свежей питательной средой, электрический стерилизатор или спиртовку с зажигалкой, пинцеты, скальпели, матрасики (автоклавированная бумага или чашки Петри).

4. Стерильными инструментами (пинцет, скальпель) извлечь побег из контейнера или пробирки, поместить на стерильный матрасик, разрезать на микрочеренки.

5. Микрочеренки разместить на свежую питательную среду, соблюдая полярность, закрыть емкости для культивирования, подписать, разместить в световой комнате (рис. 19).

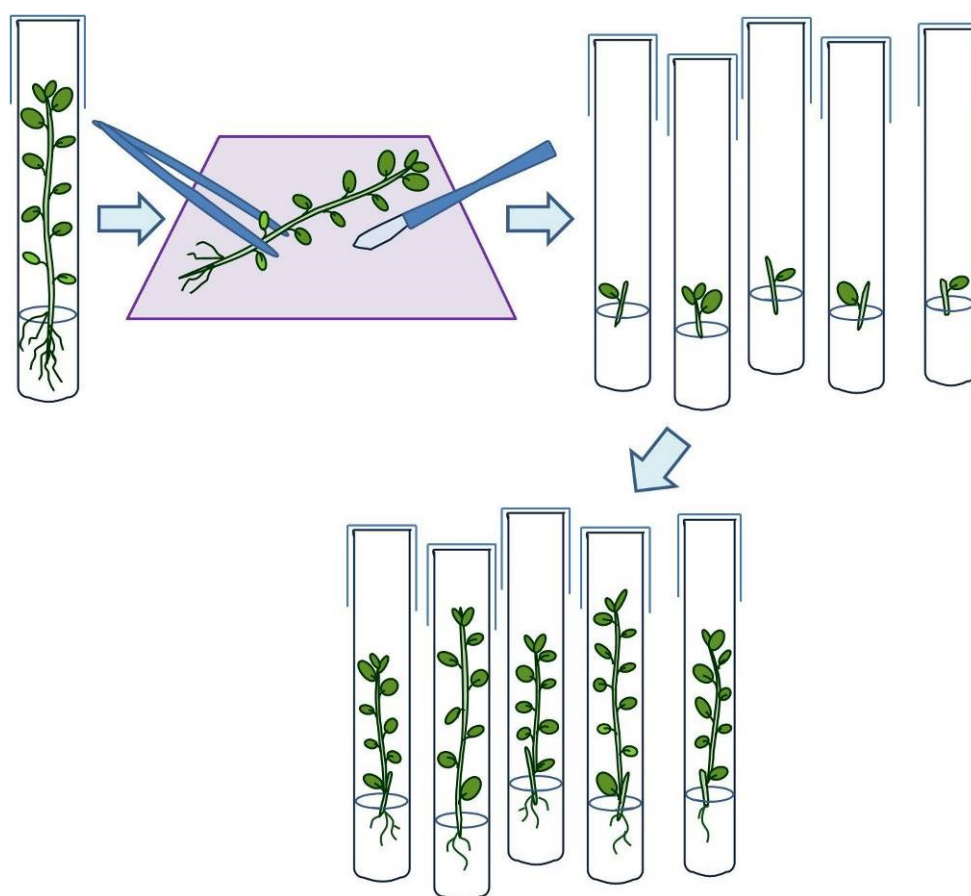


Рис. 19. Микрочеренкование картофеля

Лабораторная работа № 5. Индукция каллусогенеза моркови

Морковь – модельный объект при изучении многих процессов в культуре тканей. В высечках корнеплода моркови можно легко различить ксилему, флоэму и камбий и следить за формированием каллуса из клеток этих тканей.

Цель: овладеть навыком введения растительного материала в культуру *in vitro*, работы в асептических условиях ламинара. Индуцировать каллусогенез и оценить скорость его формирования на разных тканях экспланта.

Ход работы:

1. Приготовить питательную среду MS с добавлением 30 г/л сахарозы, 2 мг/л 2,4-Д и 7 г/л агара, разлить ее по чашкам Петри.

2. Тщательно помыть корнеплод теплой водой с мылом. Срезать головку, кончик и некротизированные ткани. Разрезать корнеплод поперек на несколько частей.

3. Поместить части корнеплода в 2% раствор гипохлорита натрия с добавлением 2-3 капель Твин 20 на 10 минут. Далее работать в асептических условиях ламинара.

4. Трижды промыть растительный материал стерильной (автоклавируемой) водой.

5. Поместить части корнеплода на стерильный коврик (автоклавируемые листы бумаги или чашка Петри), обновить места срезов. Вырезать диски диаметром 1 см, толщиной 1 мм, содержащие флоэму, камбий и ксилему.

6. Поместить диски на поверхность питательной среды.

7. Подписать этикетку.

8. Культивировать в климатической комнате при температуре 24°C в течение 3 недель (рис. 20).

9. Студенты на каждом занятии осматривают инокулированные на питательную среду растительные ткани, оценивают процесс, отмечают динамику каллусогенеза. Отдельные образцы осматривают при 40-кратном увеличении бинокля, делают записи и рисунки в тетради. Необходимо обращать внимание на возможное наличие микробной контаминации. При обнаружении единичных колоний бактерий возможна пересадка стерильных эксплантов на свежую среду того же состава. Если же наблюдается рост плесневых грибов или многочисленных колоний бактерий, чашку следует автоклавирувать, содержимое утилизировать, посуду помыть.

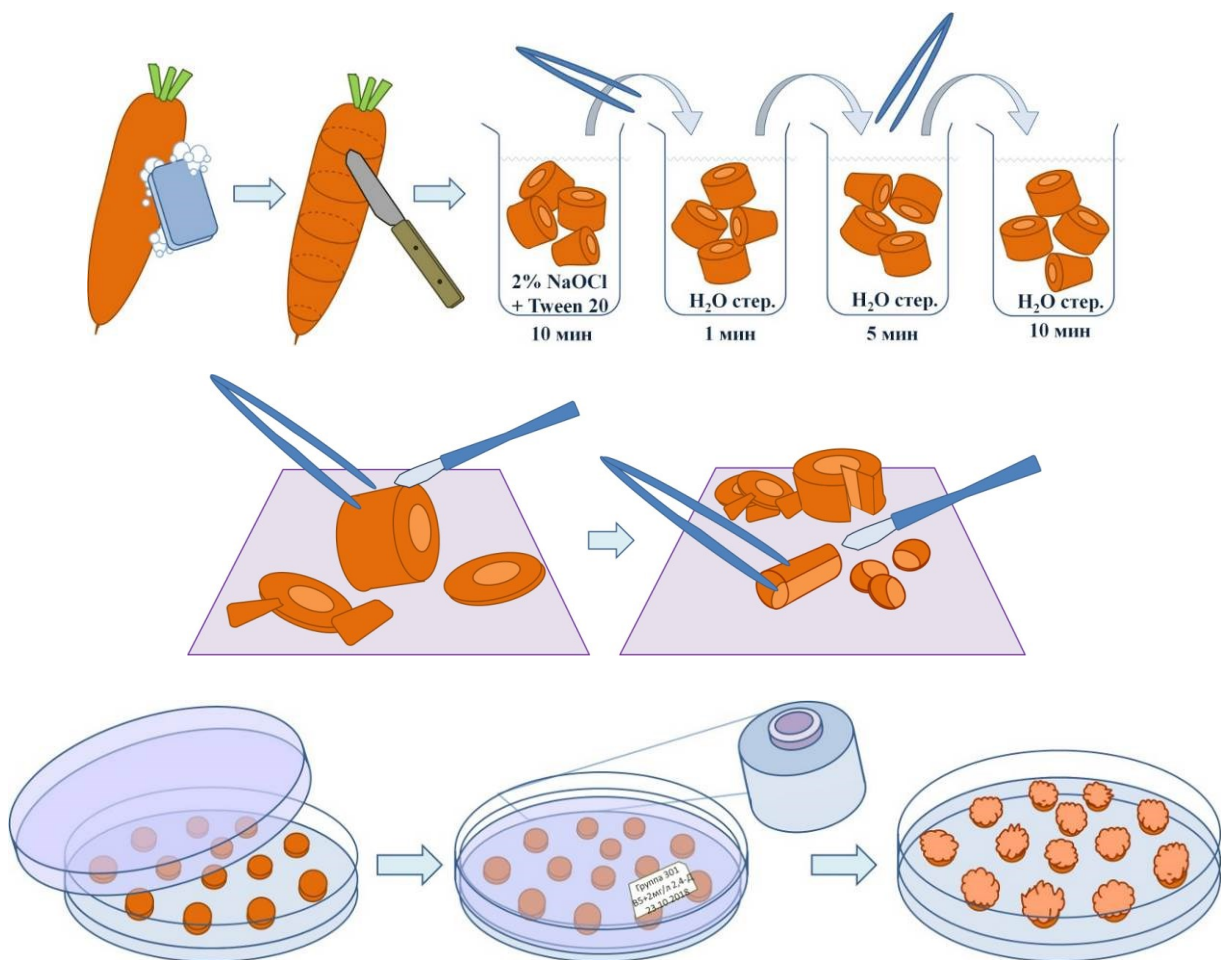


Рис. 20. Подготовка и инокуляция экспланта, фрагментов корнеплода моркови, на питательную среду для индукции каллусогенеза

10. По результатам работы студенты делают вывод, в котором поясняют наличие или отсутствие каллусообразования, отмечают ткань, из клеток которой быстрее начал формироваться каллус, сравнивают динамику образования каллуса из разных тканей (камбия, флоэмы, ксилемы), сравнивают эффективность каллусообразования в зависимости от размера, формы, толщины и диаметра эксплантов, их расположения в чашке Петри.

11. Образовавшийся каллус может быть использован для дальнейшей индукции и изучения органогенеза, соматического эмбриогенеза, создания клеточной суспензии (Лабораторная работа № 8), протопластов.

Лабораторная работа № 6. Положение экспланта на питательной среде

Органы, ткани и клетки растений характеризуются полярностью. В них присутствуют эндогенные регуляторы роста, транспорт которых происходит полярно. Поэтому положение экспланта на питательной среде может существенно влиять на процесс каллусообразования.

В научных публикациях раздел «Материалы и методы» часто содержит только общую информацию, без таких деталей и подробностей как подготовка эксплантата и его положение на питательной среде. Поэтому при попытке повторить такую работу вполне возможно получить иной результат. Например, в разделе «Методы» может быть указано: «Фрагменты гипокотилей поместили на питательную среду». Для некоторых растений положение эксплантата на питательной среде не имеет значения, однако для других видов это критично. Приведенный далее пример иллюстрирует различную реакцию эксплантов в зависимости от их ориентации на поверхности питательной среды.

Цель: продемонстрировать влияние ориентации фрагментов гипокотилей проростков подсолнечника на каллусообразование.

Ход работы:

1. В асептических условиях прорастить семена подсолнечника (поверхностно стерилизовать семена, поместить их в пробирку/банку на питательную среду МС без добавления регуляторов роста или просто на влажную фильтровальную бумагу).

2. Гипокотили проростков подсолнечника разрезать на фрагменты и поместить их основанием, верхней частью, боковой поверхностью на питательную среду MS с добавлением 0,1 мг/л кинетина и 0,3 мг/л 2,4-Д (рис. 21).

3. Подписать этикетки, культивировать в климатической комнате.

4. Отмечать динамику образования каллуса.

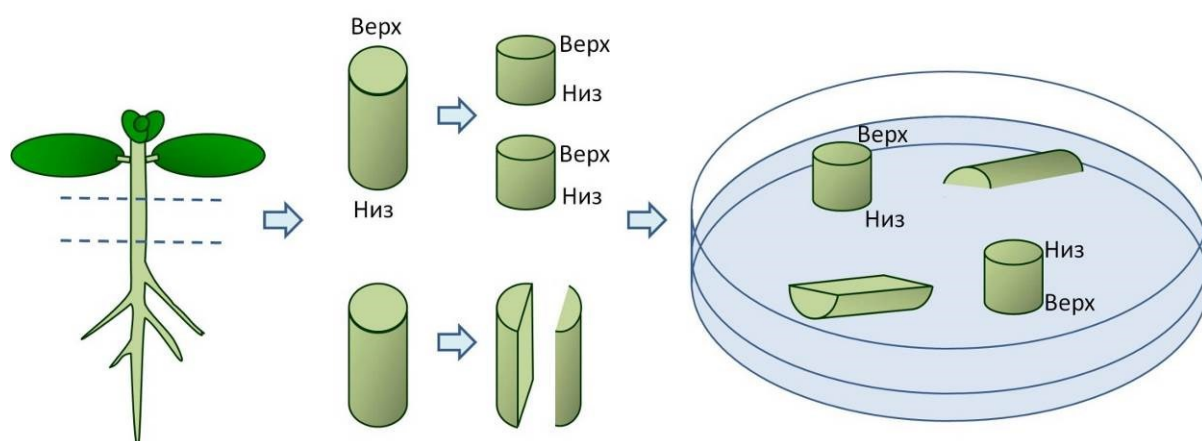


Рис. 21. Размещение фрагментов гипокотеля подсолнечника на поверхности питательной среды

5. На каллусообразование также влияют многие другие факторы, можно провести работы по их изучению. Например, культивировать экспланты в темноте и на свету, при различных температурах, на полной и половинной концентрации питательной среды.

Лабораторная работа № 7. Прямой органогенез. Микрклональное размножение сенполии

Сенполия (узумбарская фиалка) (*Saintpaulia ionanta*, *Saintpaulia hybrida*) – одна из самых распространенных комнатных горшечных культур. Сенполия прекрасно размножается вегетативно листовыми черенками. Чтобы достичь более высокого коэффициента размножения, сенполию размножают микрклонально с помощью прямого органогенеза. Лист сенполии разрезают поперек на полосы шириной около 1,5 см и помещают на питательную среду. В местах срезов формируется огромное количество почек, которые прорастают и формируют розетки листьев с придаточными корнями (рис. 22).



Рис. 22. Прямой органогенез в культуре фрагментов листа сенполии

Известны пестролистные химерные сорта сенполии. Если использовать такую форму для микрклонального размножения, можно получить растения, отличающиеся от исходного. Для такой работы можно также использовать бегонию рекс.

Цель: микрклонально размножить сенполию, выделить различные фенотипы из срезов химерных листьев и черешков (Bilkey et al., 1978; Norris et al., 1983; Start & Cummings, 1976).

Ход работы:

1. Приготовить питательную среду MS с добавлением 30 г/л сахарозы, 0,1 мг/л ИУК, 0,5 мг/л БАП, 7 г/л агара, pH 5,8. Автоклавировать, разлить в контейнеры.
2. Отобрать молодые здоровые листья сенполии, аккуратно вымыть их теплой водой с мылом, не травмируя.
3. Поверхностно стерилизовать листья в 2% растворе гипохлорита натрия с добавлением Tween 20 и трижды промыть автоклавированной водой.
4. Разрезать лист поперек на полосы шириной примерно 1-1,5 см.

Черешок листа также разрезать на фрагменты длиной 1 см. Поместить экспланты на поверхность питательной среды.

5. Культивировать в условиях климатической комнаты.
6. Каждую неделю осматривать, делать описание.

Контрольные вопросы

1. В чем различия между клетками каллуса и клетками меристемы? Что означают термины «недифференцированный» и «дифференцированный»?
2. Как получить каллусную ткань?
3. Можно ли получить каллусную ткань на питательной среде без добавления регуляторов роста?
4. Какие факторы влияют на каллусообразование?
5. Являются ли отдельные клетки каллуса одинаковыми по размеру и форме?
6. Что такое клеточная суспензия, как ее получить?
7. От чего зависит размер клеточных агрегатов (число клеток в группах)?
8. Можно ли получить суспензию, состоящую только из одиночных клеток?
9. Какие факторы влияют на каллусообразование?
10. Есть ли различия в морфологии каллуса и интенсивности его формирования при различной ориентации экспланта на питательной среде? Чем это можно объяснить?

Глава 5. Биология растительных клеток, культивируемых *in vitro*

Выделяют несколько уровней организации растения: клеточный, тканевый, органнй, организменный. Регуляция физиологических процессов *in vivo* происходит на всех этих уровнях. Например, фитогормон ИУК синтезируется в точке роста, перемещается до кончика корня и влияет на физиологические процессы всего растения. В условиях *in vitro* культивируют клетки, ткани или органы, соответственно регуляция на более высоких уровнях организации отсутствует. В таких условиях добавление в состав питательной среды регуляторов роста становится важным инструментом воздействия на эксплант. Экзогенные регуляторы роста в составе среды действуют совместно с эндогенными фитогормонами, которые могут продолжать синтезироваться в тканях экспланта.

5.1. Динамика роста клеток, культивируемых *in vitro*

Цикл развития клетки каллуса (как и любой другой клетки) включает: деление, растяжение и дифференцировку, старение и отмирание. Для того чтобы не происходило старения и гибели каллусных клеток, необходимо каждые 3-4 недели переносить каллус на свежую питательную среду. Такую пересадку называют **пассажем**, пассированием. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течении многих лет.

Динамику роста каллусных клеток на твердой питательной среде и в клеточной суспензии можно описать S-образной кривой. Обычно выделяют пять этапов роста каллусной ткани (или клеточной суспензии) (рис. 23). Их продолжительность зависит от состава питательной среды и генотипа.

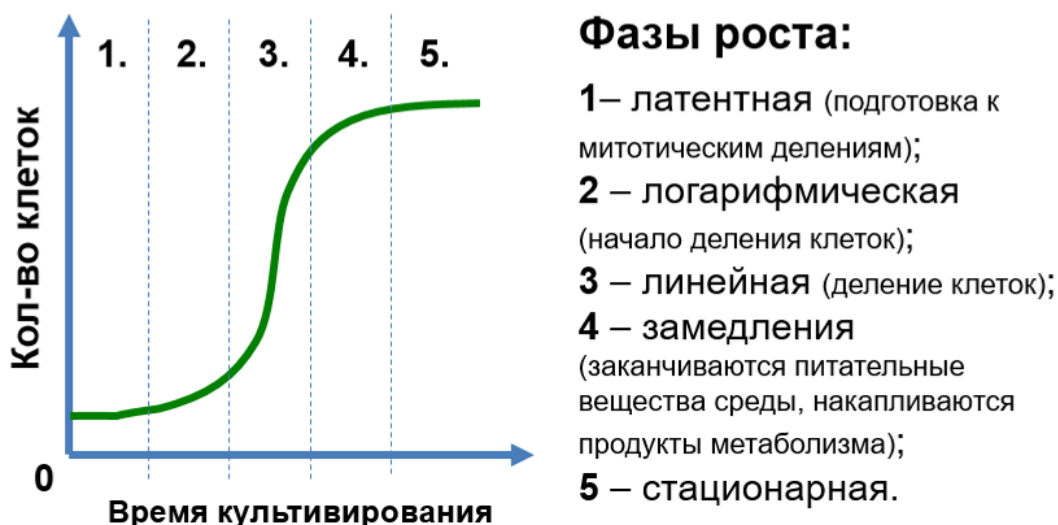


Рис. 23. Фазы роста каллусной ткани

Фазы роста каллусных клеток *in vitro*:

- 1) подготовка клеток к делению;
- 2) период наиболее активного деления клеток;
- 3) наиболее быстрое увеличение биомассы за счет растяжения клеток, продолжаются клеточные деления;
- 4) замедление роста из-за истощения питательной среды и накопления в ней продуктов жизнедеятельности клеток;
- 5) прекращение роста, количество клеток не увеличивается. Если не пересадить ткань на свежую среду этот этап сменится гибелью клеток.

Для некоторых исследований необходимо использовать каллус на определенном этапе развития, в определенной точке кривой роста. Например, при исследовании хромосом предпочтителен второй этап экспоненциального роста, в котором происходит быстрое деление клеток и можно обнаружить наибольшее количество клеток в метафазе. Рост и развитие клеток наиболее заметны на линейной третьей стадии. Когда исследуют синтез вторичных метаболитов, важно определить этап роста культуры, на котором происходит накопление наибольшего количества желаемого продукта. Замедление роста каллусной культуры на четвертом этапе происходит из-за того, что в среде становится меньше питательных веществ и накапливаются токсичные продукты метаболизма клеток. Как только культура вступает в стадию замедления роста, ее следует перенести на свежую питательную среду, иначе наступит следующий этап – гибель клеток.

5.2. Различия клеток каллуса

Клетки каллуса, полученного из одного экспланта, могут различаться морфологически по размеру и форме, физиологически, эпигенетически и генетически. Эти различия связаны с тем, что клетки на питательной среде имеют различный доступ к питательным веществам и воздуху, клетки каллуса могут происходить из разных тканей экспланта, возможно возникновение мутаций.

Морфологические различия в большой степени связаны с различным доступом клеток к питательным веществам и воздуху, особенно на твердой питательной среде. Клетки каллуса обычно крупные, могут иметь вытянутую форму, различаются по размерам.

Физиологические различия связаны с асинхронностью клеточных делений. В определенный момент времени клетки каллуса находятся на разных стадиях клеточного цикла, например, в некоторых клетках происходит синтез белков, в других - репликация ДНК, в третьих - разные стадии митоза. Иногда исследователю необходимо, чтобы большая часть

клеток находилась на конкретной стадии клеточного цикла, например, в случае изучения влияния какого-то вещества на прохождение этапов митоза. В этом случае готовят клеточную суспензию, так как при культивировании в жидкой среде на шейкере клетки имеют более равномерный доступ к питательным веществам и воздуху, чем при культивировании на твердой среде. Затем суспензию помещают в неблагоприятные условия – недостаток одного из элементов питания или низкая температура. Через определенное время восстанавливают оптимальные условия и клетки синхронно проходят первые клеточные деления, после чего асинхронность восстанавливается.

Эпигенетические модификации - метилирование ДНК, модификация гистонов, посттрансляционные модификации - приводят к изменению фенотипа, в том числе наследуемому, но не связаны с изменением последовательности ДНК. Если эксплант включает разные ткани (например, фрагмент корнеплода моркови включает ксилему, флоэму и камбий) или в культуру вводят фрагменты разных органов одного растения, ДНК в них будет метилировано по-разному, что будет причиной тканеспецифичности. Условия культивирования также могут быть причиной новых эпигенетических событий. Эпигенетические модификации сохраняются в ряде клеточных делений, так что клетки каллуса, полученные из разных тканей, и даже растения-регенеранты будут различаться эпигенетически.

Генетическая неоднородность клеток каллуса связана с тем, что в экспланте уже могут присутствовать мутации в соматических клетках, которые в обычных условиях невозможно было бы обнаружить. Кроме того, при длительном культивировании на питательной среде также могут накапливаться мутации, так как регуляторы роста являются слабыми мутагенами (рис. 24). Генетическая неоднородность каллусных клеток прежде всего выражается в различной ploидности (кратном увеличении числа хромосом), также можно наблюдать анеуплоидию (возрастание или уменьшение хромосомного набора на несколько хромосом), хромосомные абберрации.

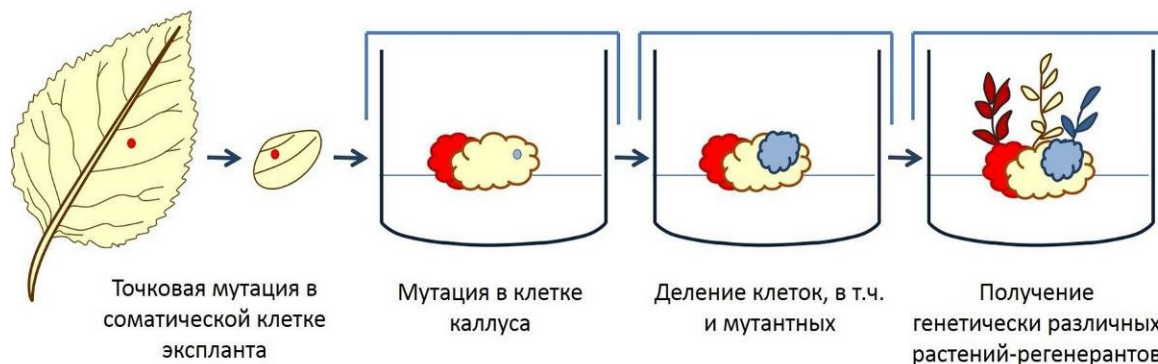


Рис. 24. Генетическая вариабельность растений-регенерантов

Говорят о **сомаклональной изменчивости** – эпигенетических или генетических изменениях в клетках, развивающихся в культуре *in vitro*, которые приводят к изменению фенотипа регенерирующего из них организма. В таком случае растения, регенерировавшие из культивируемых клеток, несут какие-либо отклонения от исходной формы. Поэтому для микроклонального размножения нежелательно использовать длительно культивируемый каллус, лучше использовать первичный каллус, возникающий на эксплантах. Но если целью является повышение генетического разнообразия, можно специально добавлять в питательную среду мутаген либо воздействовать на клетки ультрафиолетом.

Растительные клетки в культуре могут быть очень полезной экспериментальной системой для изучения реакции клеток на различные стрессовые факторы окружающей среды. На клеточном уровне можно изучать воздействие ионов (Na, Al и т.д.), гербицидов и производимых патогенами токсинов. Так называемая клеточная селекция *in vitro* позволяет выявить клетки, устойчивые к повышенной концентрации соли в питательной среде, пониженной температуре, присутствию токсинов фитопатогенов. Неустойчивые клетки на такой среде погибают, выжившие считаются устойчивыми. Если из таких клеток получить растения, возможно, они также будут устойчивыми к данному биотическому или абиотическому стрессу. Однако при анализе этой системы следует быть очень осторожными с выводами, поскольку реакция клетки и целого организма растения на стрессовые факторы может различаться. Кроме того, устойчивость может быть обусловлена как изменением генотипа в результате полезной мутации, так и эпигенетическими изменениями, которые сохраняются только в 2-3 поколениях. Существует множество публикаций, в которых исследователи высказывают мнения за и против метода отбора в культуре клеток.

Лабораторная работа № 8. Создание суспензионной культуры клеток моркови

Клетки каллуса на твердой агаризованной питательной среде находятся в различных условиях питания и газообмена. Клетки в жидкой питательной среде находятся в максимально равномерных условиях. Клеточной суспензией называют одиночные клетки и небольшие группы клеток в жидкой питательной среде. Чтобы эти клетки постоянно находились в среде во взвешенном состоянии и не оседали на дно сосуда, их постоянно перемешивают с помощью качающейся платформы – шейкера или другими

способами. Клеточную суспензию получают для микроклонального размножения растений, а также для фундаментальных исследований.

Цель: приготовить суспензионную культуру клеток моркови из полученного ранее каллуса (Лабораторная работа № 5).

Ход работы:

1. Приготовить жидкую питательную среду MS с добавлением 25 г/л сахарозы и 0,1 мг/л 2,4-Д. В 250 мл колбы Эрленмейера разлить по 65 мл среды, автоклавировать.

2. В асептических условиях ламинара с помощью скальпеля и пинцета срезать кусочки каллусной ткани моркови и поместить в колбы Эрленмейера с жидкой питательной средой.

3. Закрепить на шейкере, культивировать при 100-120 об/мин, температуре 24°C в течение 3 недель.

4. Методом отстаивания отделить крупные кусочки каллуса.

5. Полученную суспензию можно использовать для платирования (Лабораторная работа № 9).

Лабораторная работа № 9. Платирование

Одним из способов микроклонального размножения является получение эмбриоидов в суспензионной культуре клеток. Для этого небольшой объем клеточной суспензии переносят на свежую питательную среду со сниженным содержанием регуляторов роста. Например, получают каллус моркови на агаризованной питательной среде MS с добавлением 2 мг/л 2,4-Д (Лабораторная работа № 5), затем получают клеточную суспензию в жидкой питательной среде MS с добавлением 0,1 мг/л 2,4-Д (Лабораторная работа № 8), после чего 5 мл клеточной суспензии помещают в колбу Эрленмейера в 60 мл свежей жидкой питательной среды MS без добавления регуляторов роста, где из отдельных клеток формируются эмбриоиды. Эмбриоиды извлекают из жидкой среды и размещают на поверхности твердой агаризованной питательной среды без регуляторов роста для проращивания. Однако можно избежать необходимости размещать эмбриоиды с помощью инструментов на твердой среде с помощью платирования. При платировании смешивают равные объемы клеточной суспензии и теплой среды с двойной концентрацией агара, разливают смесь по чашкам Петри и наблюдают формирование и прорастание эмбриоидов

уже на твердой среде (рис. 25). Метод платирования в некоторых случаях также применяют для культивирования протопластов.

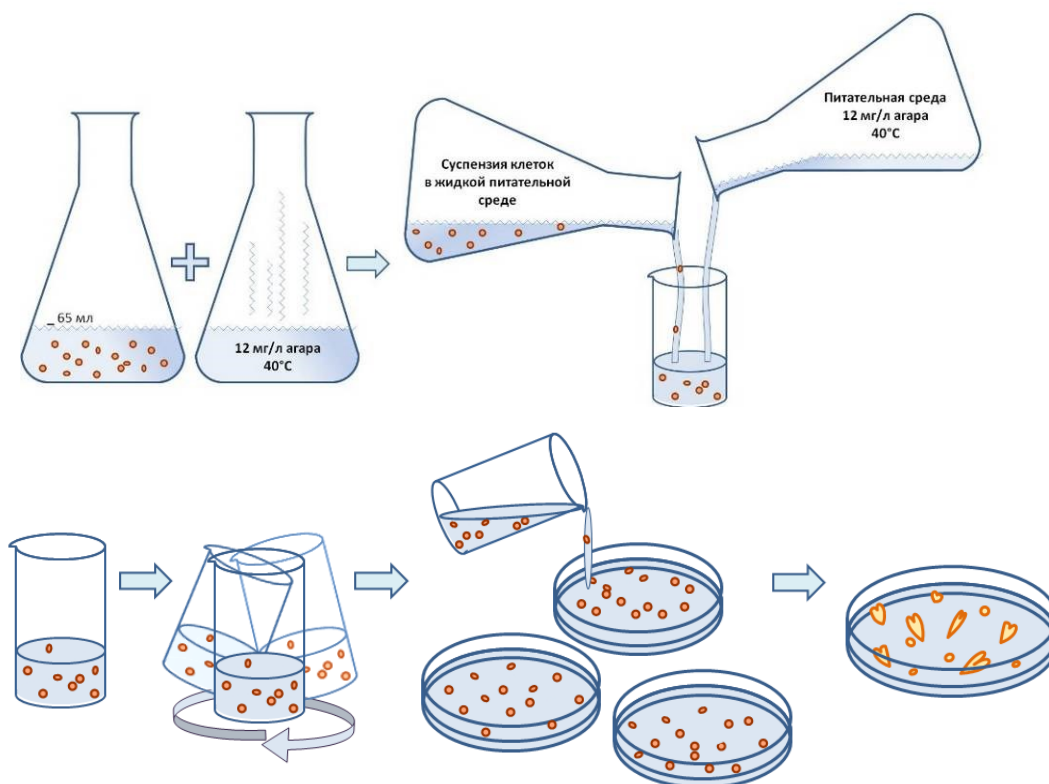


Рис. 25. Платирование

Цель: платировать клеточную суспензию, полученную в ходе лабораторной работы № 8.

Ход работы:

1. Приготовить питательную среду МС с добавлением 25 г/л сахарозы и 14 г/л агара. После автоклавирования остудить до 40 °С.
2. В асептических условиях ламинара смешать равные объемы клеточной суспензии и теплой агаризованной среды. Перемешать покачиванием стакана.
3. Быстро, не мешкая, разлить полученную смесь по чашкам Петри. После застывания среды чашки закрыть, замотать пленкой, подписать этикетки.
4. Культивировать в климатической комнате при температуре 24°C в течение 3 недель.

Контрольные вопросы

1. Назовите фазы роста каллусных клеток *in vitro*.

2. Почему клетки после помещения на питательную среду не сразу начинают делиться?
3. В чем причина замедления и прекращения митотических делений на 4-5 фазах?
4. Что нужно делать, чтобы не происходило гибели клеток после 5 фазы роста клеток?
5. В чем причина различий клеток каллуса?
6. В чем причина генетической неоднородности клеток каллуса?
7. Что такое отбор в культуре клеток?
8. Как можно использовать соматическую изменчивость и когда она нежелательна?

Глава 6. Типы дифференцирования. Регуляторы роста в культуре клеток

В зависимости от цели культивирования клеток и тканей в состав питательной среды могут быть добавлены регуляторы роста растений.

Фитогормоны – низкомолекулярные органические вещества, в малых количествах оказывающие регуляторное влияние на физиологические процессы растения, например, на прорастание почек, семян, клубней, луковиц, переход к цветению и плодоношению, формирование семян, опадение листьев, покой почек, клубней, луковиц, семян. Фитогормоны синтезируются в растениях, часто образуются в одних органах, а влияние оказывают в других.

Регуляторы роста оказывают действие, аналогичное фитогормонам, но могут быть синтезированы микроорганизмами или химическим синтезом. Фитогормоны также можно назвать регуляторами роста.

Регуляторы роста группируют по сходному химическому строению, пути биосинтеза и действию. Выделяют следующие группы регуляторов роста: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизовая кислота, этилен, brassinosteroids, жасмонаты, салицилаты, стриголактоны, полипептидные, полисахарины, ещё не открытые.

Регуляторы роста условно делят на стимуляторы роста (ауксины, цитокинины, гиббереллины) и ингибиторы роста (абсцизовая кислота, этилен). Действие регуляторов роста зависит от его концентрации, избыточная концентрация стимулятора вызывает торможение роста и гибель растений.

Регуляторы роста действуют только если в растении их не хватает - во время прорастания семян, цветения, образования плодов, при нарушении целостности (черенки, изолированные ткани). Клетки должны быть компетентны (восприимчивы) к регуляторам роста, это связано с наличием рецепторов и общим состоянием клеток. Клетка может быть восприимчивой в одной фазе роста, а в другой — нет. Для того, чтобы регуляторы роста оказывали действие на растение, необходимо достаточное количество воды и питательных веществ.

6.1. Ауксины

Чарльз Дарвин в 1880 г. описал гипотетический регулятор роста растений, который синтезируется в апексе и перемещается сверху вниз, ускоряя рост и растяжение клеток. Он затенял разные части проростков канареечника и исследовал влияние однонаправленного света на изгибание coleoptiles проростков. При удалении апекса или затенении апекса светонепроницаемым колпачком не происходило роста и отклонения (рис. 26). При использовании прозрачного колпачка или затенения нижней части проявлялся фототропизм.

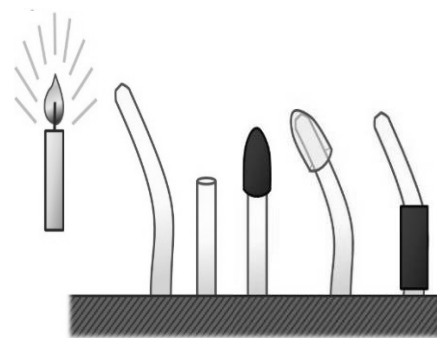


Рис. 26. Опыты Дарвина

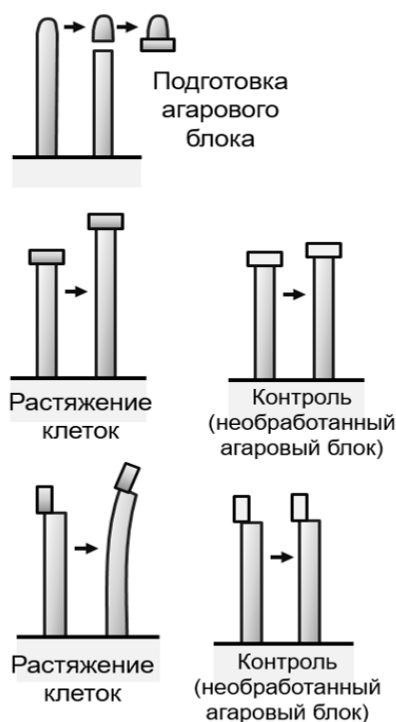


Рис. 27. Опыты Вента

Вент (1926 г.) доказал существование химического регулятора роста. Он выдерживал срезанный апекс проростка на агаровом блоке, молекулы ИУК диффузией проникали в блок. Затем исследователь помещал блок на проростки с удаленной верхушкой и наблюдал рост растяжением клеток (рис. 27).

Ауксины определяют рост клеток растяжением, деление клеток, апикальное доминирование, корнеобразование, разрастание завязи, перераспределение питательных веществ в растении (рис. 28).

Ауксины:

ИУК (индолил-3-уксусная кислота)

(фитогормон)

ИМК (индолилмасляная кислота)

НУК (нафтилуксусная кислота)

2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота)

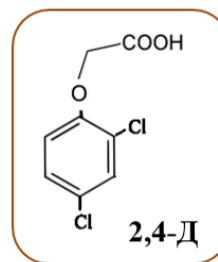
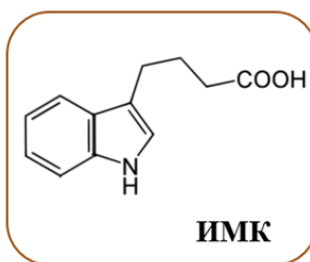
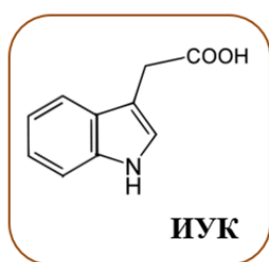




Рис. 28. Структура молекул и принцип действия ауксинов

Ауксины определяют **рост клеток растяжением** за счет повышения растяжимости клеточных стенок. Ауксины стимулируют выброс ионов H^+ из клетки в пространство между плазмалеммой и клеточной стенкой. В кислой среде активизируются белки - экспансины, которые разрушают водородные связи между целлюлозными микрофибриллами. Клетка расширяется под действием тургорного давления (рис. 29).

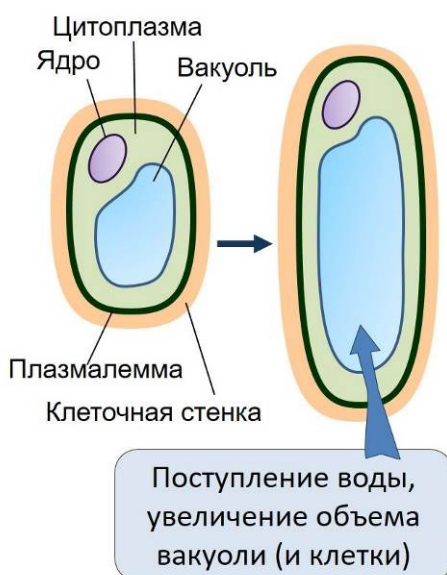


Рис. 29. Рост клетки растяжением

Ауксины не только усиливают активность экспансинов, но и позитивно регулируют экспрессию их генов, влияя на промоторы. Форма растущей клетки зависит от ориентации целлюлозных фибрилл клеточной стенки, которая также контролируется ауксинами.

Ауксины контролируют направление ростовых движений растения относительно света, гравитации и опор. Ауксин движется в сторону от света, не инактивируется светом, движется под действием силы тяжести и активным транспортом, расщепляется ферментами. В результате происходит неравномерное распределение ауксинов в

поперечном сечении, клетки удлиняются по-разному, происходит изгиб органов в нужную сторону.

Ауксины обладают аттрагирующим эффектом - "привлекают" питательные вещества к областям повышенной своей концентрации: верхушечной меристеме (апикальное доминирование), базальной части черенка (корнеобразование), завязи (разрастание околоплодника).

В садоводстве ауксины применяют для корнеобразования (обработка нижних концов черенков раствором, саженцев - пастой из глины), формирования партенокарпических бессемянных плодов (томат), предохранения плодов от предуборочного опадения (опрыскивание НУК за две недели до уборки), ускорение прорастания семян мелкосемянных культур, в качестве селективных гербицидов (2,4-Д).

6.2. Цитокинины

Ф. Скуг (1953 г.) с группой исследователей предпринимал попытки получить каллус из паренхимы сердцевины табака. Несмотря на добавление ауксинов (которые уже были открыты) клетки не делились. Исследователи пробовали разные добавки, в т.ч. ДНК из молок сельди. Из-за сбоя режима автоклавирования среда перегрелась, в ней появился кинетин – производное аденина. На фоне ауксина он вызывает активное деление клеток.

Цитокинины определяют деление клеток, снятие апикального доминирования, подавление роста боковых корней, прорастание семян, почек, клубней, регулируют цветение и плодообразование, определяют задержку старения листьев, стеблевой морфогенез в культуре тканей (рис. 30).

Цитокинины:

Кинетин (6-фулфуриламинопурин)

Зеатин (фитогормон)

6-БАП (6-бензиламинопурин)

2-ип (2-изопентениладенин)

Тидиазурон (TDZ)

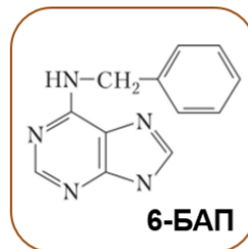
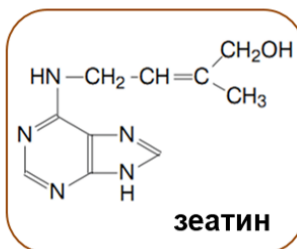
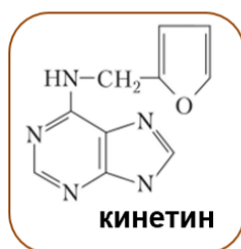




Рис.30. Структура молекул и принцип действия цитокининов

Цитокинины задерживают разрушение за счет повышения активности компонентов ферментативной антиоксидантной системы в хлоропластах, в результате снижается концентрация активных форм кислорода и уровень окислительного стресса. Цитокинины также стимулируют синтез хлорофилла.

В садоводстве цитокинины применяют для активизации ветвления (цитокининовая паста для орхидей), увеличения количества цветков, появления темно-зеленой окраски листьев, прорастания долго хранившихся семян.

Важно отметить совместное действие ауксинов и цитокининов: ауксины влияют на G1 - период клеточного цикла, цитокинины регулируют переход из фазы G2 к митозу, то есть ауксины и цитокинины необходимы для регуляции клеточных делений. Этим обусловлено совместное применение ауксинов и цитокининов в составе питательных сред для культивирования клеток и тканей. Как правило, высокие концентрации ауксинов и

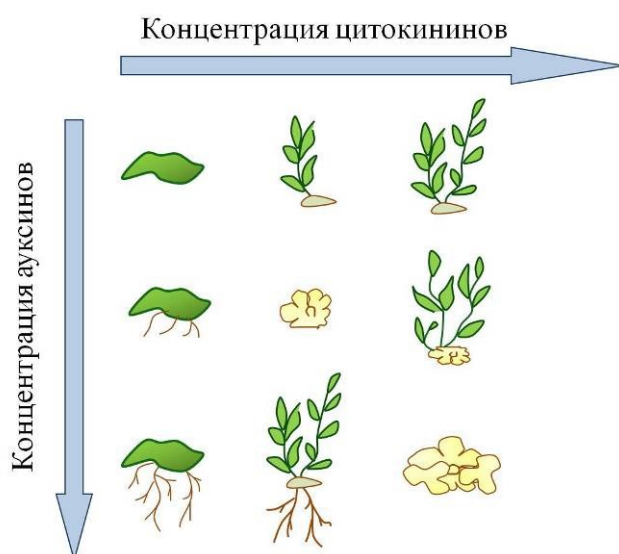


Рис. 31. Совместное действие ауксинов и цитокининов в культуре тканей

цитокининов в питательной среде вызывают каллусообразование, повышенные концентрации цитокининов стимулируют образование почек и побегов, а повышенные концентрации ауксинов стимулируют образование корней в культуре тканей (рис. 31). При этом важно помнить о видоспецифичности. К тому же действие будет зависеть от состава, концентрации и соотношения регуляторов роста.

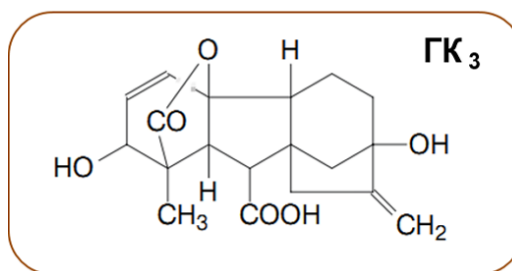
6.3. Гиббереллины

Э. Куросава (1926 г.) изучал болезнь риса «баканэ» - бешеные побеги. Гриб-возбудитель выделяет вещество, вызывающее быстрый рост побегов. Дж. Мак-Миллан (1960 г.) выделил «растительный гиббереллин». В настоящее время известно более 20 гиббереллинов – фитогормонов. Более 50 гиббереллинов найдено у грибов. Гиббереллиновые кислоты нумеруют по мере открытия. Чаще всего используют ГК₃, которую получают в культуре гриба *Gibberella*. Гиббереллины – самые крупные молекулы среди известных регуляторов роста.

Гиббереллины определяют удлинение стебля (повышение активности интеркалярных меристем), прерывание покоя почек, семян и клубней, стимуляцию образования завязей, зацветание длиннодневных растений в условиях короткого дня и растений, нуждающихся в яровизации, проявление пола (закладка мужских и женских цветков) (рис. 32).

Гиббереллины

- ГК₁
- ГК₂
- ГК₃
- ГК₄



Биосинтез гиббереллинов зависит от продолжительности дня, качества света, концентрации ауксина. Состав гиббереллинов может различаться у разных видов и в разных органах (один гиббереллин может быть активен у одного вида и не вызывать реакцию у другого).

В садоводстве гиббереллины применяют для обработки насаждений бессемянных сортов винограда, увеличивается продуктивность растений, возделываемых для получения зеленой массы, увеличения выхода волокна с гектара. Вещества антигиббереллинового действия широко применяют как ретарданты (хлормекват-хлорид). Они нарушают биосинтез гиббереллинов, рост растений в высоту замедляется, стебли утолщаются.

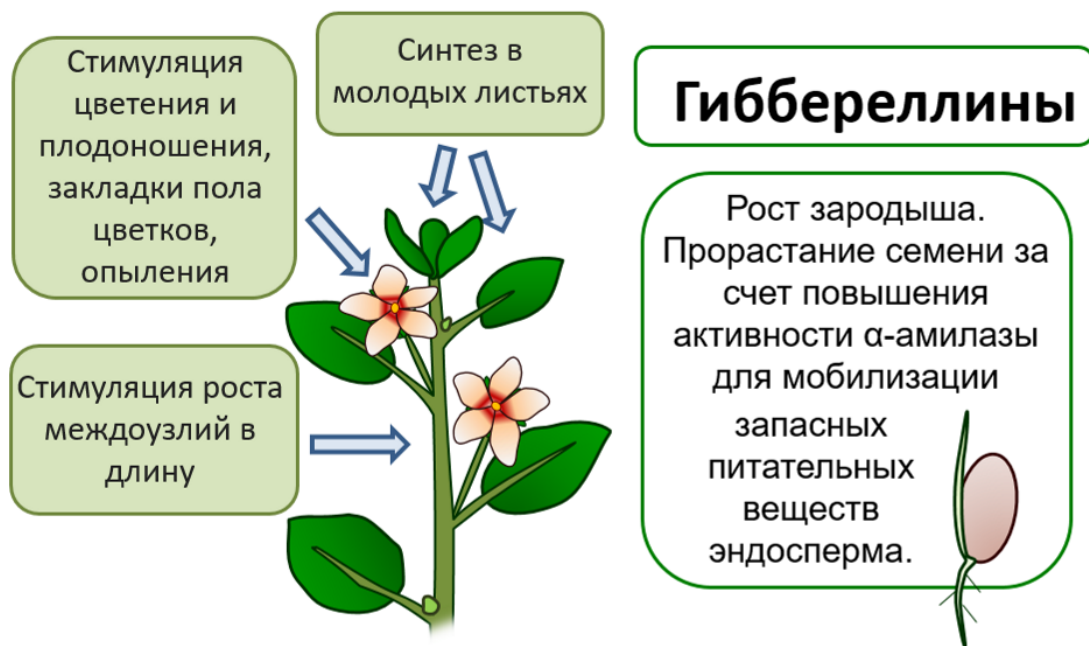


Рис. 32. Строение молекулы ГКз и принцип действия гиббереллинов

6.4. Абсцизовая кислота

Ф.Т. Эддикотт изучал опадание листьев, П.Ф. Уоринг - покой древесных растений. В результате обоих исследований была получена абсцизовая кислота (1963-64 гг.).

АБК определяет торможение реакций, вызванных стимуляторами роста, формирование зародышей, созревание плодов, образование клубней и корнеплодов, покой семян, покой почек, старение и опадение листьев, является антистрессовым фактором (рис. 33). АБК влияет на экспрессию многих генов. Экспрессия 14% генов арабидопсиса регулируются абсцизовой кислотой.

В качестве антистрессового действия абсцизовая кислота вызывает закрытие устьичных щелей. Для закрытия устьиц необходимо снижение тургора замыкающих клеток. Механизм связан с АБК-зависимым входом Ca^{2+} в клетку и выбросом K^+ . Недостаток влаги ведет к активации синтеза АБК и её выходу из мест депонирования. Асимметричный транспорт ионов через мембрану замыкающих клеток устьиц приводит к замедлению поступления воды в клетки, их тургор падает, что приводит к закрытию устьичной щели. Одновременно АБК активирует всасывание воды корнями.

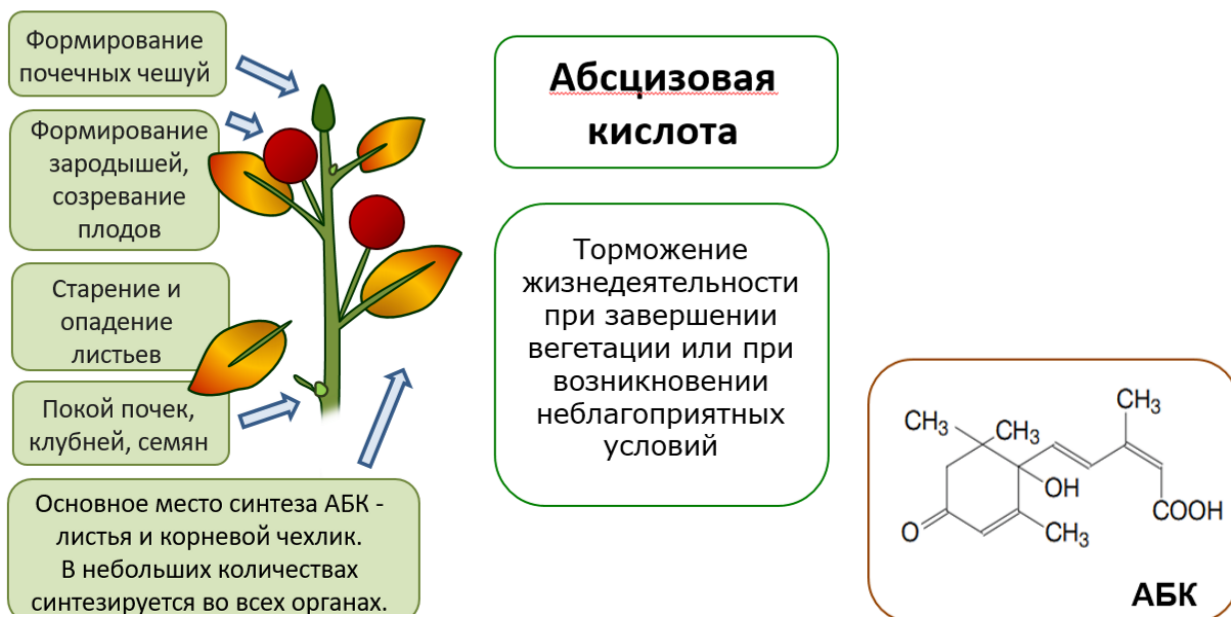


Рис. 33. Структура молекулы и принцип действия АБК

В садоводстве АБК применяют для ускорения созревания плодов (ускоряется образование отделительного слоя в плодоножке томата, яблони, облепихи, винограда, citrusовых), в качестве дефолианта (опадение листьев для машинной уборки хлопчатника), для индукции цветения (манго, авокадо, ананас), борьбы с полеганием зерновых культур (формирование укороченного толстого стебля). В культуре тканей АБК применяют для стимуляции эмбриогенеза у ряда культур.

6.5. Этилен

Было замечено, что около газовых фонарей уличного освещения деформировались ветви деревьев. Д.Н. Нелюбов (1901 г.) наблюдал изменения в росте проростков гороха. Ф. Денни (1920 г.) изучал ускорение созревания плодов под воздействием этилена (рис. 34).

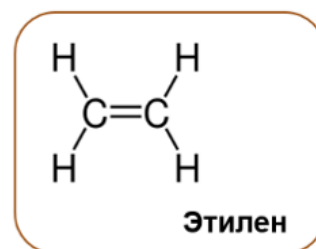


Рис. 34. Структура молекулы этилена

Этилен - газообразный фитогормон, распространяется по ксилеме и через атмосферу, синхронизирует процессы в рядом расположенных растениях и плодах. Этилен образуется почти во всех тканях и влияет на все этапы жизненного цикла растения.

Этилен участвует в контроле многих вегетативных и генеративных процессов растения, например, оптимизирует форму проростка, если есть препятствие при прорастании; стимулирует опадение ненужных органов оплодотворенных цветков, созревание плодов и образование отделительной

перидермы в их основании; в конце вегетации тормозит рост и стимулирует разрушение хлорофилла и образование отдельной перидермы в основании листьев.

Этилен во многом определяет реакцию растения на стресс, например, стимулирует образование раневой перидермы в том числе при реакции сверхчувствительности, непосредственно подавляет некоторые патогены (возбудители ржавчин), привлекает жасмонаты и салицилаты при механическом повреждении.

При повреждении тканей фитофагами, газ этилен перемещается к другим органам и другим растениям, вызывая превентивный ответ, например, выработку токсинов.

В садоводстве применяют продуцент этилена – 2-хлорэтилфосфовую кислоту (рис. 35). Ее используют для дозаривания плодов банана после транспортировки, для дозаривания томата, лука, в качестве ретарданта (рожь, ячмень), для ускорения выхода ранней продукции (огурец), для повышения содержания латекса у гевеи.

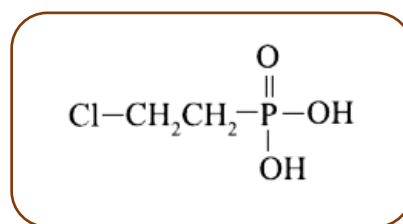


Рис. 35. Строение молекулы 2-хлорэтилфосфоновой кислоты

6.6. Другие регуляторы роста растений

Брассиностероиды были впервые выделены из пыльцы рапса. Участвуют в контроле иммунной системы растений, их синтез активизируется в неблагоприятных условиях (снижение температуры, засуха, засоление, затопление, действие пестицидов, фитопатогены).

Стриголактоны стимулируют прорастание спор микоризного гриба и контролируют процессы, позволяющие грибу оплести корень. Открыты как стимуляторы прорастания семян паразитических растений, самая изученная их функция – регуляция симбиотических взаимоотношений.

Жасмонаты - сложные эфиры и соли жасмоновой кислоты. Контролирует ответ растительного организма на стимулы внешней среды, например, ответ на механические помехи, например, при закручивании усиков и при возникновении повреждений. Стимулируют накопление запасных белков в клубнях и луковицах, участвуют в регуляции закрытия ловушек у хищных растений, активируют многие гены защитной системы (заживление механических повреждений, устойчивость к болезням и вредителям).

6.7. Регуляторы роста в культуре клеток и тканей растений

Для добавления в питательные среды готовят маточные растворы регуляторов роста, которые хранят в холодильнике. Ауксины и цитокинины добавляют в питательные среды до автоклавирования, гиббереллины – после. Обычная концентрация регуляторов роста в среде – 0,1...2 мг/л.

Контрольные вопросы

1. Чем различаются понятия «фитогормоны» и «регуляторы роста»? Являются ли фитогормоны регуляторами роста?
2. Каким образом ауксины вызывают рост клетки растяжением?
3. Приведите примеры ауксинов, цитокининов.
4. Почему в питательную среду часто добавляют и ауксин, и цитокинин?
5. Имеет ли значение, какой именно ауксин будет добавлен в питательную среду?
6. Как регуляторы роста используют в садоводстве?

Глава 7. Культура изолированных тканей в селекции и генной инженерии растений

Культуру клеток и тканей в селекции применяют для производства удвоенных гаплоидов – гомозиготных растений, спасения зародышей при отдаленной гибридизации, получения проростков мелкосеменных культур, соматической гибридизации (слияния протопластов), производства генетически модифицированных организмов, микроклонального размножения ценных генотипов.

7.1. Производство удвоенных гаплоидов

Удвоенный гаплоид – клетка (развившийся из нее организм), образовавшаяся в результате удвоения гаплоидного числа хромосом. Из гаплоидной (половой) клетки растения можно получить целое гаплоидное растение. Если гаплоидный набор хромосом удвоится, образуется растение – удвоенный гаплоид. Удвоение гаплоидного набора хромосом может быть спонтанным или индуцированным. Для индукции удвоения хромосом обычно применяют обработку растений колхицином или амипрофос метилом, эти мутагены разрушают веретено деления и хроматиды после репликации ДНК не расходятся к разным полюсам клетки.

Удвоенные гаплоиды – гомозиготные организмы, их можно использовать в качестве чистых линий, в этом их ценность для селекции (рис.36).

Традиционными методами селекции чистые линии получают в результате самоопыления и отбора в течение 6-7 поколений, для двулетних культур это довольно продолжительный срок. Растения-удвоенные гаплоиды можно получить за 1 год и приступить к испытанию их комбинационной способности.

Для получения удвоенных гаплоидов на питательную среду помещают гаплоидные клетки мужских или женских генеративных органов. При этом необходимо создать условия, чтобы гаплоидная клетка перешла с гаметофитного на спорофитный путь развития, то есть чтобы вместо пыльцевого зерна или зародышевого мешка сформировалось новое растение (рис. 37).

Применение удвоенных гаплоидов в производстве F₁-гибридов овощных культур

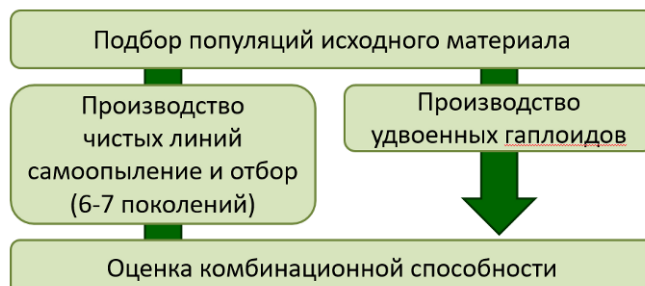


Рис. 36. Пути создания и выявления элитных чистых линий в селекции гетерозисных гибридов

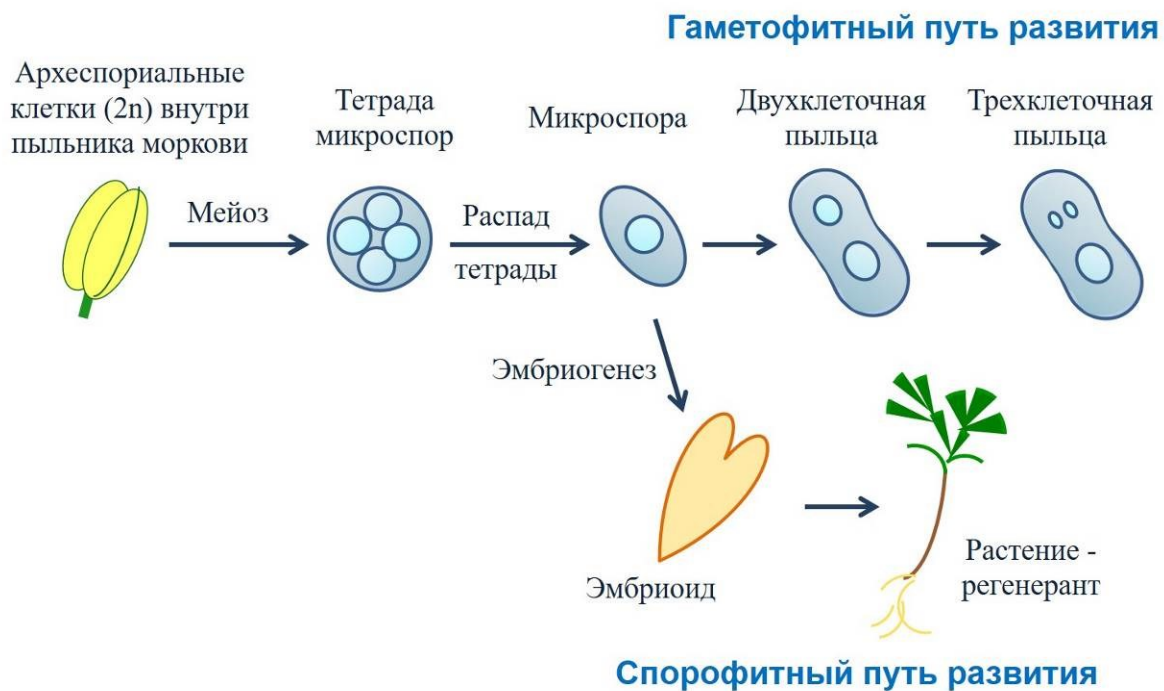


Рис. 37. Схема формирования пыльцевого зерна моркови и возможного перехода микроспоры с гаметофитного на спорофитный путь развития

Развитие растения из гаплоидных клеток мужских генеративных органов называют **андрогенезом**.

Мужской гаметофит развивается следующим образом: диплоидные археспориальные клетки внутри пыльника делятся путем мейоза, образуются тетрады микроспор (четыре гаплоидные клетки под одной оболочкой); тетрада распадается на четыре микроспоры, каждая из них имеет одно гаплоидное ядро; увеличивается размер и изменяется форма клетки, вакуоль оттесняет ядро из центра к периферии, формируются поздние вакуолизованные микроспоры. Далее микроспора созревает в пыльцу - ядро делится путем митоза и образуется двухклеточная пыльца, состоящая из большой вегетативной и маленькой генеративной клеток; генеративная клетка митотически делится, в результате чего образуются два спермия и получается трехклеточная пыльца (рис. 38). После опыления вегетативная клетка будет прорастать, формируя пыльцевую трубку, по которой спермии проникнут в зародышевый мешок, где произойдет двойное оплодотворение. У некоторых растений зрелая пыльца двухклеточная (томат, тыква) и второе митотическое деление с образованием спермиев происходит в пыльцевой трубке, у других – трехклеточная (капуста, морковь).

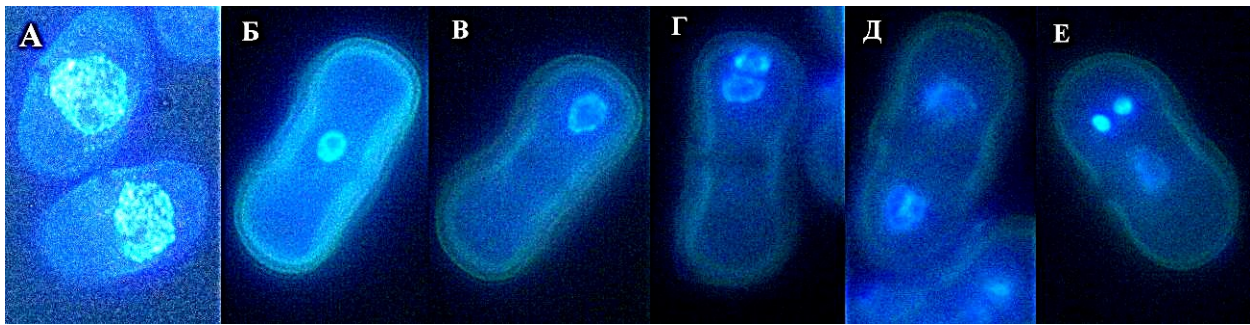


Рис. 38. Микроспоры и пыльца моркови, окрашенные флюоресцентным красителем DAPI, в которых видны ярко светящиеся ядра: А – ранняя одноядерная микроспора; Б – средняя одноядерная микроспора; В – поздняя одноядерная микроспора; Г, Д – двухядерная пыльца; Е – зрелая трехядерная пыльца

Если муской гаметофит – микроспору поздней одноядерной стадии развития поместить в определенные условия, будет формироваться не пыльцевое зерно, а целое растение – спорофит.

На эффективность производства удвоенных гаплоидов влияет множество факторов: стадия развития генеративных клеток и органов, генотип растения, подготовка растительного материала, состав питательных сред, температурное воздействие, освещенность и другие условия культивирования. Стадия развития микроспор является первым фактором, который необходимо учитывать при разработке технологии культивирования микроспор любой новой культуры. Для большинства растений подходит культивирование поздних вакуолизированных микроспор. Бутоны, содержащие нужную стадию развития гаплоидных клеток, обычно отбирают по их внешнему виду и размерам. Для разных растений в качестве маркеров стадии развития микроспор используют длину, диаметр или окраску бутонов, длину и окраску пыльников, форму соцветия.

Для получения удвоенных гаплоидов методом андрогенеза используют **культуру пыльников** (на питательную среду помещают пыльники) или **культуру микроспор** (в жидкой среде культивируют изолированные микроспоры).

Культура пыльников. Для получения удвоенных гаплоидов в культуре пыльников выращивают донорные растения, отбирают с них бутоны, содержащие преимущественно одноядерные микроспоры. Бутоны поверхностно стерилизуют. Пыльники извлекают из бутонов и помещают на питательную среду. Для разных видов растений может быть необходим температурный шок – инкубирование пыльников при низкой или повышенной температуре в течение нескольких дней. Из клеток пыльников формируются эмбриониды либо каллус, их пересаживают на среду для регенерации и дорастивания. Полученные растения адаптируют в кассетах с торфом, выявляют гаплоиды, удвоенные гаплоиды и клоны исходного

донорного растения. Удвоенные гаплоиды доводят до цветения, проводят самоопыление и гибридизацию.

С помощью культуры пыльников можно получать удвоенные гаплоиды ряда культур (капуста, морковь и др.), метод отличается относительной простотой. Важным недостатком культуры пыльников является неопределенность происхождения растений-регенерантов, так как эмбриониды и каллус могут формироваться как из микроспор, так и из соматических клеток пыльника (рис. 39).

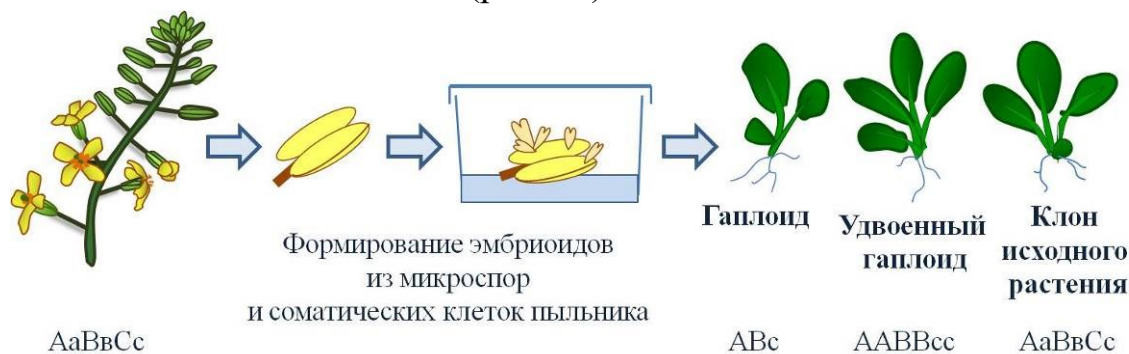


Рис. 39. В культуре пыльников можно получить растения-регенеранты как из микроспор, так и из соматических клеток пыльников

Культура изолированных микроспор. Для получения удвоенных гаплоидов ряда культур (капуста, рапс, морковь, пшеница, баклажан и др.) используют культуру изолированных микроспор. Эта технология менее трудоемкая, чем культура пыльников, но требует наличия дополнительного оборудования и материалов. Так как в жидкой питательной среде культивируют изолированные клетки микроспор без соматических клеток донорного растения, нет неопределенности происхождения растений-регенерантов, они будут либо гаплоидами, либо удвоенными гаплоидами (рис. 40).

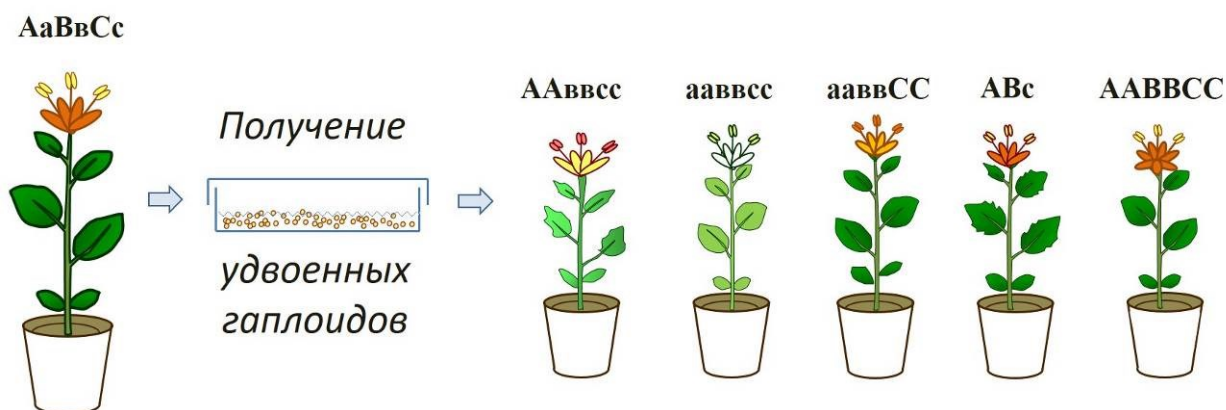


Рис. 40. В результате культивирования микроспор можно получить растения-гаплоиды и растения-удвоенные гаплоиды

Чтобы получить удвоенные гаплоиды в культуре изолированных микроспор, выращивают донорные растения, отбирают с них бутоны,

содержащие преимущественно одноядерные микроспоры. Бутоны поверхностно стерилизуют, а затем раздавливают в небольшом количестве жидкой питательной среды. Полученную смесь фильтруют. Лепестки, пестики и другие фрагменты бутонов остаются на фильтре, а суспензия микроспор проходит через поры. Суспензию микроспор центрифугируют. Микроспоры оседают на дно пробирки, а клеточный сок и поврежденные клетки остаются в надосадочной жидкости. Надосадочную жидкость сливают, микроспоры ресуспензируют в жидкой питательной среде. Важно получить суспензию определенной плотности, для этого подсчитывают количество клеток в единице объема среды с помощью счетной камеры Фукс-Розенталя и добавляют необходимое количество питательной среды. Суспензию микроспор разливают по чашкам Петри, при необходимости несколько дней инкубируют в термостате или в холодильнике, чтобы подвергнуть температурному шоку и культивируют при соблюдении необходимых физических условий. Из клеток микроспор формируются эмбриониды (рис. 41) либо



кallус, их пересаживают на среду для регенерации и дорастивания (Лабораторная работа №10).

Рис. 41. Эмбриониды, сформировавшиеся в культуре микроспор капусты

Полученные растения адаптируют и укореняют в кассетах с торфом, выявляют гаплоиды и удвоенные гаплоиды. Удвоенные гаплоиды доводят до цветения, проводят самоопыление и гибридизацию.

Развитие растения из гаплоидных клеток женских генеративных органов называют **гиногенезом**.

Женский гаметофит развивается следующим образом: в завязи пестика формируется семязачаток, диплоидная археспориальная клетка внутри семязачатка пыльника делится путем мейоза, образуется тетрада макроспор. Далее происходит гаметогенез. Три макроспоры дегенерируют, одна оставшаяся делится путем митоза, образуется двухъядерный зародышевый мешок. Далее происходит еще два последовательных митотических деления, образуется восьмиядерный зародышевый мешок, в котором у полюсов располагается по четыре ядра. По одному ядру от каждого полюса сдвигаются к центру зародышевого мешка и сливаются, образуя центральное диплоидное ядро. Формируется яйцеклетка, две синергиды, три антиподы

(рис. 42). Центральное ядро имеет диплоидный набор хромосом, остальные клетки зародышевого мешка гаплоидные. Необходимо отметить, что существуют другие типы развития зародышевого мешка у разных видов покрытосеменных растений.

В культуре *in vitro* формирование растения может происходить из любой клетки семязачатка. Из яйцеклетки, синергид и антипод формируются гаплоиды и удвоенные гаплоиды, из клеток интегументов, нуцеллуса – клоны донорного растения.

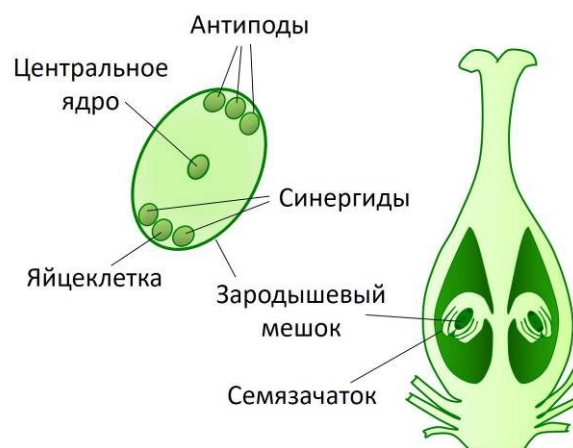


Рис. 42. Строение зародышевого мешка покрытосеменных растений

Для получения удвоенных гаплоидов методом гиногенеза используют культуру бутонов, культуру завязей, культуру неоплодотворенных семязачатков. Донорные растения выращивают до цветения, отбирают бутоны подходящей стадии развития. Целые бутоны, фрагменты завязей или выделенные семязачатки помещают на питательную среду. При необходимости проводят высокотемпературную или низкотемпературную обработку. После получения гаплоидных эмбриоидов/микрорастений при необходимости проводят полиплоидизацию – обработку колхицином или амипрофосметилом для удвоения гаплоидного числа хромосом. Полученные растения доращивают, адаптируют и проводят их оценку.

Необходимо дифференцировать растения гаплоиды, удвоенные гаплоиды и клоны донорного растения, которые могли сформироваться из соматических клеток завязи.

Культуру цветковых бутонов применяют при производстве удвоенных гаплоидов лука (рис. 43), культуру завязей – для огурца, культуру семязачатков – для получения удвоенных гаплоидов тыквы, кабачка, сахарной свеклы.

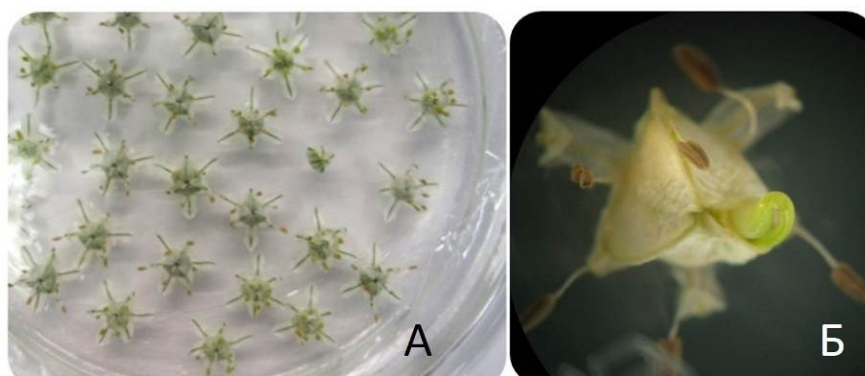


Рис. 43. Цветковые бутоны лука на питательной среде (А), формирование эмбриоида в культуре бутонов лука (Б)

Удвоенные гаплоиды можно получать не только в культуре *in vitro*, но и *in vivo* при опылении растений пыльцой других видов (ячмень), опылением облученной пыльцой (дыня), опылением растений-гаплопродюсеров пыльцой линии-гаплоиндуктора (кукуруза).

7.2. Эмбриокультура

Эмбриокультурой называют культивирование незрелых или зрелых зародышей *in vitro*. Эмбриокультуру используют для спасения незрелых зародышей при отдаленной гибридизации, проращивания семян мелкосемянных культур (орхидей), культивирования зародышей для генетической трансформации.

Спасение зародышей мелкосемянных культур. Семена орхидных распространяются ветром, они пылевидные и разлетаются после растрескивания созревшего плода. Семена не имеют достаточного запаса питательных веществ и для прорастания им необходима микориза. Семена орхидных также можно проращивать на искусственной питательной среде. Для этого проводят опыление, незадолго до полного созревания срезают плод и поверхностно стерилизуют его. Семена извлекают и распределяют на поверхности питательной среды. Формируются проростки – протокормы, их пересаживают на свежую питательную среду, доращивают и адаптируют, доводят до цветения (Лабораторная работа №11).

Спасение зародышей при отдаленной гибридизации. Отдаленную гибридизацию, скрещивание организмов, относящихся к разным видам или родам, чаще всего проводят для получения исходного материала при селекции на устойчивость к неблагоприятным биотическим и абиотическим факторам. Отдаленная гибридизация может встретить препятствие в виде прогамной несовместимости (невозможность пыльцы прорасти на рыльце пестика, разрыв пыльцевой трубки в столбике) и постгамной несовместимости (гибель гибридного зародыша, стерильность гибридного растения). Для преодоления прогамной самонесовместимости в некоторых случаях применяют оплодотворение *in vitro* – культивирование завязей с нанесенной на них пыльцой. В случае постгамной несовместимости, если оплодотворение происходит, но гибридный зародыш гибнет через некоторое время из-за невозможности развиваться на материнском растении, применяют эмбриокультуру – спасение зародышей.

Спасение зародышей применяют для получения межвидовых и межродовых гибридов капустных культур. В культуру эффективнее вводить

более развитые зародыши, то есть отобрать их с растения нужно как можно позже, но конечно же, до их гибели. После проведения гибридизации зародыш развивается на материнском растении в течение 2-3 недель, затем завязи отбирают с растения и поверхностно стерилизуют. Из завязей извлекают семязачатки (незрелые семена), надсекают и культивируют в жидкой питательной среде при постоянном покачивании на шейкере. Зародыши выходят из надсеченных семян и развиваются в питательной среде, для прорастания их пересаживают на твердую среду в контейнеры. Полученные растения адаптируют, при необходимости проводят полиплоидизацию с помощью обработки колхицином. Далее проводят оценку полученных растений и серию бэккроссов.

В результате применения метода спасения зародышей межвидовой гибридизация получены сорта капусты белокочанной с генами устойчивости к киле от европейской кормовой репы и брюквы, растения капусты белокочанной с геном устойчивости к сосудистому бактериозу от горчицы абиссинской.

7.3. Соматическая гибридизация

Соматический гибрид - клетка (развившееся из нее растение), образованная в результате слияния протопластов генетически различающихся соматических клеток. **Протопласты** – живое содержимое клетки: ядро и цитоплазма, то есть протопласты – это растительная клетка, лишенная клеточной стенки.

Слияние протопластов - технология формирования одной клетки из двух или более протопластов с объединением их поверхностных мембран (плазмалемм). Данная технология дает возможность слияния протопластов разных видов растений, несовместимых при использовании других методов гибридизации, а также объединения двух цитоплазм (рис. 44).

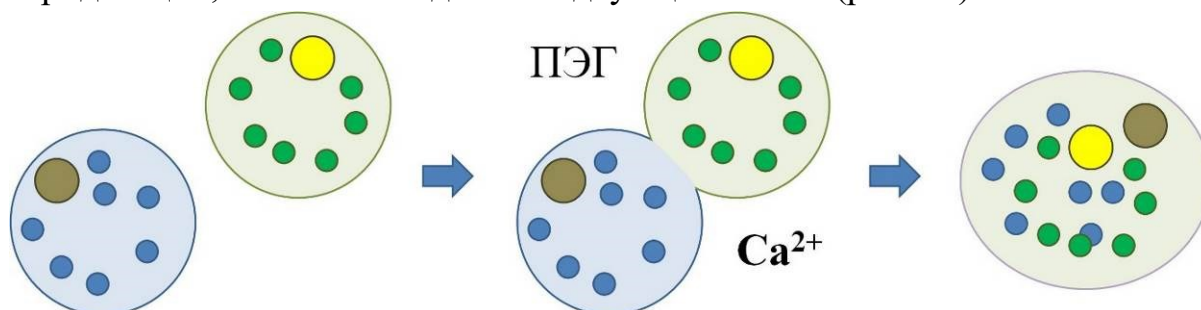


Рис. 44. Схематическое изображение процесса слияния протопластов

Генетическая информация содержится не только в ядре клетки, но и в пластидах (митохондриях, хлоропластах). У большинства многоклеточных организмов при половой гибридизации ДНК пластид наследуется по

материнской линии. Соматическая гибридизация позволяет получить клетку (и развившееся из нее растение), содержащую пластиды обоих родителей.

Основными этапами технологии слияния протопластов являются: подготовка растительного материала, получение протопластов, слияние протопластов, отбор гибридных протопластов, получение растений-регенерантов и их оценка.

В качестве источника протопластов часто используют гипокотили асептически полученных проростков, листовые пластинки, суспензионную культуру клеток. Чтобы получить протопласты, растительную ткань помещают в раствор солей для плазмолиза, затем инкубируют в смеси ферментов целлюлазы и пектиназы для разрушения клеточной стенки, после чего с помощью фильтра и градиентного центрифугирования отделяют протопласты от обломков клеток и фрагментов ткани. Протопласты двух видов смешивают и создают условия их слияния. Существует **два способа слияния протопластов**: с помощью полиэтиленгликоля и электрослияние. Внешняя сторона плазмалеммы имеет отрицательный заряд, поэтому оба способа направлены на преодоление взаимного отталкивания протопластов.

Первый способ основан на использовании полимера полиэтиленгликоля (ПЭГ), который способствует слипанию протопластов, и раствора с высоким рН и содержанием ионов Ca^{2+} , который нейтрализует отрицательный поверхностный заряд протопластов и приводит к разрыву плазмалеммы в местах слипания.

Другой способ – электрослияние, подразумевает использование специального прибора с маленькой камерой, в которую помещают суспензию протопластов. Под воздействием электрического поля протопласты выстраиваются рядами от одного электрода до другого. Под воздействием импульса определенной силы и продолжительности соседние протопласты сливаются.

Отбор гибридных протопластов можно провести, например, с помощью микроманипуляторов и инвертированного микроскопа. Если в качестве источника протопластов одного вида выбирать листовые пластинки, а другого вида – полученные в темноте проростки, то гибридные протопласты будут содержать и зеленые, и белые пластиды. Также возможно окрашивание протопластов родителей разными красителями, не влияющими на жизнеспособность клеток, в таком случае гибридные протопласты будут содержать оба красителя. В случае, если отбор гибридных протопластов невозможно провести, культивируют всю суспензию, то есть смесь гибридных и родительских протопластов, затем оценивают полученные растения-регенеранты.

Технология слияния протопластов не гарантирует объединение двух протопластов разных видов. Протопласты объединяются случайным образом. Если сливаются протопласты одного вида образуются **гомокарионы** – клетки с двумя или более идентичными ядрами. При слиянии протопластов разных видов образуются **гетерокарионы** – клетки с двумя или более генетически различными ядрами, в которых слияние ядер не произошло. Ядра могут самостоятельно делиться и образовывать новые клетки. В случае слияния различающихся ядер соматических клеток формируется **синкарион**. Слияние протопластов двух или более клеток, приводящее к формированию синкариона называют **гибридизацией клеток**.

Получение растений соматических гибридов затруднено из-за крайне низкой частоты регенерации растений из слитых протопластов. Часто такие растения стерильны.

Также возможно получение цибридов. **Цибрид** – это растение, ядро которого происходит от одного родителя, а цитоплазма от другого. Чтобы получить цибрид, протопласты одного вида подвергают энуклеации, то есть разрушению или удалению ядра, например, обработкой рентгеновским облучением. Получаются **цитопласты** – ограниченные мембраной цитоплазмы клетки после энуклеации. Из протопластов другого вида градиентным центрифугированием выделяют ядра. Затем проводят слияние цитопластов одного растения и ядра другого растения (рис. 45). Для передачи мужской стерильности были получены цибриды с ядром петрушки и цитоплазмой моркови.

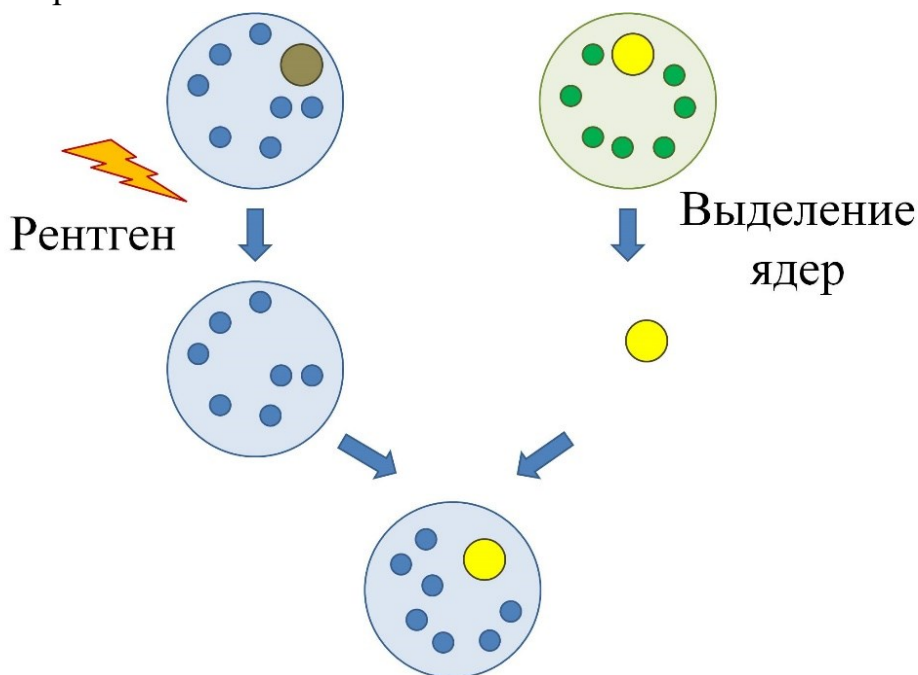


Рис. 45. Схема получения цибрида

Лабораторная работа № 10. Эмбриогенез в культуре изолированных микроспор капусты белокочанной

Линии удвоенных гаплоидов с успехом используют в качестве родительских линий для производства F₁-гибридов капусты белокочанной. Для производства удвоенных гаплоидов капусты применяют культуру изолированных микроспор. В зависимости от генотипа можно в каждой чашке Петри с суспензией микроспор получить от нескольких штук до нескольких десятков штук эмбриоидов, которые затем прорастают в гомозиготные растения. Удвоение числа хромосом происходит спонтанно, так что дополнительная обработка колхицином не требуется. В ООО «Селекционная станция им. Н.Н. Тимофеева» на базе удвоенных гаплоидов получены F₁-гибридов капусты белокочанной Настя, Киластоп, Добродей, Барыня, Отличник.

Ход работы:

1. Приготовить жидкую питательную среду В5 с добавлением 130 г/л сахарозы и 50 г/л манитола для выделения микроспор капусты, стерилизовать ее автоклавированием.
2. Приготовить жидкую питательную среду NLN13 для культивирования микроспор капусты, стерилизовать ее с помощью фильтра.
3. С помощью штангенциркуля отобрать бутоны капусты размером 4,5-5,0 мм, поместить в чайное ситечко.
4. Поверхностно стерилизовать бутоны в 2% растворе гипохлорита с добавлением Твин 20 в течение 10 минут, трижды промыть автоклавированной водой.
5. Поместить бутоны в контейнер с 2 мл питательной среды В5, раздавить их поршнем.
6. Отделить фрагменты тканей бутонов с помощью двуслойного нейлонового фильтра с диаметром пор 45 мкм.
7. Отделить микроспоры центрифугированием в течение 4 мин при 800 об./мин.
8. Слить надосадочную жидкость (клеточный сок и травмированные микроспоры).
9. Ресуспензировать микроспоры в той же питательной среде, повторить пункты 7-8 ещё два раза.
10. Ресуспензировать микроспоры в питательной среде NLN-13 так, чтобы плотность полученной суспензии составила $4 \cdot 10^4$ шт.микроспор/мл среды. Суспензию разлить по чашкам Петри 10 мл на чашку.

11. Культивировать в темноте 2 суток при температуре 32°C, далее при температуре 24 °С.

12. Сформировавшиеся эмбрионды пересадить на твердую питательную среду В5 (рис. 46).

13. Сформировавшиеся растения адаптировать, выявить гаплоиды и удвоенные гаплоиды, провести самоопыление и гибридизацию.

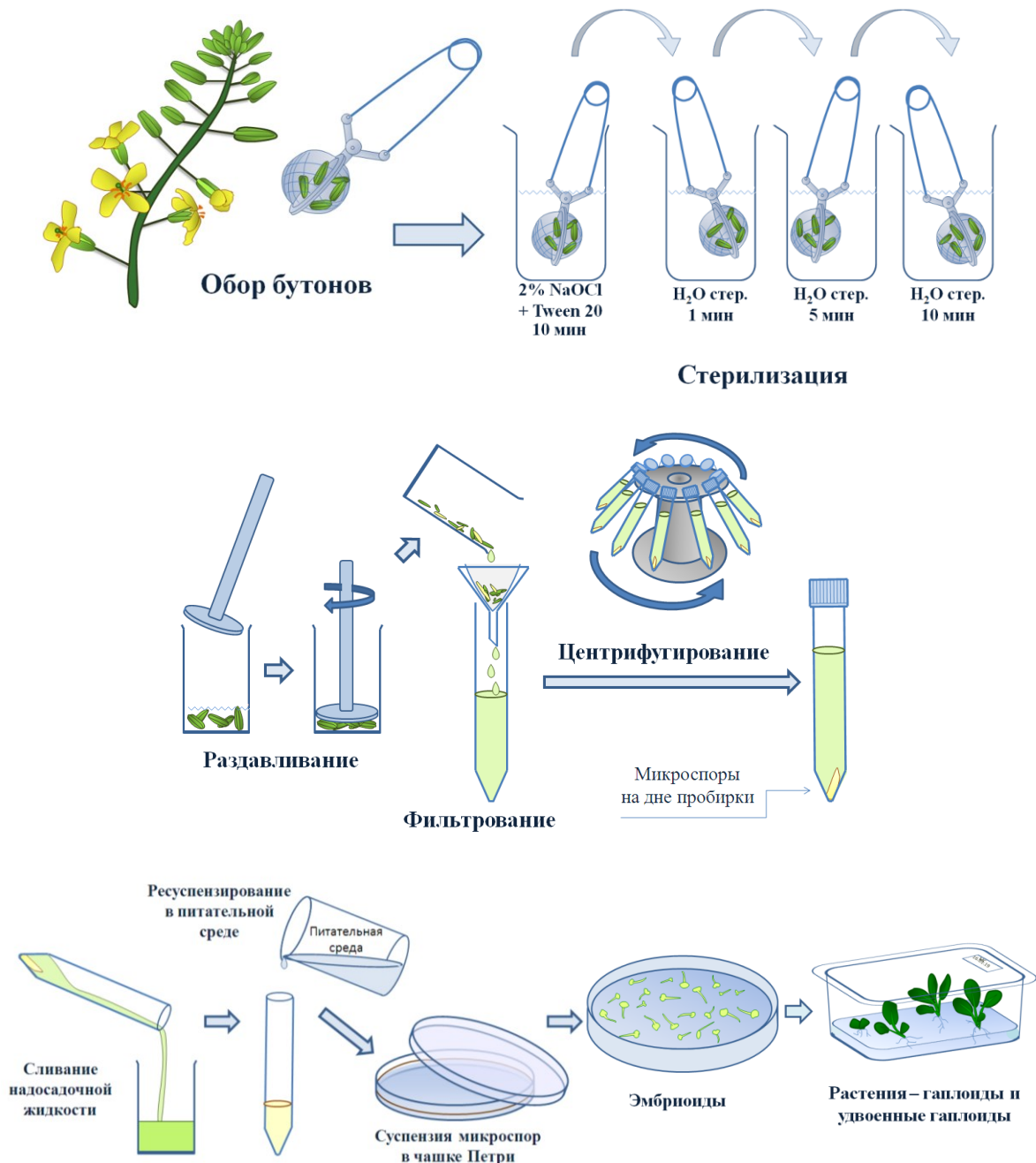


Рис. 46. Схема технологии производства удвоенных гаплоидов капусты в культуре изолированных микроспор

Лабораторная работа № 11. Проращивание семян фаленопсиса *in vitro*

Фаленопсис (*Phalaenopsis* × *hybridum* Blume.) – одна из самых распространенных и популярных орхидей, имеет большое экономическое значение в цветоводстве, используется и как комнатное растение, и в срезке. Существует огромное разнообразие сортов фаленопсиса, различающихся по окраске, размеру и аромату цветков, компактности розетки листьев. Метод микроклонального размножения позволяет получать клоны сортов. Семенное размножение фаленопсиса используют для селекционных целей. Семена фаленопсиса распространяются ветром, они мельчайшие, пылевидные, не имеют достаточного запаса веществ, для прорастания им необходима микориза. Семена также можно проращивать на питательных средах *in vitro*.

Цель: получить новые декоративные формы фаленопсиса с помощью семенного размножения.

Ход работы:

1. Провести опыление (гибридизацию или самоопыление): подвести инструмент (пинцет, карандаш или зубочистку) под колонку цветка таким образом, чтобы на нем с помощью прилипания закрепился поллиний; отделить поллиний от колонки; снять прикрывающий поллинии колпачок; поместить поллинии в углубление на нижней стороне колонки; закрепить на цветоножке этикетку с отметкой комбинации и дате опыления. На одном растении не следует опылять более двух цветков.

2. Приготовить питательную среду MS с добавлением 3 г/л фитогеля (или 7 г/л агара), 30 г/л сахарозы, довести значение pH до 5,7, автоклавировать и разлить по чашкам Петри.

3. Через 4 месяца после опыления срезать плоды, поверхностно стерилизовать 2%-м раствором гипохлорита натрия с добавлением Tween 20 и трижды промыть автоклавированной водой.

4. Разрезать плоды скальпелем, семена ресуспензировать в стерильной воде, суспензию равномерно распределить по поверхности питательной среды.

5. Культивировать в условиях световой комнаты при температуре 24°C, влажности 70-80%, фотопериоде 16/8 часов день/ночь 3-4 месяца.

6. Доращивать на свежей питательной среде того же состава.

7. Полученные растения с несколькими листьями и корнями адаптировать в смеси торфа и коры.

Контрольные вопросы

1. Какие растения называют удвоенными гаплоидами, для чего их используют?
2. Как получают чистые линии традиционными методами селекции?
3. Как получают удвоенные гаплоиды? Какие преимущества и недостатки есть у каждого метода?
4. Для чего проводят отдаленную гибридизацию? Какие есть способы преодоления прогамной и постгамной несовместимости?
5. Почему для получения семенного потомства фаленопсиса используют питательные среды? Можно ли ожидать расщепление в потомстве от самоопыления сорта фаленопсиса?
6. Для чего проводят соматическую гибридизацию?
7. Что такое протопласты, как их получают?
8. В чем особенность цибридов?

Глава 8. Генетическая трансформация

Трансгенез (генетическая трансформация) – перенос гена или группы генов из одного организма в другой и создание условий для его/их экспрессии (транскрипции и синтеза продукта).

8.1. История открытия явления генетической трансформации и разработки методов генетической модификации

Явление генетической трансформации было обнаружено при изучении бактерий, которым свойственен горизонтальный перенос генов, то есть передача генетического материала организму-непотомку. Бактерии в определенных условиях могут обмениваться генетическим материалом, а также захватывать и использовать молекулы ДНК из окружающей среды. Например, так происходит передача устойчивости к антибиотикам между бактериями.

В **1928 г.** *Фредерик Гриффит* впервые описал трансформацию бактерий. В его эксперименте были использованы два штамма бактерий пневмококков (*Streptococcus pneumoniae*): вирулентный S-штамм и невирулентный R-штамм.

- Вирулентный S-штамм имеет капсулу, защищающую его от иммунной системы хозяина, при введении его мышам вызывал их гибель;
- Убитый нагреванием S-штамм не вызывал болезнь;
- Невирулентный R-штамм не имеет капсулу и не вызывал болезнь;
- Смесь убитого нагреванием S-штамма и живых бактерий R-штамма вызывала болезнь и гибель мышей, в их тканях были обнаружены живые бактерии обоих штаммов.

Ф. Гриффит предположил, что бактерии невирулентного R-штамма трансформировались компонентом убитого нагреванием S-штамма. В 1944 году Освальд Эвери, Колин Маклауд и Маклин Маккарти показали, что этот компонент – ДНК.

В **1944 г.** *Освальд Эвери* воспроизвел эксперимент Гриффита с некоторыми модификациями и показал роль ДНК в хранении и передаче генетической информации. После публикации результатов этого эксперимента внимание ученых к молекуле ДНК возросло и в **1953 г.** *Джон Уотсон* и *Френсис Крик* описали структуру молекулы ДНК.

В **1962-1975 гг.** были описаны и выделены ферменты бактерий, с помощью которых происходят фрагментация ДНК, соединение ее

фрагментов, синтез ДНК. С помощью этих ферментов в клетках и осуществляются манипуляции с ДНК, а после их выделения стала возможной искусственная генетическая трансформация, которую называют **генетической модификацией**. Генетический код универсален для всех живых организмов, это означает, что последовательность ДНК кодирует одинаковую последовательность аминокислот во всех организмах.

В **1982 г.** был зарегистрирован препарат человеческого инсулин, вырабатываемый генетически модифицированными бактериями *Escherichia coli*.

В **1983 г.** было получено первое генетически модифицированное растение - табак, устойчивый к антибиотику.

Примеры генетически-модифицированных организмов:

- Кишечная палочка, синтезирующая человеческий инсулин;
- Кишечная палочка, синтезирующая человеческий гормон соматотропин;
- Соя, кукуруза, устойчивые к глифосату (гербициду Раундап);
- Хлопчатник, устойчивый к хлопковой совке;
- Глофиш (GloFish) - флуоресцирующие аквариумные рыбки данио и тернеции с яркой окраской.

Генетическую модификацию проводят для научных исследований (изучение функций генов) и в практических целях для получения сортов с конкурентными преимуществами (устойчивость к гербицидам, болезням, вредителям, засухе, засолению, большой коэффициент размножения, увеличение длины волокна, модификация вкуса, аромата и окраски, увеличение продолжительности хранения, улучшение питательной ценности, производство вакцин, ферментов и т.д.).

Выделяют следующие **этапы генетической модификации**: получение нужного гена; встраивание гена в вектор; введение вектора с целевым геном в организм; отбор модифицированных клеток/организмов.

8.2. Получение гена

Известно три способа получения гена: **рестриктазный, химико-ферментативный синтез и синтез на основе мРНК**.

Рестриктазы (эндонуклеазы рестрикции) – ферменты, которые узнают определенные последовательности нуклеотидов молекулы ДНК и фрагментируют ее путем внесения разрывов в обеих цепях сахаро-фосфатного остова (рис. 47).

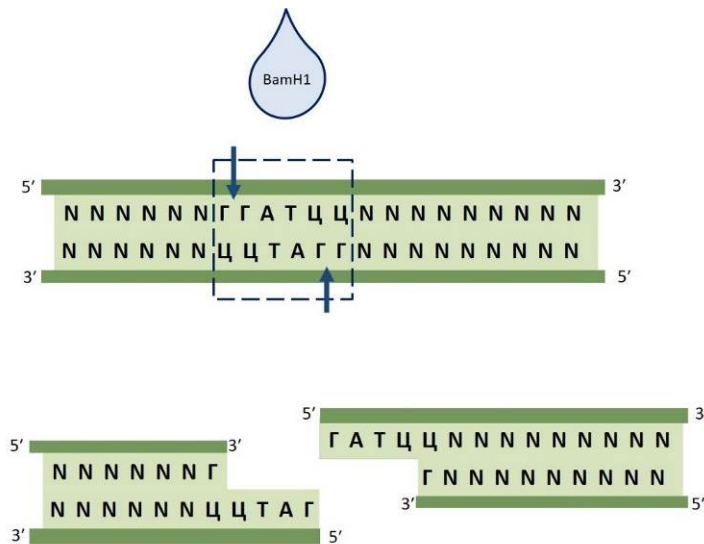


Рис. 47. Рестриктаза *BamHI* узнает сайт рестрикции и фрагментирует молекулу ДНК, внося разрывы в сахаро-фосфатных остовах обеих цепей молекулы

Известно около 2000 рестриктаз, эти ферменты были обнаружены и выделены из бактерий. Рестриктаза узнает определенную последовательность нуклеотидов – **сайт рестрикции** – и связывается с ней. Есть рестриктазы, которые вносят разрыв в некотором отдалении от сайта рестрикции, но больший практический интерес представляют рестриктазы, которые вносят разрыв внутри сайтов рестрикции.

Сайты рестрикции могут состоять из четырех, пяти, шести, восьми и более пар нуклеотидов. От длины сайта рестрикции зависит частота его встречаемости в молекуле ДНК. Если молекула ДНК содержит один сайт рестрикции, рестриктаза разрезает ее на два фрагмента. Если сайтов рестрикции больше, фрагментов получается больше. Молекулу ДНК можно фрагментировать механически, например, пропустив через шприц с иглой небольшого диаметра, но использование рестриктаз позволяет вносить разрывы в строго определенных участках, которые определяются последовательностью нуклеотидов. В названии рестриктаз указаны первые буквы названия бактерии, в которой этот фермент был обнаружен, серотип и порядковый номер, так как у одного вида бактерии может быть обнаружено несколько различающихся рестриктаз (рис. 48).

После использования рестриктаз образуются фрагменты ДНК с «липкими» или «тупыми» концами. Если точки расщепления обеих цепей ДНК расположены друг под другом в сайте рестрикции, получаются «тупые» концы. Если после рестрикции присутствуют выступающие одноцепочечные участки ДНК, концы называют «липкими» (на рис. 48 фрагменты, полученные после использования рестриктаз *BamHI* и *DraI*). В «липких» концах выступающим одноцепочечным участком может быть как 5'-, так и 3'-конец (на рис. 48 фрагменты, полученные после использования рестриктаз

*Bam*HI и *Cof*I). Известны рестриктазы, которые узнают одни и те же сайты рестрикции, но разрезают их по-разному.

Рестриктаза Бактерии, в которых обнаружена	Сайт рестрикции. Стрелками указаны места внесения разрывов	Продукт рестрикции
<i>Bam</i>HI <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		
<i>Eco</i>RI <i>Escherichia coli</i>		
<i>Eco</i>RII <i>Escherichia coli</i>		
<i>Dra</i>I <i>Deinococcus radiophis</i>		
<i>Cof</i>I <i>Clostridium formicoaceticum</i>		

Рис. 48. Примеры рестриктаз и получаемый после их использования фрагментов

С помощью рестриктаз можно «разрезать» молекулу ДНК в определенном месте.

Лигаза – ферменты, которые «сшивают» фрагменты ДНК за счет восстановления фосфодиэфирных связей сахаро-фосфатного остова цепей ДНК. Чаще всего используют одну лигазу - ДНК-лигазу бактериофага Т4. Наиболее эффективно происходит соединение фрагментов, имеющих комплементарные «липкие» концы. С помощью ферментов рестриктазы и лигазы можно получать рекомбинантную ДНК (рис. 49).

Рекомбинантная ДНК (рДНК) – искусственно полученная молекула, состоящая из фрагментов ДНК разных организмов.

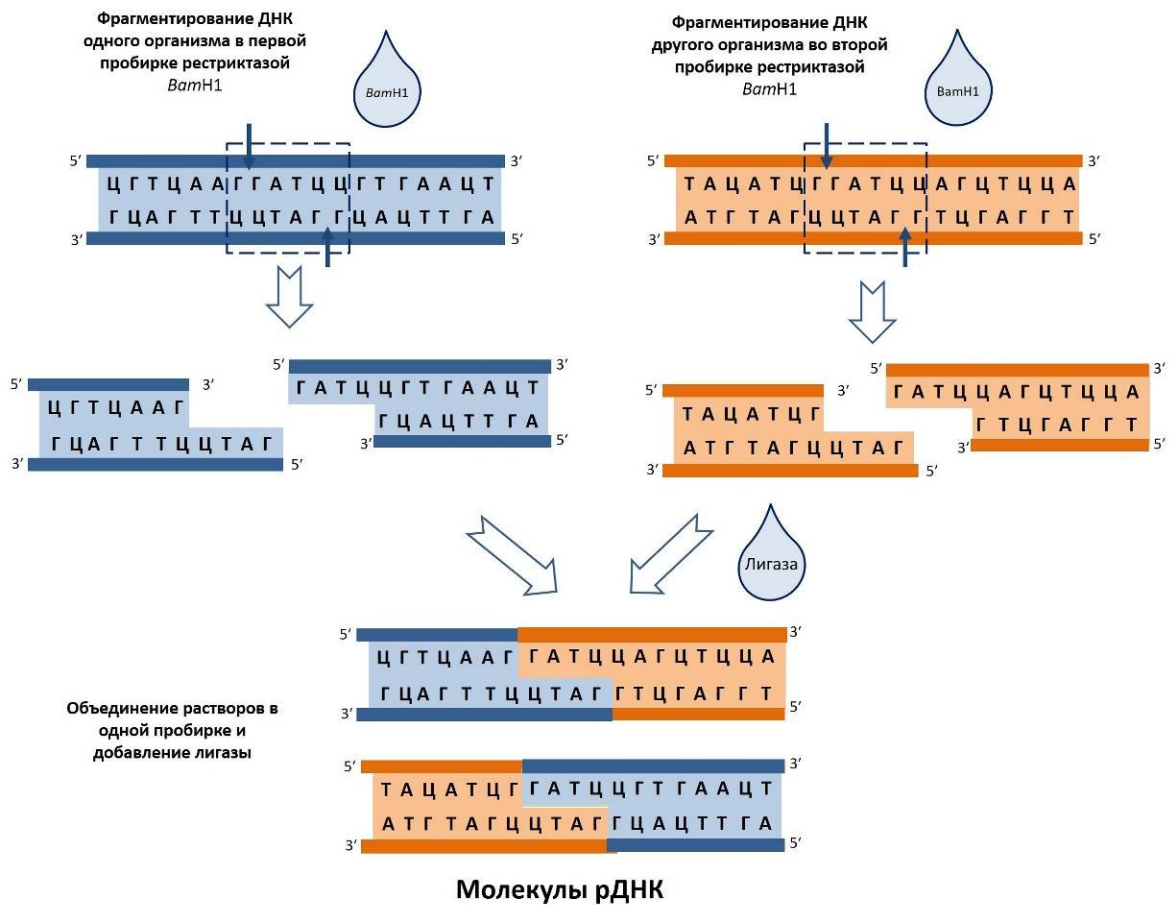


Рис. 49. Получение рекомбинантной ДНК с помощью ферментов рестрикции и лигирования. Разным цветом условно отмечены ДНК двух разных организмов

Вектор – это молекула ДНК, которая способна реплицироваться (копироваться) в клетке и используется для переноса чужеродного фрагмента ДНК для его клонирования и/или экспрессии. Бактерии, вирусы и фаги способны трансформировать клетки, поэтому для получения векторов чаще всего используют плазмиды бактерий и ДНК вирусов и фагов (рис. 50, 51).

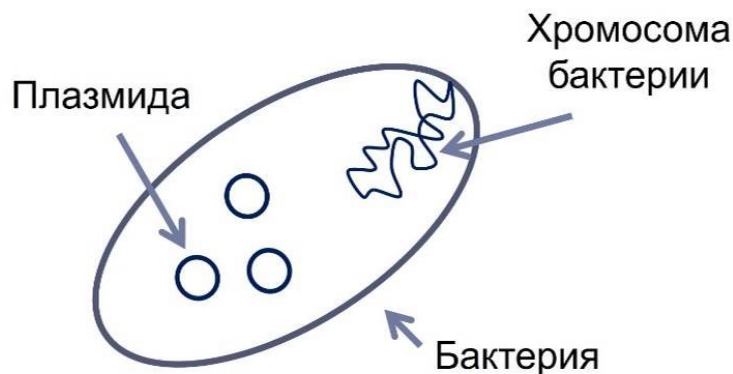


Рис. 50. Плазмиды - внехромосомные автономно реплицирующиеся кольцевые ДНК

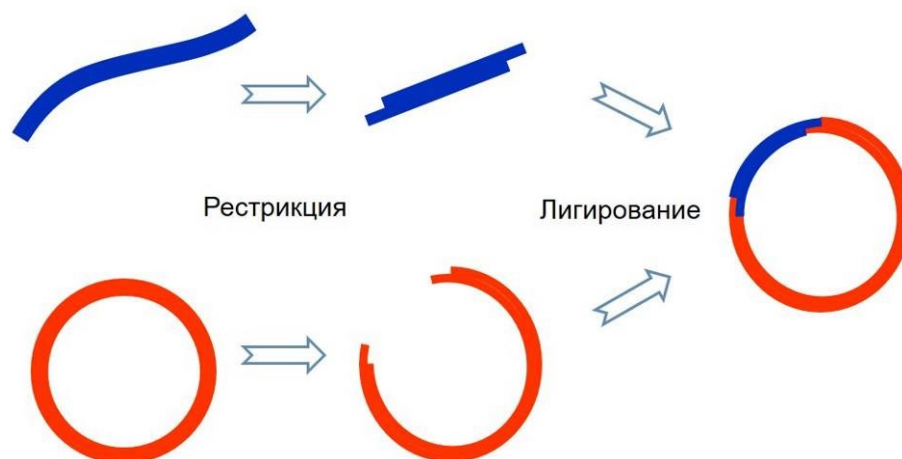


Рис. 51. Внедрение трансгена в вектор на основе плазмиды

С помощью рестриктаз можно получить фрагменты ДНК, но места разрезов зависят исключительно от расположения сайтов рестрикции. Это значит, что нет гарантии того, что нужный ген целиком окажется на одном фрагменте. После получения фрагментов нужно провести идентификацию возможно выделенных генов, для этого создают геномную библиотеку.

Геномная библиотека – набор фрагментов ДНК генома определенного организма, которые находятся в составе векторов клонирования. Чтобы получить геномную библиотеку, выделяют ДНК изучаемого организма, фрагментируют ее рестриктазой, фрагменты встраивают в вектор с помощью лигазы. Получается набор одинаковых векторов с уникальными вставками. Эти векторы захватываются клетками-реципиентами – обычно используют кишечную палочку или дрожжи. В каждой клетке оказывается вектор с уникальной вставкой. Каждая клетка делится и формирует колонию, все клетки колонии несут в себе копию вектора со вставкой. Таким образом в живых клетках происходит клонирование, то есть копирование фрагмента ДНК изучаемого организма. Изучая такие колонии, исследователь ищет нужный ген организма.

Одна из проблемы при работе с геномной библиотекой заключается в том, что рестриктазы разрезают ДНК в зависимости от расположения сайтов рестрикции, а не от расположения генов. Так что начало гена может оказаться в бактериях одной колонии, а конец – в бактериях другой колонии. К тому же ДНК эукариот содержит кроме собственно генов (участков молекулы, содержащих информацию об определенном белке) огромное количество так называемой «мусорной» ДНК (участков, регулирующих экспрессию генов, содержащих информацию о функциональной РНК, участков с неизвестными функциями, остатков древних вирусов). Например, в человеческой клетке всего лишь около 2% ДНК кодирует белки, каждая

клетка человека содержит информацию о всех генах, а их около 20 000, так что шанс обнаружить нужный ген в таком огромном массиве последовательностей минимален. К тому же ген эукариот состоит из экзонов – участков, содержащих информацию о последовательности аминокислот в белках и интронов – некодирующих последовательностей.

Химико-ферментативный синтез гена включает два этапа: синтез коротких 8-16 нуклеотидных звеньев одноцепочечных ДНК и последующее их сшивание лигазой. С помощью этого метода можно синтезировать ген, зная последовательность аминокислот белка. Химико-ферментативный синтез используют для получения относительно коротких генов.

Синтез ДНК на основе мРНК осуществляют с помощью фермента ревертазы. Ревертаза (обратная транскриптаза, РНК-зависимая ДНК-полимераза) – фермент, синтезирующий ДНК на матрице РНК (рис. 52). Полученную ДНК называют комплементарной ДНК (кДНК), так как она комплементарна РНК. Синтез генов на основе выделенной из клетки матричной РНК - наиболее популярный метод синтеза генов. Впервые фермент ревертаза обнаружен в 1970 в составе ретровирусов.

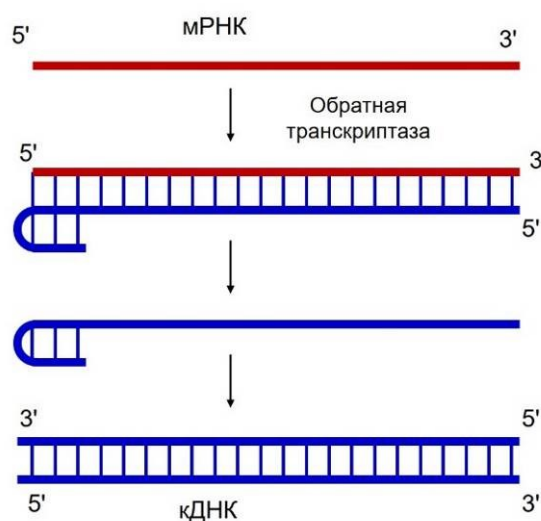


Рис. 52. Синтез кДНК на матрице РНК

Библиотека кДНК - набор комплементарных копий (кДНК) всех мРНК определенного типа клеток (ткани), которые находятся в составе векторов клонирования. Чтобы получить библиотеку кДНК, выделяют матричные РНК из ткани организма, в которой происходит экспрессия целевого гена, то есть синтезируется интересующий белок. На базе выделенных мРНК синтезируют кДНК, которые встраивают в плазмидные векторы. Получается набор одинаковых векторов с уникальными вставками. Эти векторы захватываются клетками-реципиентами – обычно используют кишечную палочку или дрожжи. В каждой клетке оказывается вектор с уникальной вставкой. Каждая клетка делится и формирует колонию, все клетки колонии несут в себе копию вектора со вставкой. Таким образом в живых клетках происходит клонирование, то есть копирование кДНК, может происходить синтез нужного белка. Изучая такие колонии, исследователь ищет нужный ген организма.

Преимущества поиска и идентификации гена с помощью синтеза на основе мРНК: в составе вектора оказываются только кодирующие последовательности без «мусорной» ДНК; в составе вектора оказывается целый ген; кДНК отличается от соответствующего участка ДНК отсутствием интронов (рис. 53).

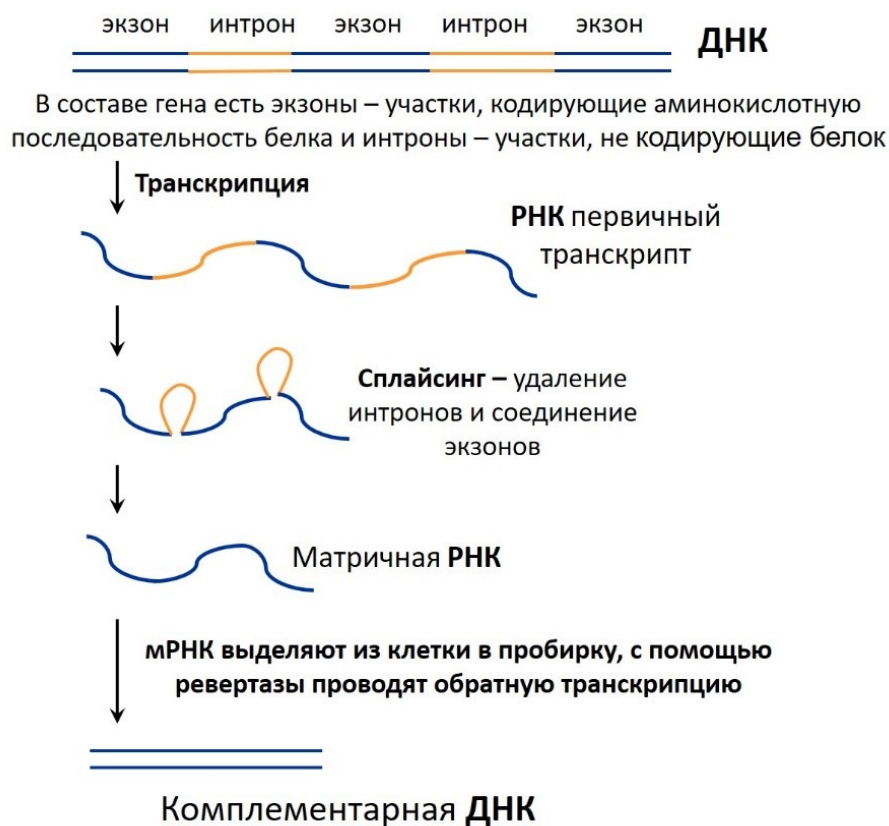


Рис. 53. Получение кДНК

Отсутствие ядерных интронов особенно важно, если планируется синтез белка человека или животного генетически модифицированными бактериями, так как прокариоты не имеют сплайсосом для проведения сплайсинга.

8.3. Клонирование гена

Чаще всего клонирование, то есть копирование гена происходит в составе плазмидного вектора в клетках бактерий (обычно кишечной палочки). Чтобы происходило клонирование плазмиды, она должна содержать особую короткую последовательность нуклеотидов - точку начала репликации (обозначается *ori*, то есть *origin of replication*). С этой последовательности начинается репликация, так как с ней связывается соответствующий комплекс ферментов. Последовательность нуклеотидов точки начала репликации отличается у разных видов. Например, для кишечной палочки это будет одна последовательность, а для дрожжей – другая. Кроме того, последовательность нуклеотидов точки начала

репликации определяет копийность плазмиды, то есть сколько копий этой плазмиды будет сделано в одной клетке. Например, для кишечной палочки известны низкокопийные и высококопийные последовательности *ori*. Если плазида имеет низкокопийную *ori*, в клетке накопится 1...20 копий такой плазмиды, а если высококопийную – до 1000.

Один плазмидный вектор может иметь несколько *ori* для репликации в клетках разных организмов, такой вектор называют **челночным**. Такие векторы используют в случае, если клонирование гена происходит в клетках одного организма (чаще всего кишечной палочке), а синтез продукта – в клетках другого организма.

Помимо векторов на основе плазмид существуют и другие типы векторов. **Основные типы векторов:** плазмидные, вирусные и фаговые, искусственные хромосомы для клонирования больших фрагментов ДНК, фагмиды - гибриды фагов с плазмидами.

8.4. Генетическая трансформация и получение трансгенных растений

Трансгенные растения – это растения, содержащие в геноме дополнительный интегрированный чужеродный (гетерологичный) ген, как правило, экспрессирующийся и переданный из неродственного организма. Процесс интеграции и экспрессии гетерологичного гена называется **генетической трансформацией (трансгенезом)**. Совместное использование технологии рекомбинантных ДНК, методов передачи генов и техники культуры ткани привели к получению генетически модифицированных растений большого числа культурных видов. Трансгенез возник как новый инструмент для проведения **селекции «одного гена»** или **трансгенной селекции** растений. В отличие от традиционной селекции в данном случае только клонированный ген(ы), представляющий хозяйственную ценность, интродуцируют в геном растения без внесения других нежелательных генов.

Посредством **генетической трансформации** любой целевой ген может быть перенесен в геном растения для получения желаемого продукта. Однако анализ структуры и характера действия генов на молекулярном уровне показывают, что передаваемый ген состоит не только из кодирующего участка, определяющего последовательность аминокислот в белковом продукте, но включает также и другие последовательности в ДНК, которые определяют место, время и уровень его экспрессии в растении. Данная информация содержится в **промоторной** части гена, определяющей специфические ткани и стадию развития растения для экспрессии гена. Промоторы некоторых генов нерастительного происхождения (например, бактериальных, вирусных) могут быть активны в клетках растений, но с

экологической точки зрения для экспрессии гетерологичных генов в растениях целесообразно использовать промоторы генов растений. Поиск и клонирование новых эффективных растительных промоторов для координированной экспрессии гетерологичных генов является одним из ключевых моментов трансгенной технологии. В настоящее время доступны разнообразные промоторы, некоторые из которых приводят, в том числе, к увеличению экспрессии трансгенов.

После генетической трансформации необходимо выделение трансгенных клеток из пула генетически немодифицированных клеток, а затем анализ регенерировавших растений на наличие вставки трансгена. Для эффективного отбора, скрининга и идентификации трансгенных растений разработана система **маркерных (селективных и репортерных) генов**. Как правило, селективные гены придают генетически трансформированным клеткам растений устойчивость к селективным агентам (антибиотикам, гербицидам) и позволяют им активно расти, делиться и регенерировать побеги на питательных средах. Репортерные гены кодируют белки, которые обладают либо уникальными свойствами, либо уникальными ферментативными активностями, за счет которых они легко могут быть идентифицированы в совокупности внутри- и внеклеточных белков растений. Репортерные гены, используемые для поиска и изучения новых промоторов, называются транскрипционными репортерами. Репортерные гены, предназначенные для изучения биосинтеза белковых продуктов целевых генов, называют трансляционными репортерами. Таким образом, генетическая трансформация — это внедрение не просто структурного гена, а целого пакета (кассеты) ДНК последовательностей, называемого **генетической конструкцией**, как правило, кодирующей целевой и селективный ген под контролем соответствующих промоторов.

В настоящее время генетическая трансформация дает возможность создавать новые генотипы растений с желаемым уровнем урожайности, качества, устойчивости, адаптивности и т.д. Трансгенные растения даже могут быть использованы в качестве биореакторов, «фабрик» производства особых химических веществ и лекарственных соединений. Однако, несмотря на все преимущества, которые дает технология рекомбинантных ДНК, в России и в большинстве стран мира использование трансгенных растений ограничено уровнем лабораторных исследований и не имеет практического применения, поскольку возделывание генетически модифицированных растений не в научных целях не разрешено законом.

8.5. Методы генетической трансформации

Методы генетической трансформации расширили имеющийся генофонд, поскольку новые целевые гены могут быть интегрированы в геном растения от неродственных видов растений, вирусов, бактерий, грибов, насекомых, животных, человека и даже химически синтезированные в лаборатории. Существенными требованиями для генетической трансформации растений являются наличие подходящей генетической конструкции, ее перенос в клетки растения, интеграция в геном и экспрессия трансгена и, наконец, изучение, и описание трансгенных растений (рис. 54).

Кроме этого, в настоящее время получил распространение метод трансформации растений путем погружения соцветий в суспензию агробактерий (*floral dip*) с последующим отбором проростков на селективных средах.

Различают два типа методов переноса чужеродного гена в растение: прямой и непрямой (через промежуточного хозяина). В случае с непрямым методом переноса генетическая конструкция встраивается в промежуточного хозяина, который и переносит её в целевые клетки растений для встраивания. Системы переноса могут быть на основе бактерий *Agrobacterium tumefaciens* или *Agrobacterium rhizogenes*, вирусов растений.

В методах прямого переноса генетическая конструкция доставляется в целевые клетки путем физико-химического поглощения ДНК клеткой (с использованием полиэтиленгликоля (ПЭГ), липосомной инкапсуляции, электропорации) или микроинъекцией, бомбардировкой микрочастицами (биобаллистика).

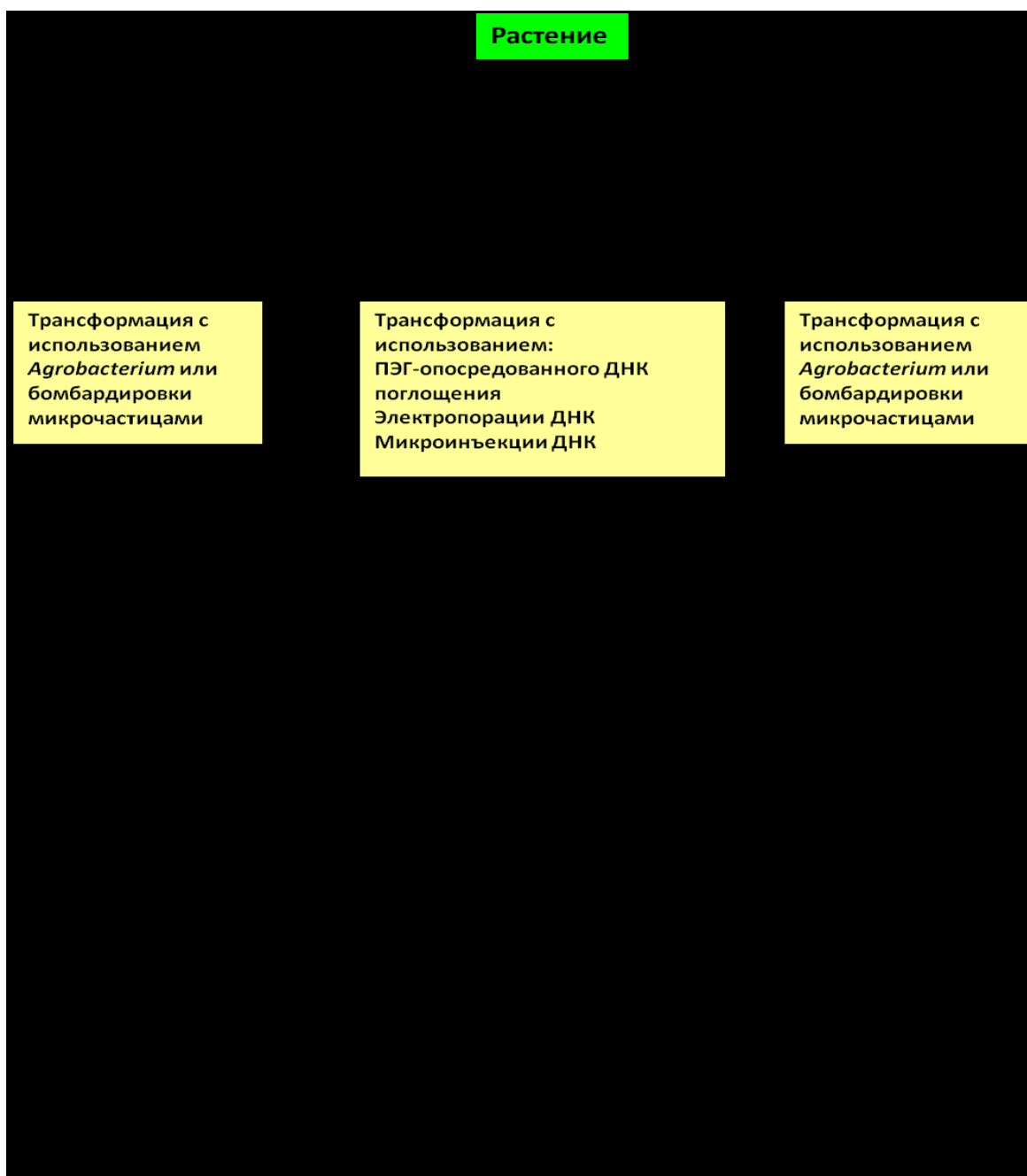


Рис. 54. Общая схема генетической трансформации и создания трансгенных растений

8.6. Система непрямо́й генетической трансформации

Как правило, эксплантами при непрямо́й генетической трансформации являются: протопласты, клеточные культуры, каллусы, срезы ткани или даже части целого органа растения (например, листа, стебля и т.д.). Непрямо́ую генетическую трансформацию осуществляют с помощью бактерий *Agrobacterium* либо вирусных векторов.

8.6.1. Агробактериальная трансформации

Agrobacterium - грамотрицательные почвенные бактерии, представленные двумя основными видами *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes*, известные как «природные генетические инженеры», благодаря своей способности генетически трансформировать растения. В природной среде *A. tumefaciens* является почвенным патогеном и вызывает у растений образование опухолей (корончатых галлов). Гены бактерий, ответственные за распознавание клеток восприимчивого растения-хозяина и обеспечивающие прикрепление к ним, находятся в бактериальных хромосомах. Однако, способность бактерии передавать ДНК, встраиваемую в геном растения, т.е. трансформировать, а также гены устойчивости к антибиотикам и патогенности кодируются плазмидной ДНК. Плазида — это кольцевая молекула ДНК независимая от бактериальной хромосомы, обладающая способностью автономного самовоспроизведения (репликации) (рис. 50).

Плазмиды бактерии *A. tumefaciens* дикого типа индуцируют образование опухолей и поэтому названы опухоль индуцирующими (tumor inducing - Ti) плазмидами. Ti-плазмиды имеют два основных участка необходимых для трансформации – T-ДНК и vir-область. T-ДНК — это часть плазмиды, передаваемая в растительные клетки и встраиваемая в ядерный геном клеток поврежденной ткани растения. T-ДНК из плазмид дикого типа содержит гены, индуцирующие образование галлов посредством регулирования фитогормонов. Синтез фитогормонов в области инфекции приводит к быстрому разрастанию поврежденных клеток и превращению их в галл (опухоль), служащим убежищем для бактерий. Перенос T-ДНК обеспечивается генами другого участка Ti-плазмиды называемыми vir-генами (генами вирулентности) (рис. 55А).

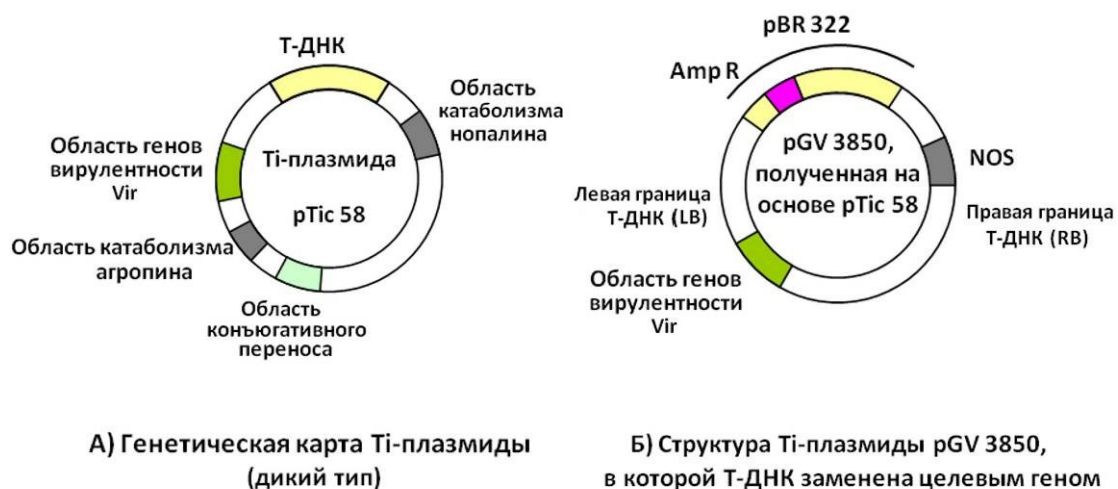


Рис. 55. Структура Ti-плазмиды

Таким образом, после инфекции растения бактериями одноцепочечная Т-ДНК переносится в клетки растения, которые впоследствии экспрессируют плазмидные гены, приводящие к образованию галлов, т.е. симптомов болезни (рис. 56).

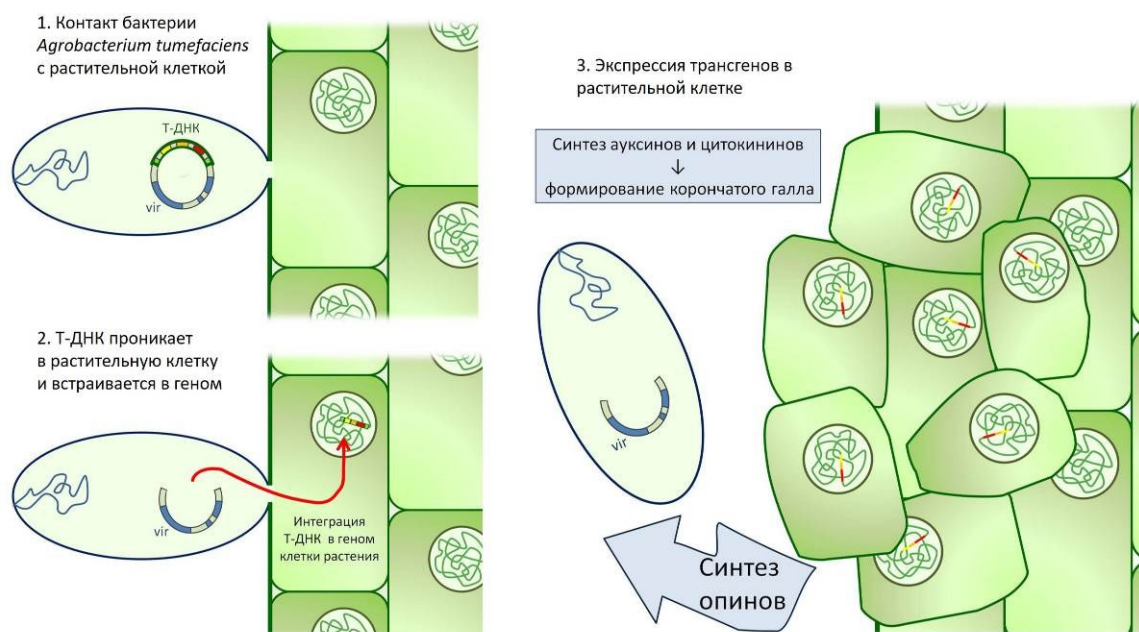


Рис. 56. *Agrobacterium tumefaciens* осуществляет генетическую трансформацию растительной клетки

Если из Т-ДНК плазмиды удалить индуцирующие болезнь гены, т.е. «обезоружить» плазмиду, то бактерия не вызывает проявления симптомов. С другой стороны, если поместить другой ген в участок Т-ДНК, то он будет перенесен в растение. В составе плазмиды Т-ДНК ограничена двумя несовершенными повторами, соответственно, LB (left border) и RB (right border).

Модифицированные Ti-плазмиды создаются таким образом, что они в пределах участка Т-ДНК не имеют нежелательных образующих опухоль генов, но содержат чужеродный ген (трансген), например, ген устойчивости к болезни и тесно сцепленный с ним селективный ген, например, ген устойчивости к антибиотику AmpR (рис. 55Б, рис. 57). В данном случае любая желаемая последовательность ДНК, например, ген, могут быть перенесены в растение посредством плазмиды, что является основой генетической трансформации с использованием *Agrobacterium*. Эти свойства переноса ДНК агробактерией являются бесценными для разработки векторной системы трансформации. Любой ген, вставленный в участок Т-ДНК плазмиды переносится в растительный геном как дискретная единица, поскольку окружающие его участки и гены вирулентности вне RB и LB не передаются).

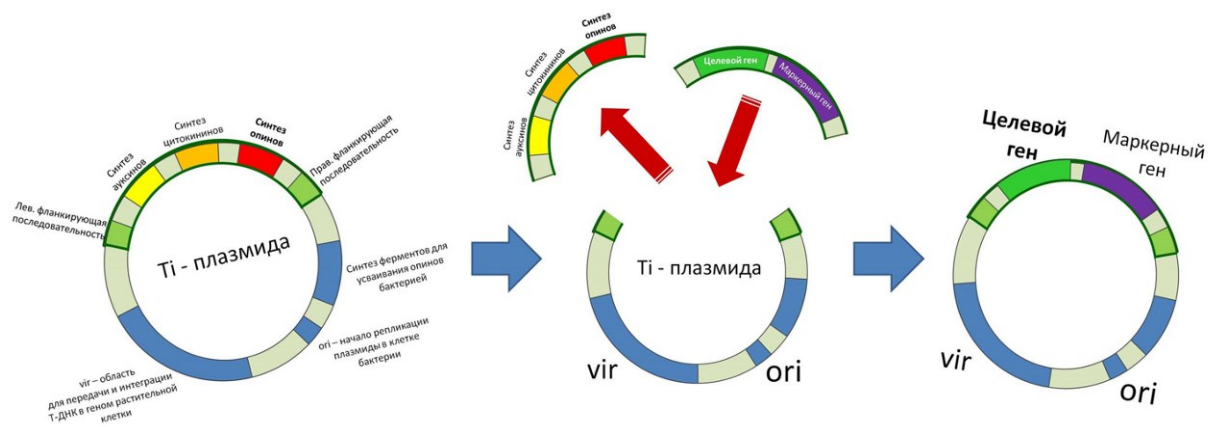


Рис. 57. Примерная схема создания вектора на основе Ti-плазмиды

Существует два основных типа плазмидных векторов для *Agrobacterium*: коинтегративные и бинарные.

Коинтегративные векторы содержат все необходимые для генетической трансформации области, но слишком велики для манипулирования *in vitro*, поэтому гетерологичные гены вводят в них гомологичной или сайт-специфической рекомбинацией из промежуточных векторов, с которыми можно работать доступными молекулярно-биологическими методами. Передаваемый ген обычно клонируют сначала в *E. coli* в промежуточном векторе, который затем полностью интегрируют в область T-ДНК «обезоруженной» Ti-плазмиды.

В случае с **бинарным вектором** для трансформации используют пару векторов. Один из векторов, называемый мини-Ti, содержит «обезоруженную» T-ДНК, но не имеет *vir*-генов. Другой вектор пары, называемый помощником, содержит *vir*-область, но не имеет T-ДНК. Мини-Ti способен к репликации, как в *E. coli*, так и в *A. tumefaciens*. Трансген интегрируют в T-ДНК мини-Ti с последующим клонированием в *E. coli*. Затем рекомбинантную мини-Ti передают в клетки *A. tumefaciens*, содержащие Ti-вектор-помощник. Благодаря действию *vir*-генов вектора-помощника, T-ДНК с целевым трансгеном успешно переносится в клетки трансформируемого растения.

Перенос генов посредством *Agrobacterium* достигается или кокультивированием бактерий с клетками растения, или нанесением их на поврежденные органы растения.

Метод трансформации. Части проростков такие, как семядоли, гипокотиль, корни, листья, а также каллусы или протопласты могут быть использованы для кокультивации с агробактерией, содержащей рекомбинантные плазмиды. Наибольшее распространение получил метод листовых эксплантов, при котором асептические части листа инфицируют

соответствующим штаммом *Agrobacterium*, несущим выбранный вектор, и кокультивируют на питательной среде для регенерации растений без добавления селективных агентов, в том числе антибактериальных, в течение 2-3 дней. За это время экспрессия генов вирулентности бактерии индуцирует их прикрепление к растительным клеткам вокруг поврежденной области и обеспечивает перенос Т-ДНК из клеток бактерий в клетки растений. Затем листовые экспланты переносят на среду для регенерации растений дополненную антибиотиком, угнетающим *Agrobacterium*, и соответствующим селективным агентом (антибиотиком, гербицидом) для ингибирования роста нетрансформированных растительных клеток. В течение следующих 4-5 недель формируются трансформированные каллусы, а затем и побеги, которые укореняют с использованием тех же и селективных агентов, затем переносят в субстрат (почву). Трансгенные растения, регенерировавшие из разных тканей, называют растениями T₀ или первичными трансформантами, а их последующие поколения как T₁, T₂, T₃ и т.д.

***Agrobacterium* и растения-хозяева.** Агробактериальная трансформация является основным методом трансформации двудольных растений (van Wordagen and Dons, 1992; Dale et al. 1993). Среди растений-хозяев *Agrobacterium* 60% голосеменных и двудольных покрытосеменных. У однодольных растений природная агробактериальная трансформация затруднена, вследствие невозможности заражения однодольных бактерией, что обусловлено отсутствием соответствующих рецепторов у растений, необходимых для взаимодействия с бактериями. Однако, в настоящее время при соблюдении определенных условий агробактериальная трансформация произведена у некоторых однодольных, например, у спаржи, хлорофитума, нарцисса, риса, ячменя, пшеницы, кукурузы и сахарного тростника (Hernalsteens et al. 1984; Hooykaasvan Slogteren et al. 1984; Hiei et al. 1994). Несмотря на то, что в последние годы достигнуты определенные успехи в трансформации однодольных агробактериальными векторами, все же подобный путь трансформации встречает существенные затруднения и для трансформации устойчивых к агробактериям однодольных растений применяют методы прямого физического переноса ДНК.

8.6.2. Вирусные векторы

Принимая во внимание способность вирусов вызывать системные инфекции, они были изучены как векторы для генетической трансформации растений. Генетическая инженерия геномов ДНК и РНК вирусов позволила внедрить в них последовательности чужеродной ДНК. Чужеродные гены

замещают часть вирусного генома и приводят к формированию дефективной вирусной частицы, способной инфицировать растение только в присутствии вспомогательного вируса. Наиболее обещающие вирусы принадлежат к двум группам ДНК вирусов, а именно каулимовирусы, к которым относится вирус мозаики цветной капусты (Cauliflower Mosaic Virus, CaMV), и геминивирuсы (geminivirus). Однако вирусные векторы не разработаны настолько, чтобы их можно было использовать в рутинной трансформации растений.

8.7. Методы прямого переноса генов

Проблемы, связанные с видовой специфичностью и неспособностью доставки агробактерией нескольких генов, послужили основанием для разработки метода прямого переноса генов без привлечения биологических агентов, таких как бактерии и вирусы. В данном случае ДНК, внедряемая в целевые клетки, доставляется или посредством прямого поглощения клетками, или посредством определенных физических и химических процессов: физико-химическое поглощение ДНК клеткой, липосомная инкапсуляция (липофекция), электропорация, микроинъекция, бомбардировка микрочастицами (биобаллистика).

Физико-химическое поглощение ДНК основано на способности протопластов поглощать чужеродную ДНК из окружающего раствора. Изолированные плазмидные ДНК (векторы) смешивают с протопластами в присутствии полиэтиленгликоля (ПЭГ), поливинилового спирта и фосфата или хлорида кальция, ускоряющими поглощение ДНК. Через 5-20 минут инкубации протопласты переносят на соответствующие питательные среды с селективными агентами для клеток растений. Из протопластов регенерируют трансгенные растения и подтверждают наличие вставки (Paszkowski et al. 1984). Данный метод зависит от способности растения регенерироваться из протопласта, и был успешно использован для получения трансгенных растений капусты, земляники, салата, риса, пшеницы, картофеля и кукурузы.

Метод **липосомной инкапсуляции** был разработан для защиты чужеродной ДНК при переносе в целевые клетки (Deshayes et al. 1985). Липосомы – это маленькие искусственно создаваемые липидные капсулы, вмещающие огромное количество плазмид. ДНК, упакованная в липидные везикулы, смешивается с протопластами в соответствующих условиях, проникает в протопласт, где липаза растворяет липидную оболочку и высвобождает ДНК для интеграции в геном растения. Этот метод не получил широкого распространения, так как достаточно сложно получать липидные везикулы, кроме того, успех также зависит от регенерационной способности из протопластов.

Электропорация основана на создании микропор в мембране протопласта посредством импульсов электрического поля напряженностью от нескольких сотен до нескольких тысяч вольт на см и длительностью от десятков микросекунд до десятков миллисекунд. Обратимое нарушение целостности мембраны позволяет проникать чужеродной ДНК в цитоплазму. Протопласты суспендируют в солевом буферном растворе, содержащем плазмидную ДНК, в кювете с двумя платиновыми электродами, через которые импульсно пропускают электрический ток. Затем протопласты культивируют, и регенерируют из них растения (Fromm et al. 1985). Электропорация была успешно применена для получения трансгенных растений табака, кукурузы и риса (Joersbo and Brunstedt, 1991).

Микроинъекция ДНК широко используется для трансформации животных клеток, но для трансформации растительных клеток он не очень успешен. Причина в основном из-за сложностей с фиксацией протопласта и инъекции ДНК без повреждения тонопласта окружающего вакуоль. Повреждение тонопласта приводит к высвобождению разного рода токсичных субстанций из вакуоли в цитоплазму. Crossway et al. (1986) разработал технику «удерживающей пипетки» для микроинъекции, лишенную некоторых из этих проблем. Протопласты удерживаются 5-10 мкм пипеткой путем легкого всасывания. Чужеродная ДНК (около 2 пиколитров) инъецируется в ядро протопласта с помощью 0,2 мкм в диаметре инъекционной пипетки. После микроинъекции протопласты культивируют для получения целого растения. Процесс микроинъекции требует больших затрат времени и технически сложна в исполнении, однако эта техника позволяет внедрять разнообразный генетический материал, такой как отдельная хромосома или даже хлоропласт и митохондрия. Этим методом успешно получены трансгенные растения табака, люцерны и рода *Brassica*.

Бомбардировка микрочастицами (биобаллистика) подразумевает ускорение ДНК по направлению к клеткам с силой, достаточной для проникновения в ядро. Для трансформации используются мельчайшие 0,2-0,7 мкм частички золота или вольфрама (микроносители) покрытые чужеродной ДНК. Существует несколько способов придания ускорения микрочастицам с ДНК, одним из которых является использование сжатого газа гелия. Данный метод широко используется благодаря возможности доставлять чужеродную ДНК в способные к регенерации клетки, ткани или органы независимо от принадлежности растений к классу одно- или двудольных. Так как процесс имеет физическую природу, нет никаких биологических ограничений по доставке ДНК, что делает его генотипнезависимым. Биобаллистику используют для трансформации апикальной меристемы

побегов, листовых пластинок, пыльцы, культивируемых клеток, корневой и побеговой частей. Трансгенные растения были получены у нескольких важных культур, включая ячмень, хлопок, кукурузу, рис, сою, сахарный тростник, подсолнечник и пшеницу при использовании более отзывчивых к регенерации тканей/органов, такие как эмбриогенный каллус, незрелые зародыши и побеговые меристемы (Christou et al. 1994).

8.8. Временная (транзиентная) и стабильная экспрессия рекомбинантного гена

После успешной интродукции чужеродного гена он не всегда встраивается в геном реципиентных клеток, но временно экспрессируется. Его активность со временем снижается и, в конце концов, пропадает, что является нежелательным в производстве трансгенных растений. Однако, анализ репортерных генов через 24-48 часов после доставки ДНК позволяет провести быструю предварительную оценку протокола трансформации и выявить эффективность используемых плазмидных конструкций. Кроме того, показано, что подобные тесты являются наиболее эффективными при получении основной информации в отношении генетической регуляции и функции. Временная экспрессия генов, выполненная путем заражения растений вирусами, агробактериальной инфильтрацией листьев, агробактериальной трансформацией или бомбардировкой микрочастицами каллусов и т.д. является относительно быстрым и эффективным способом для тестирования новых генетических конструкций. Когда вводимый ген стабильно интегрируется в реципиентный геном, наследуется в поколениях, его последующая экспрессия называется **стабильной экспрессией гена**.

8.9. Генетические маркеры (селективные и репортерные гены) в трансформации

В процессе генетической трансформации чужеродная ДНК доставляется в часть используемых в эксперименте клеток, стабильно интегрируется в ядерный геном только определенной доли клеток, и наконец, внедренный ген(ы) экспрессируется лишь в некоторых клетках. Отбор трансформированных протопластов/клеток из огромной массы остальных нетрансформированных является критическим шагом, влияющим на конечный результат.

Трансформированные клетки или растения идентифицируют по маркерным генам, тесно связанным с целевым геном. Существует два типа таких маркеров – репортерные и селективные (табл. 4).

Таблица 4. Наиболее часто используемые в генетической трансформации репортерные и селективные маркеры

Тип маркера	Ген	Фермент или белок	Селективный агент
Репортерные	<i>gus</i>	β -глюкуронидаза	-
	<i>lux</i>	Люцифераза (бактериальная)	-
	<i>nos</i>	Нопалинсинтаза	-
	<i>cat</i>	Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза	-
	<i>luc</i>	Люцифераза (светлячка)	-
	<i>licBM3</i>	Термостабильная лишеназа	-
	<i>gfp</i>	Зеленый флуоресцентный белок (Green fluorescent protein, GFP)	-
Селективные	<i>nptII</i>	Неомицинфосфотрансфераза II	Канамицин
	<i>bar</i>	Фосфинотрицин-ацетилтрансфераза	Фосфинотрицин
	<i>dhfr</i>	Дигидрофолатредуктаза	Метотрексат
	<i>epsps</i>	5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтаза	Глифосат
	<i>cat</i>	Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза	Хлорамфеникол
	<i>aad A</i>	Аденилилтрансфераза	Спектиномицин, стрептомицин
	<i>ahas</i>	Ацетолактатсинтаза	Сульфонилмочевина
	<i>hps</i>	Гигромицинфосфотрансфераза	Гигромицин

Репортерные маркеры - это, как правило, гены специфических ферментов, экспрессия которых приводит к проявлению четко выявляемых фенотипических особенностей. Наиболее часто используемыми репортерными генами, производящие ферменты, являются *nos*, *lux*, *cat*, *gus* и

licBM3 (табл. 4). Никакого селективного давления на клетки или регенерировавшие побеги не оказывается, проводят только обследование на предмет экспрессии репортерного гена. Например, GFP - уникальный белок, способный испускать зеленый свет (509 нм) при его освещении ультрафиолетом или синим светом (395, 475 нм) [Chalfie et al., 1994]. Существуют различные разновидности GFP или его аналоги с различными спектрами поглощения и испускания света. Ген *gus* кодирует фермент, который, гидролизует субстрат, в результате чего продукты гидролиза образуют хорошо заметный невооруженным глазом голубой осадок.

Селективные маркеры – это гены, определяющие устойчивость к различным селективным агентам, таким как гербициды и антибиотики, токсичным для обычных клеток растения. На селективной среде выживают только клетки, имеющие эти гены. Селективные гены, как правило, кодируют ферменты, инактивирующие негативное влияние селективных агентов путем их разрушения или химической модификации.

Таким образом, селективные маркеры позволяют беспрепятственно размножаться трансгенным клеткам на среде, угнетающей нетрансформированные, тогда как репортерные маркеры позволяют дифференцировать клетки без добавления в среду ядовитых компонентов. Трансгенные клетки могут также быть идентифицированы, когда трансген проявляется напрямую, т.е. ген можно обнаружить по его проявлению, например, по устойчивости к гербициду. Все нетрансформированные клетки погибают под действием гербицида, а выживают только трансформированные.

8.10. Создание трансгенных растений, не содержащих маркерных генов

Один из экспериментальных подходов к получению безмаркерных трансгенных растений включает котрансформацию растений двумя разными ДНК, одна из которых несет маркерный (селективный) ген, а другая - интересующий исследователя целевой ген. В этом случае от 30 до 80% растений содержат оба гена, которые, однако, интегрированы в разные сайты хромосомной ДНК, т.е. могут быть в разных хромосомах. После отбора трансформантов маркерный ген можно удалить из трансгенного растения с помощью обычного скрещивания и отбора растений в расщепляющейся популяции.

В рамках другого подхода селективный маркерный ген встраивают между растительными мобильными элементами (Ds-элементами) и такую конструкцию вводят в Т-ДНК вместе с геном транспозазы, которая вырезает участок ДНК между Ds-элементами и перемещает его в другой хромосомный

сайт. В процессе встраивания T-ДНК в ДНК растения-хозяина в 90% случаев селективный маркер, находящийся между двумя Ds-элементами, оказывается в другом сайте хромосомной ДНК, при этом с вероятностью 50% этот сайт находится далеко от исходного. Таким образом, селективный маркерный ген может использоваться для идентификации трансформированных растений, а затем удаляться при скрещивании.

8.11. Подтверждение генетической трансформации

Подтверждение трансгенной природы полученного растения проводят несколькими способами в зависимости от использованного вектора: анализ фенотипа; биохимический анализ; молекулярно-биологический анализ; анализ потомства трансформантов.

Анализ фенотипа трансформантов. Наиболее легкой и понятной индикацией эффективности трансформации является проявление ожидаемого фенотипического признака у трансгенного организма. Растение генетически трансформировано, если оно растет в присутствии повышенного содержания селективных соединений, включая антибиотики и гербициды. В этом случае предполагают, что трансформант содержит в геноме селективные гены. Также фенотип трансгенных растений может быть легко идентифицирован по флуоресценции продукта репортерного гена *gfp* или его аналогов.

Биохимический анализ трансформантов. Ферментативный тест репортерных генетических маркеров (*nos*, *cat*, *gus*, *licBM3* и др.) проводится для проверки экспрессии чужеродной ДНК в трансформированных тканях. Разные гены имеют отличающийся уровень экспрессии в зависимости от ткани, поэтому ферментативный анализ проводят с использованием быстро развивающихся тканей.

Молекулярно-биологический анализ может быть проведен следующими методами: анализ ДНК с использованием полимеразной цепной реакции; анализ Саузерн-блот гибридизации ДНК; анализ Нозерн-блот гибридизации РНК; анализ РНК методом обратной транскрипции; анализ Вестерн-блот гибридизации белков.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет амплифицировать последовательности ДНК, определяемые синтетическими праймерами. Набор праймеров (прямой и обратный) специфичный для каждого трансгена используется для амплификации тотальной ДНК, выделенной из предполагаемой трансгенной ткани/растения. Продукт ПЦР показывает наличие или отсутствие только амплифицируемой части трансгена. Вследствие контаминации ДНК он может показать ошибочный положительный (ложноположительный) результат. Поэтому анализ ПЦР

служит методом предварительной оценки и не может гарантировать 100%-ю достоверность. Кроме того, данный метод не дает никакой информации о количестве копий трансгена, сайте интеграции, целостности передаваемой конструкции и уровне экспрессии трансгена.

Блот-гибридизация по Саузерну – способ переноса ДНК трансформантов из агарозного геля на мембрану с последующей её гибридизацией с радиоактивно или нерадиоактивно меченым зондом. В качестве зондов используют комплементарные молекулы ДНК, по сути, меченные праймеры. Это очень чувствительная методика, используемая для обнаружения трансгена в геномной ДНК без какой-либо амплификации. Саузерн блот-гибридизация подтверждает: 1) стабильность интеграции трансгена в геном, 2) количестве копий трансгена в геноме, и 3) количестве сайтов интеграции. Однако не позволяет узнать об экспрессии трансгена.

Нозерн-блот гибридизации - метод исследования экспрессии генов путём тестирования молекул РНК (мРНК) и их фрагментов в образцах. Основным отличием метода от Саузерн-блот гибридизации является то, что определяемым субстратом является не ДНК, а РНК. Это обуславливает различия в методике: при переносе вместо нитроцеллюлозной используется мембрана из диазобензилоксиметилцеллюлозы, в качестве зондов используют комплементарные молекулы ДНК.

Метод обратной транскрипции основан на том, что одноцепочечную молекулу РНК превращают в реакции обратной транскрипции (с использованием фермента ревертазы) в комплементарную ДНК (кДНК) и далее амплифицируют уже одноцепочечную молекулу ДНК, используя традиционную ПЦР.

Вестерн-блот гибридизация включает детекцию белковых продуктов, производимых трансгеном в модифицированном растении, и уровней их биосинтеза. Уровень биосинтеза устанавливают подсчетом количества белка, произведенного трансгеном и установлением его доли в общей массе растворимых белков.

Анализ потомства трансформантов. Наследование внедренного гена определяется анализом потомства полученного в результате самоопыления или беккрасса. Для этого используют уже упомянутые подходы.

8.12. Снижение или прекращение (замолкание) экспрессии гена в трансгенных растениях

Интегрированные в геном трансгены обычно имеют менделевский (моногенный) характер наследования, однако в результате влияния многих факторов нововведенные посредством трансгенеза признаки могут

утрачиваться. Утрата экспрессии трансгена не обязательно означает его потери (из генома), но может являться результатом его инактивации. Основные причины инактивации экспрессии трансгена: метилирование последовательности ДНК, внешние факторы, косупрессия вызванная интродукцией большого числа копий чужеродного гена и т.д. Замолкание гена, т.е. супрессия его экспрессии, может происходить на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. **Транскрипционный сайленсинг** (от англ. «gene silencing») обычно происходит вследствие метилирования промоторного участка. Встраивание множественных копий трансгена приводит к гиперметилированию. Интеграция трансгена часто также происходит в высоко метилированные участки хромосомы, что приводит к пониженной или нестабильной его экспрессии. Вирусные промоторы, использованные для контроля экспрессии трансгена, могут снижать свою эффективность при заражении трансгенных растений вирусом. **Посттранскрипционные** механизмы сайленсинга затрагивают кодирующие участки гена, но не влияют напрямую на транскрипцию. Основной мишенью на этом этапе становится мРНК трансгена, которая в клетках растений подвергается деградации.

Устойчивая экспрессия оптимального уровня может быть достигнута посредством селекционной работы, то есть созданием новых популяций в результате скрещивания различных трансгенных линий и отбором линий с повышенной и стабильной экспрессией.

8.13. Создание культурных растений с хозяйственно полезными признаками

Заметные достижения получены в производстве, описании и полевом испытании трансгенных растений полевых, овощных, плодовых и лесных культур. Основной интерес заключается в введении клонированного гена(ов) в коммерческие сорта для их совершенствования. Использование различных методов переноса генов привело к созданию трансгенных растений с улучшенными агрономическими признаками (Shah et al. 1995; Hansen and Wright, 1999).

Например, данные по площадям занятым под трансгенными растениями показывают, что более 90% занимают три культуры, а именно соя, кукуруза и хлопок.

В основном все достижения трансгенеза включают создание растений устойчивых к насекомым, гербицидоустойчивых и устойчивых к болезням. Менее популярные, но также имеющие место и развивающиеся направления использования технологии рекомбинантных ДНК: получение растений,

противостоящих неблагоприятным воздействиям и старению, изменение окраски цветков, изменение пищевой ценности, изменение вкуса и внешнего вида плодов.

8.13.1. Создание культурных растений, устойчивых к насекомым

Наибольшее внимание в генной инженерии получило создание растений, устойчивых к насекомым и гербицидам. Создан и оценен в полевых условиях ряд трансгенных сортов томата, картофеля, хлопка и кукурузы, устойчивые к насекомым. Разработано два основных подхода в получении устойчивых к насекомым трансгенных растений: интеграция бактериальных генов *bt* и интеграция растительных генов, кодирующих белки с инсектицидной активностью.

Бактерия *Bacillus thuringiensis* синтезирует инсектицидный белок-прототоксин (предшественник токсина), который, попадая в желудочно-кишечный тракт под действием пищеварительных протеаз, преобразуется в токсичный для насекомого полипептид и вызывает его гибель. Летальное действие токсина обуславливается образованием в мембранах клеток кишечника ионных каналов, через которые АТФ выходит из клеток. Это приводит к нарушению метаболизма, прекращению питания, дегидратации и в конечном итоге к гибели насекомых.

Токсины *B. thuringiensis* специфичны по отношению к насекомым, вызывая гибель одних, они нетоксичны для других. Например, ген *bt*, выделенный из *Bacillus thuringiensis* ssp. *kurstaki*, контролирует синтез белка токсичный для чешуекрылых. Токсины быстро разрушаются в окружающей среде, имея минимальное воздействие на нее, что также не способствует отбору устойчивых к ним насекомых. Ген *bt* широко и успешно использован при создании устойчивых к насекомым растений табака, томата, картофеля, хлопка, риса и кукурузы.

Интеграция растительных генов, кодирующих белки с инсектицидной активностью также применяют для создания растений, устойчивых к насекомым. Несколько инсектицидных белков растительного происхождения, таких как лектины, ингибиторы амилазы и ингибиторы протеаз, способны замедлять рост и развитие насекомых-вредителей при поглощении больших доз.

8.13.2. Создание культурных растений, устойчивых к гербицидам

Устойчивости к гербицидам достигают методом детоксикации либо методом целевой модификации.

Детоксикация – метод, при котором индродуцируемый ген производит фермент, который расщепляет гербицид, распыленный на растение. Трансформация растений геном *bar*, клонированным из бактерии *Streptomyces hydropiucus*, делает их устойчивыми к гербицидам, основанным на фосфинотрицине (ppt). Ген *bar* кодирует фермент фосфинотрицинацетилтрансферазу (PAT), который преобразует фосфинотрицин в его нетоксичную ацетилированную форму. Было показано, что растения, экспрессирующие трансген *bar*, способны расти на питательной среде с содержанием ppt в 4-10 раз выше, чем при нормальном полевом применении.

Подобным образом ген нитрилазы *bxn*, выделенный из почвенной бактерии *Klebsiella ozaenae*, определяет устойчивость растений к гербициду бромоксинилу. Другие гены, использованные для придания растениям устойчивости к гербицидам: *tfdA* - толерантность к 2,4-Д; *gst* - толерантность к атразину.

Целевая модификация - метод, при котором трансформацию растений проводят мутантным геном, продуцирующим модифицированный фермент, нераспознаваемый гербицидом в качестве мишени. Так, мутантный ген *aroA* из бактерии *Salmonella typhimurium* был использован для создания растений толерантных к гербициду глифосфату. Глифосфат ингибирует хлоропластный фермент 5-енолпирувилшикимат-3-фосфатсинтазу (EPSPS), который играет важную роль в синтезе ароматических аминокислот. Трансформация мутантным геном *aroA* приводит к синтезу модифицированного EPSPS, нераспознаваемого глифосфатом в качестве субстрата.

Подобным образом за счет встраивания мутантного гена *ALS* (ацетолататсинтетазы) была достигнута толерантность растений к гербицидам сульфониуреазу и имидазолинону, ингибирующим нативный хлоропластный белок.

8.13.3. Создание культурных растений, устойчивых к болезням

С помощью генетической трансформации получены растения, устойчивые к вирусным, грибным и бактериальным заболеваниям.

Устойчивость к вирусным заболеваниям. Существует несколько подходов в создании устойчивых к вирусам растений посредством генетической инженерии: трансформация геном белка оболочки вируса, трансформация кДНК сателлитной РНК вируса, трансформация антисмысловой РНК вируса.

Из всех перечисленных выше методов наиболее успешным является **трансформация геном белка оболочки вируса**. К сожалению, молекулярный механизм обеспечения устойчивости до конца пока не изучен, но вероятнее всего, устойчивость предопределяется блокированием распаковки вирусных частиц и соответственно предотвращением их репликации. Однако не исключены другие механизмы обеспечения устойчивости, одним из которых является предотвращение или сдерживание системного распространения вируса.

Экспрессия гена белка оболочки обеспечивает высокую защиту растений против вируса, из которого был получен ген, и в некоторой степени к родственным вирусам. При этом эффективность гена белка оболочки зависит, как от количества белка оболочки, продуцируемого в трансгенных растениях, так и от концентрации вирусного инокулюма.

Данным способом была повышена устойчивость к вирусам у табака, томата, люцерны, сахарной свеклы, картофеля и т.д.

Трансформация кДНК сателлитной РНК вируса связана с тем, что некоторые вирусные РНК имеют малые РНК-молекулы называемые сателлитными РНК. Они имеют невысокую гомологию с вирусной РНК или вообще не имеют, но реплицируются вирусными полимеразами и влияют на агрессивность патогена. Присутствие сателлитной РНК приводит к снижению проявления симптомов вирусного заболевания. Данное свойство было использовано для создания устойчивости. Так было показано, что трансформация растений огурца кДНК сателлитной РНК вируса огуречной мозаики, обеспечивает устойчивость к данному заболеванию.

Трансформация антисмысловой РНК вируса – третий способ получения устойчивых к вирусным заболеваниям растений. В настоящее время установлено, что экспрессия гена может контролироваться антисмысловой РНК - молекулой РНК, комплементарной транскрипту нормального гена (мРНК). Антисмысловая РНК образует дуплекс с мРНК и тем самым блокирует её трансляцию, уменьшает синтез белкового продукта соответствующего гена и активирует клеточные механизмы деградации двухцепочечных РНК. Лабораторные испытания трансгенных растений, полученных с использованием данного подхода, показали некоторое повышение устойчивости, однако уровень устойчивости был ниже по сравнению с устойчивостью растений, трансформированных геном белка оболочки вируса.

Устойчивость к грибным заболеваниям. Наибольшее внимание в производстве трансгенных устойчивых к заболеваниям растений получили гены, кодирующие ферменты (хитиназы, глюканазы), антимикробные

пептиды различных групп, гены вертикальной устойчивости растений (R-гены) и т.д. Продукты этих генов воздействуют на вторгающегося грибного патогена, разрушая основные структурные элементы клеточной стенки и делая его более восприимчивым к природным механизмам защиты растений, или активируют собственные клеточные механизмы защиты растений. Показано, что трансформация геном хитиназы привела к увеличению устойчивости к грибным заболеваниям у табака и риса. При этом отмечено, что совместное проявление генов хитиназы и глюканазы определяет больший уровень устойчивости растений, чем их раздельное действие.

Низкомолекулярные соединения, такие как фитоалексины обладают антимикробными свойствами и играют важную роль в защите растений от грибных и бактериальных патогенов. Экспрессия гена стилбенсинтетазы винограда в растениях табака приводит к формированию нового фитоалексина, ресвератрола, и увеличению их устойчивости к *Botrytis cinerea*.

Активные формы кислорода, включая пероксид водорода (H_2O_2), также играют важную роль в защитной реакции растений. Трансгенные растения картофеля, экспрессирующие грибковый ген оксидазы глюкозы, имеют повышенное содержание H_2O_2 и увеличенный уровень устойчивости к патогенам, как грибного, так и бактериального происхождения, и, в частности, к вертициллезному увяданию.

Устойчивость к бактериальным заболеваниям. Несмотря на множество экспериментов по генетической трансформации с целью придания растениям устойчивости к бактериальным заболеваниям, существенных результатов в этой области достичь пока не удалось. Отмечено повышение уровня устойчивости к *Erwinia carotovora* у трансгенного картофеля, трансформированного геном лизоцима бактериофага T4; у трансгенного табака к *Pseudomonas syringae* при экспрессии гена α -тионина ячменя. Однако в целом желаемого уровня полевой устойчивости не зафиксировано и остается надеяться, что клонирование генов устойчивости к бактериальным заболеваниям, таких как ген *Rps2 Arabidopsis*, гены томата *Cf9* и *Pto* и др., окажет существенный сдвиг в понимании взаимодействия растения и бактерии.

Лабораторная работа № 12. Агробактериальная трансформация растений табака

Agrobacterium - обычная почвенная бактерия, которая может вторгаться в раненные клетки растений и интегрировать свои гены в геном

растительных клеток. Ниже рассмотрена агробактериальная трансформация листовых дисков растений табака (*Nicotiana tabacum*). Система использования листовых дисков была разработана Horsch et al. (1985) и представляет собой технологический прорыв, позволяющий рутинную передачу чужеродных генов в некоторые двудольные растения семейства Solanaceae (петунии, табака, картофеля, томатов). Этот метод применим для эксплантатов из листьев, которые могут регенерировать адвентивные побеги. Однако это система имеет ограничения, поскольку немногие виды сельскохозяйственных культур могут быть регенерированы из листовых дисков, и случайная регенерация побегов может привести к соматональной вариации (Larkin & Scowcroft, 1981), что нежелательно при трансформации. К счастью, каллусные, семядольные, гипокотильные, стеблевые и семенные ткани, а также соматические эмбрионы и кончики побегов могут быть клетками-мишенями для трансформации с помощью *Agrobacterium*.

Транзиентная экспрессия генов, реализованная методом агробактериальной инфильтрации растений табака Бентхама (*Nicotiana benthamiana*), позволяет в течение небольшого промежутка времени примерно от двух до десяти дней наработать в растении целевой белок в количестве, достигающем 10-30 % от общего растворимого белка. Этот экспериментальный метод используется для быстрого анализа функциональности новых генетических конструкций и промоторов.

В данных экспериментах используется *Agrobacterium tumefaciens* штамма AGL0 или GV3101, которые содержат плазмиду pCambia1381Z с селективным геном устойчивости к антибиотику гигромицину (*hptII*) под контролем вирусного промотора CaMV35S и репортерным геном β -глюкуронидазы (*gus*) под контролем промотора гена антимикробных пептидов *pro-SmAMP2* из растения мокрицы (*Stellaria media*).

Цель работы: получить трансгенные растения *Nicotiana tabacum*, устойчивые к антибиотику гигромицину и экспрессирующие репортерный ген *gus*.

Для этого нужно:

1. Инокулировать листовые диски с помощью клеток *Agrobacterium*, содержащих генетические конструкции, и кокультивировать 48 часов на питательной среде для регенерации побегов (без селективных агентов).
2. Культивировать листовые диски 14 дней на питательной среде для регенерации побегов с добавлением селективных агентов для элиминации агробактерий и отбора трансформированных клеток растений.

3. Культивировать листовые диски 21 день на питательной среде для регенерации побегов с добавлением селективных агентов для элиминации агробактерий и отбора трансформированных клеток растений (этап повторяют 2-3 раза).

4. Через две недели после появления индивидуальных побегов отделить их и переместить на среду для укоренения с добавлением селективных агентов для элиминации агробактерий и отбора устойчивых регенерантов.

Ход работы:

1. Подготовить растительный материал для трансформации

2. Семена табака (*Nicotiana tabacum*) сорта Samsun стерилизовать путем замачивания в 70%-ом этиловом спирте в течение 3-х минут, промыть стерильной дистиллированной водой. Обработать семена гипохлоритом натрия 5% в течение 5 мин, промыть 5 раз стерильной дистиллированной водой.

3. Прорастить семена на питательной среде Мурасиге-Скуга с добавлением 10 г/л сахарозы и 10 г/л агара при температуре 25°C и 16/8 ч световом режиме при интенсивности освещения 2500 люкс.

4. Через три недели проростки табака перенести на питательную среду Мурасиге-Скуга с добавлением 15 г/л сахарозы, 1 мг/л пиридоксин-моногидрохлорида ($C_{12}H_{17}ClN_4OS \times HCl$), 1 мг/л тиамин-гидрохлорида ($C_8H_{11}NO_3 \times HCl$), 10 мг/л никотиновой кислоты ($C_6H_5NO_2$) и 10 г/л агара, культивировать при 16/8 ч световом режиме и температуре 25°C в течение месяца.

5. Для агробактериальной трансформации использовать листья средних ярусов. Для этого лист отделить от черешка и разрезать вдоль центральной жилки. Из половинок листа нарезать диски размером около 1 см², которые использовать в качестве эксплантов.

6. Подготовить агробактериальную культуру для трансформации. *Agrobacterium tumefaciens* (с соответствующим растительным экспрессионным вектором для трансформации растений) выращивать на среде LB (триптон - 10 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л; хлорид натрия – 5 г/л), дополненной антибиотиками (100 мг/л канамицина и 50 мг/л рифампицина). Клетки бактерий растят в шейкере-инкубаторе при температуре 28°C и 150 об/мин в течение суток.

7. Подготовить чашки Петри для трансформации листовых дисков табака. Суспензию агробактерий (50-100 мкл) нанести на находящуюся в чашках Петри (диаметром 100 мм) агаризованную среду Мурасиге-Скуга с добавлением 30 г/л сахарозы, 1 мг/л пиридоксин-моногидрохлорида, 1 мг/л тиамин-гидрохлорида, 10 мг/л никотиновой кислоты, 0,1 мг/л НУК, 1 мг/л

БАП и 10 г/л агара и равномерно распределить шпателем по всей поверхности чашки.

8. На поверхность среды, содержащей агробактерию, поместить листовые диски нижней стороной к агару. Кокультивацию с агробактерией проводить 48 часов при температуре 22-24°C в темноте. В качестве контроля трансформации использовать листовые диски на той же среде без добавления агробактериальной культуры.

9. Для регенерации побегов через двое суток после начала кокультивации экспланты переносят на среду Мурасиге-Скуга с добавлением 30 г/л сахарозы, 1 мг/л пиридоксин-моногидрохлорида, 1 мг/л тиамин-гидрохлорида, 10 мг/л никотиновой кислоты, 0,1 мг/л НУК, 1 мг/л БАП и 10 г/л агара, а также 150 мг/л антибиотика тиментина для элиминации агробактерий и 50 мг/л гигромицина. Каждые две-три недели экспланты перекладывают на свежую среду.

10. Появившиеся регенеранты растений укореняют, для этого их аккуратно отделяют и переносят на среду без регуляторов роста Мурасиге-Скуга с добавлением 15 г/л сахарозы, 1 мг/л пиридоксин-моногидрохлорида, 1 мг/л тиамин-гидрохлорида, 10 мг/л никотиновой кислоты и 10 г/л агара с добавлением 150 мг/л тиментина и 50 мг/л гигромицина (гигромицин и тиментин готовят на стерильной воде и хранят при температуре -20°C. Рифампицин готовят на 95% этиловом спирте и хранят при температуре +4°C).

Лабораторная работа № 13. Агробактериальная инфильтрация растений *Nicotiana benthamiana*

Цель работы: экспрессировать в листьях растений *Nicotiana benthamiana* репортерный ген *gus* и определить активность его белкового продукта.

Ход работы:

1. Подготовить растения *Nicotiana benthamiana*. Одним из важных моментов для транзientной экспрессии является получение качественного растительного материала. Все растения, используемые в опыте должны быть одинакового возраста, находиться в одинаковой фазе развития, иметь примерно одинаковое количество и размер листьев. Для получения рассады семена высевают в грунт и проращивают при температуре 22-26°C. Через две недели после прорастания растения рассаживают в сосуды и выращивают до возраста шести недель. Для выращивания растений подходит любой

универсальный грунт. Растения выращивают в световой комнате при температуре 22-24°C и 16/8 часовом искусственном освещении.

2. Подготовить штаммы агробактерий. Кроме *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 с плазмидой pCambia1381Z с селективным геном устойчивости к антибиотику гигромицину (hptII) под контролем вирусного промотора CaMV35S и репортерным геном β-глюкуронидазы (gus) под контролем промотора гена антимикробных пептидов pro-SmAMP2 из растения мокрицы (*Stellaria media*) используется штамм *A. tumefaciens* GV2260/C58C1 содержащий бинарный вектор pLH7000 несущий ген p19, кодирующий белок-супрессор РНК-интерференции.

3. Штамм *Agrobacterium tumefaciens* для инфильтрации листьев растений GV3101 с плазмидой pCambia1381Z выращивают на среде LB (триптон - 10 г/л; дрожжевой экстракт – 5 г/л; хлорид натрия – 5 г/л) с добавлением антибиотиков в концентрации 100 мг/л рифампицина, 100 мг/л канамицина и 25 мг/л гентамицина. Стоковые растворы антибиотиков гентамицина, спектиномицина и стрептомицина определяются их коммерческой препаративной формой. Канамицин готовят на стерильной воде и хранят при температуре -20°C. Рифампицин готовят на 95% этиловом спирте и хранят при температуре +4°C. Для подавления РНК-интерференции при транзientной экспрессии репортерного гена используют штамм *A. tumefaciens* GV2260/C58C1 с генетической конструкцией pLH7000, содержащей ген белка-супрессора p19 томбусвирусов. Этот штамм выращивают на среде LB с добавлением рифампицина до концентрации 100 мг/л, спектиномицина и стрептомицина - до концентрации 50 мг/л каждый. Клетки бактерий растят в шейкере-инкубаторе при температуре 28°C и 150 об/мин в течение суток.

3. Приготовить раствор для инфильтрации агробактерий. Стоковый раствор агробуфера (10x): MES (morpholinoethane-sulfonic acid) (1,065 г) и MgSO₄·7H₂O (1,232 г) растворить в 40 мл H₂O и довести NaOH до pH5,6, затем довести водой до конечного объема 50 мл.

4. Провести агроинфильтрацию. Для агроинфильтрации используют молодые листья шестинедельных растений. Суспензию агробактерий готовят следующим образом: агробактерии осаждают при 5 тыс. об/мин в течение 5 мин, надосадочную жидкость сливают, осадок ресуспендируют в агробуфере. Оптическую плотность суспензии доводят до 0,6 при длине волны 600 нм. Полученные суспензии смешивают в соотношении 1:1. Полученную смесь агробактерий инфильтрируют в листья растений с помощью шприца без иглы, снизу. После инфильтрации растения содержат при температуре 22°C и

16-ти часовом искусственном освещении. На 7 день после инокуляции из листьев берут высечки для анализа.

Контрольные вопросы

1. Что такое рекомбинантная ДНК, как ее получают?
2. Что такое вектор? Какая последовательность необходима для клонирования вектора в клетках бактерий?
3. В чем различие между геномной библиотекой и библиотекой кДНК?
4. Какие способы прямого и опосредованного переноса генов применяют при трансформации клеток растений?
5. Приведите примеры генетически модифицированных организмов.

Глава 9. Культура тканей растений в сохранении генофонда

Биологическое разнообразие (биоразнообразие) — это разнообразие всего живого на Земле. В его основе лежит видовое разнообразие. В настоящее время описано около 1,5 миллиона видов животных и 0,5 миллиона видов растений. Сохранение биоразнообразия – единственный механизм стабильности жизни на Земле.

Генофонд — совокупность генов, которые имеются у всех особей популяций.

В питании людей наибольшее значение имеют четыре культуры: рис, пшеница, кукуруза, картофель. Эти четыре вида обеспечивают 60% калорийности питания. 95% рациона составляют 30 видов. Всего же в пищу употребляют более 7000 видов растений. К тому же не следует забывать о кормовых, технических, лекарственных, декоративных культурах. Сохранение видового и сортового разнообразия сельскохозяйственных культур имеет большую важность, монокультура или возделывание небольшого количества культур и ограниченного количества их сортов может привести к катастрофе при изменении внешних условий или появлении новых болезней/вредителей. Также генофонд сельскохозяйственных культур является важным источником возможных ценных генов для селекции новых сортов и гибридов. Общество развивается, его потребности со временем меняются. Кроме того, могут возникнуть новые экологические вызовы (болезни, абиотические стрессы), для которых, вероятно, будут необходимы новые признаки сельскохозяйственных культур или новые культуры.

В результате выращивания ограниченного числа как правило наиболее продуктивных и адаптивных сортов и вытеснения сортов локальной селекции, народной селекции, может произойти утрата отдельных или комбинаций генов.

В 1983 г. была создана комиссия по генетическим ресурсам в сфере продовольствия и сельского хозяйства, которая помогает координировать и согласовывать международные инициативы по сохранению генетических ресурсов.

Существуют следующие способы сохранения генофонда: сохранение среды обитания диких видов (создание заповедников, заказников, национальных парков), создание генетических банков семян, искусственных посадок, банков тканей, криосохранение.

Самые крупные по количеству и ценности образцов **генбанки семян** находятся в США (около 550 тыс. образцов), Китае (около 440 тыс.), Индии (около 345 тыс.), и России (около 320 тыс. образцов). Сбор и хранение коллекций семян организовано во многих странах. Эти коллекции различаются по видовому и сортовому составу, так как большее внимание обычно уделяется культурам важным в регионе расположения генбанков.

Коллекций генетических ресурсов растений можно разделить на несколько типов. **Базовые коллекции** не предназначены для использования исследователями и поддерживаются в режиме долгосрочного хранения. Это наиболее полные генетические коллекции видов. Поступающие в базовую коллекцию семена сушат до соответствующего содержания влаги и хранят при низкой влажности и температурах ниже нуля (от -10 до -18 ° C) или при криогенных температурах (от -150 до -196 ° C) в зависимости от вида. В этих условиях материалы могут храниться в течение многих десятилетий. Куратор коллекции и персонал периодически тестируют семена каждого образца на всхожесть, когда она опускается ниже определенного уровня, образцы выращивают для получения свежих семян.

Резервные коллекции существуют в дополнение к базовым на случай аварии, для страховки. **Активные коллекции** состоят из тех же образцов что и базовые, но их материалы доступны для использования селекционерами или другими исследователями. Образцы хранятся при температуре около 0 ° C и примерно 8% влажности, остаются жизнеспособными в течение 10-15 лет. Чтобы снабжать всех желающих образцами, кураторы активных коллекций оперативно размножают образцы. **Рабочие коллекции (селекционные)** находятся в селекционных фирмах и являются исходным материалом для селекционной работы.

Искусственные посадки организуют для вегетативно размножаемых видов, например, коллекций сортов плодовых и ягодных культур.

Хранение *in vitro* генетических ресурсов подразумевает культуру ткани (суспензии клеток каллуса, меристематические ткани). Каждый образец в коллекции при необходимости можно быстро размножить, освободить от инфекции, такие коллекции занимают меньшую площадь, чем искусственные посадки. Клетки и ткани *in vitro* нужно пересаживать на свежие питательные среды каждые 3-4 недели. Чтобы снизить трудозатраты и затраты других ресурсов, осуществляют **депонирование** или **криоконсервацию**.

Для депонирования - замедления роста растений в культуре *in vitro* - возможно охлаждение до температуры прекращения активного роста (для картофеля +9...10 °C, для яблони +1 °C), изменение газового состава,

добавление регуляторов роста и осмотических ингибиторов роста в питательную среду (маннит в концентрации 3-6%), хранение образцов в форме искусственных семян – эмбриоидов в оболочках из альгинатного геля.

Криоконсервация - это хранение при экстремально низких температурах до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в жидком азоте. Растительные клетки, ткани или другой растительный материал может храниться таким образом в течение длительного времени.

Гибель клеток при замораживании связана с формированием кристаллов льда. Кристаллы либо механически разрушают мембраны клеток, либо клетка погибает от дегидратации, когда молекулы воды выходят из клеток, чтобы присоединиться к растущим кристаллам. При температуре $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ рост кристаллов льда совершенно прекращается. Чтобы затруднить кристаллизацию, используют криопротекторы.

Криопротекторы - вещества, затрудняющие кристаллизацию льда (снижают точку замерзания воды, способны связывать внутриклеточную воду, повышают вязкость раствора). В качестве криопротекторов используют сахара, глицерин, ДМСО (диметилсульфоксид), ПЭГ (полиэтиленгликоль) или их сочетание. При подборе криопротекторов руководствуются оценкой их токсичности и эффективности.

Замораживание возможно программное медленное, при котором температуру от 0 до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ снижают со скоростью $0,5-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин.}$, либо сверхбыстрое, при котором объект в ампуле с криопротектором сразу погружают в жидкий азот. Для размораживания ампулу с образцом помещают в водяную баню с температурой $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ или $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, затем проводят ступенчатое удаление криопротектора.

Для успешной криоконсервации с сохранением последующей возможности регенерировать целые растения важны следующие факторы: генотип образца, тип клеток, плотность клеточной суспензии, состав среды для криоконсервирования, вид и концентрация криопротектора, режимы охлаждения и размораживания, способ реабилитации клеток.

Помимо коллекций клеток и тканей растений большое значение имеют коллекции микроорганизмов. Например, известны коллекции молочнокислых бактерий для производства сыров и бактериофагов к ним (ВНИИМС), молочнокислых бактерий и заквасок (ВНИМИ), промышленных микроорганизмов для производства мясных продуктов (ВНИИМП), микроорганизмов для спиртовой, уксусной, ферментной и дрожжевой промышленности (ВНИИПБТ). Для хранения бактерий можно применять **лиофильную сушку** – замораживание с последующей возгонкой в вакууме.

Контрольные вопросы

1. Что такое биоразнообразие, почему необходимо сохранение биоразнообразия?
2. Какие существуют способы сохранения биоразнообразия?
3. Что такое генофонд, почему необходимо сохранение генофонда?
4. Какие существуют способы сохранения генофонда?
5. Может ли измениться генотип образца при хранении в банке семян?
6. Почему при замораживании может произойти гибель клеток? Для чего применяют криопротекторы при криоконсервации?

Глава 10. Культивирование клеток и тканей для производства ценных веществ

Биотехнология – целенаправленное получение ценных продуктов за счет использования биохимической деятельности микроорганизмов (грибов, бактерий), изолированных клеток животных и растений или их компонентов.

Культивируемые клетки синтезируют экономически важные продукты: соединения **первичного метаболизма** (углеводы, белки, липиды, витамины) и **вторичные метаболиты** (алкалоиды, терпеноиды, стероиды, гликозиды, эфирные масла, фенольные соединения).

Для получения ценного продукта - первичного или вторичного метаболита организуют промышленное культивирование клеток. Этапами культивирования клеток являются: приготовление питательной среды, культивирование на ней микроорганизмов или клеток, синтезирующих нужный метаболит, очищение целевого продукта от компонентов среды и клеточной массы.



Рис. 58. Ферментер / биореактор, состоящий из блока управления, опорного каркаса, емкости для культивирования и программного обеспечения для сбора и хранения данных

<https://sartoros.ru/biotechnology/biostat-cultibag-str/>

Клетки растений или микроорганизмов культивируют на поверхности питательных сред (поверхностное культивирование) или в виде суспензии клеток в жидкой среде (глубинное культивирование).

Глубинное культивирование клеток происходит в ферментере (биореакторе) (рис. 58). Масса и объем биореакторов различна, от 0,5 л до 1000 л и более, определяется большей частью экономическими соображениями. По способу перемешивания клеточной суспензии их делят на ферментеры с механическими лопастями, барботажные колонны, эрлифтные реакторы с внутренней циркуляцией, эрлифтные реакторы с внешней циркуляцией.

Процесс культивации – **ферментация** – начинается с того момента, когда заранее подготовленный материал клеток вводится в реактор. Динамику роста клеток в биореакторе описывает график, представленный в

главе 5, фазы роста культуры те же: лаг-фаза, на которой происходит подготовка клеток к делению; экспоненциальное увеличение биомассы; стационарная, характеризующаяся наибольшим синтезом вторичных метаболитов; вымирание клеток после истощения среды и накопления в ней продуктов жизнедеятельности клеток.

По характеру подкормки процессы культивирования могут быть периодическими или непрерывными. При **периодическом культивировании** суспензию клеток оптимальной фазы роста полностью используют для получения целевого продукта – биомассы или конкретного вещества. При **непрерывном культивировании** биореактор оснащен устройством, которое измеряет плотность клеточной суспензии или концентрацию одного из компонентов питательной среды и по мере необходимости автоматически добавляет свежую питательную среду и отбирает такой же объем клеточной суспензии, поддерживая культуру в определенной фазе роста – экспоненциальной или стационарной.

Очистка целевого продукта. Целевой продукт может накапливаться внутри клеток или в питательной среде. В первом случае необходимо разрушить клетки, для этого возможно использование мелющих тел, замораживания, ультразвука, гидролиза, ферментолиза. В зависимости от продукта применяют один из следующих способов очистки: отстаивание - разделение под действием гравитации; сепарация, центрифугирование - использование центробежных сил (отделение дрожжей при производстве кормовой биомассы); фильтрация - пропускание через фильтрующий материал, на котором задерживается биомасса или даже крупные молекулы; экстракция - переход из водной фазы в не смешивающуюся с ней жидкость (бенин, хлороформ, эфир, масло); отгонка, ректификация - выделение легкокипящих продуктов; адсорбция - использование твердых сорбентов; коагуляция - осаждение крупных клеточных частиц при добавлении коагулянтов, изменении рН или температуры; флотация - выделение пенной фракции) кристаллизация - формирование кристаллов целевых продуктов при медленном охлаждении (пенициллин).

Ценными продуктами, производимыми в культуре клеток могут быть: белковые продукты, аминокислоты, ферменты, гормоны, интерфероны, антибиотики, средства защиты растений, препараты азотфиксирующий бактерий, витамины, вторичные метаболиты.

Белковые продукты - белок одноклеточных водорослей, дрожжей, бактерий, грибов. Наиболее широко используют дрожжеподобные грибы, для их культивирования не требуется асептических условий, в качестве питательных сред используют подготовленные отходы, например, отходы

деревообработки (щепу и опилки), производства этанола (барду), переработки молока (молочную сыворотку), растительные отходы (подсолнечную лузгу). Коммерческие компании: ООО «Кировский биохимический завод» производит кормовые дрожжи - белковую и витаминную добавку в кормовые рационы сельскохозяйственным животным.

Аминокислоты – цистеин, глицин, триптофан, глутаминовая кислота, которые могут быть кормовыми и пищевыми добавками, сырьем для фармацевтики и парфюмерии. Коммерческие компании: АО «Аминосиб», ЗАО «Завод Премиксов № 1», АО «ДонБиоТех» производят лизин.

Ферменты – протеазы для моющих средств, амилазы для переработки крахмала, протеазы для гомогенизации соков, целлюлазы для ферментного гидролиза целлюлозы. Ферменты чаще всего производят микробиологическим синтезом - методом поверхностного культивирования грибов, реже методом глубинного культивирования бактерий. Например, для производства сыра используют сычужный фермент, получаемый из желудков телят, или полученный в культуре генетически модифицированных бактерий, либо произведенные в культуре грибов молокосвертывающие препараты. Для поверхностного культивирования грибов в качестве питательной среды часто используют отходы мукомольных предприятий - пшеничные отруби, в которые вводят различные добавки, для глубинного культивирования также подбирают максимально дешевые компоненты сред.

Гормоны - инсулин, соматотропин, соматостатин в культуре генетически модифицированной кишечной палочки. Коммерческие компании: ООО «Завод Медсинтез» производит инсулин, ОАО "Фармстандарт-УфаВИТА" производит гормон роста.

Интерфероны в культуре генетически модифицированных бактерий. Коммерческие компании: АО «Биомед» им. И.И. Мечникова, ЗАО «Вектор-Медика», ООО «ФЕРОН», ООО «НПП ФАРМАКЛОН», Биннофарм Групп, ЗАО «Фирн М», ЗАО «Биокад», ОАО «Фармстандарт-УфаВИТА» производят интерферон.

Антибиотики - продукты обмена веществ микроорганизмов (вторичные метаболиты), избирательно подавляющие рост клеток определенных групп микроорганизмов или убивающие их. Антибиотики применяют в медицине и ветеринарии, животноводстве, при консервировании. Различают противобактериальные, противогрибковые, противоопухолевые, противотуберкулезные, противоамебные антибиотики. Антибиотики могут ингибировать синтез клеточной стенки, нарушать проницаемость мембран, подавлять синтез нуклеиновых кислот или белка, ингибировать действие какого-либо фермента. Чаще всего антибиотики

производят методами поверхностного или глубинного культивирования грибов. Например, хлортетрациклин (биомицин) производят путем глубинного культивирования с использованием кукурузной муки в качестве основного компонента питательной среды.

Микробиологические средства защиты растений. Используют инсектицидные препараты на основе бактерии *Bacillus thuringiensis* (бацитурин, энтобактерин, дендробациллин, инсектин), различные штаммы *B. thuringiensis* составляют три патотипа: патогены чешуекрылых (плодожорки, листовертки, шелкопряды, моли и др.), патогены двукрылых (мошки, мухи, комары и др.), патогены жесткокрылых (колорадский жук). Также распространены грибные инсектицидные препараты (боверин против колорадского жука можно производить поверхностным культивированием гриба на жидких отварах свеклы, картофеля и т.д. или на твердых средах на основе картофеля, моркови, арбузных корок и т.д.). Также существуют, но по ряду причин мало распространены вирусные препараты, вызывающие болезни насекомых, для их получения необходимо массово размножить и заразить насекомого-хозяина, выделить из погибших насекомых вирусные частицы.

Препараты азотфиксирующих бактерий для инокуляции семян бобовых культур для более быстрого формирования клубеньков и эффективной азотфиксации.

Витамины – микробиологический синтез В₁₂, В₂, β-каротина, эргостерина. Для производства кормовой добавки витамина В₁₂ сбраживают отходы микробиологического производства ацетона и бутанола или этанола вместе с мертвыми клетками производителей этих веществ, выход витамина повышается при добавлении в среду СоСl₂. Сбраживание осуществляют анаэробные метанообразующие бактерии. β-каротин можно получать из растительного сырья (моркови, тыквы), химическим синтезом и микробиологическим синтезом, эффективен микробиологический синтез в культуре гриба. Витамин С производят ступенчатым синтезом – химическим синтезом из глюкозы с микробиологическим этапом на одной из стадий.

Вторичные метаболиты – лекарственные и косметические препараты в культуре растительных клеток и тканей. Коммерческие компании: ОАО «Биохиммаш» производит паклитаксел из тиса тихоокеанского, шиконин из воробейника аптечного, гинзенозиды женьшеня дальневосточного.

Белки в культуре клеток животных – лекарственные препараты. Для клеток микробиологического синтеза ценных веществ можно использовать более дешевые питательные среды, чем для клеток растений или животных. Однако есть белки со специфической четвертичной структурой, которая не

может сформироваться в клетках прокариот, их нельзя получать даже в культуре клеток генетически модифицированных бактерий. Для синтеза таких белков используют культуру клеток животных.

Контрольные вопросы

1. Какие вещества производят в культуре клеток микроорганизмов? В культуре клеток растений?
2. Почему в качестве питательных сред для культивирования микроорганизмов стараются использовать отходы производств?
3. Как происходит перемешивание клеточной суспензии в биореакторе?
4. В чем различие между периодическим и непрерывным культивированием?
5. Как очищают готовый продукт, синтезированный в биореакторе?

Глоссарий

In vitro — выращивание живого материала в асептических условиях на искусственных питательных средах с использованием пластиковых или стеклянных сосудов.

In vivo — в живом организме или клетках.

Адвентивный (Adventitious) — развивающийся из необычных для его происхождения клеток и тканей, как, например, побеги и корни из каллуса или эмбриониды из незиготических клеток.

Аксеничная культура (Axenic Culture) – культура без чужеродных или нежелательных организмов. Аксеничная культура может включать целенаправленную кокультивацию различных типов клеток, тканей или организмов.

Андрогенез in vitro (Androgenesis) — развитие растения из гаплоидных клеток мужских генеративных органов.

Анеуплоид (Aneuploid) — ядро, клетка, организм, имеющие в основном наборе увеличенное или уменьшенное, но в отличие от нормы не кратное гаплоидному число хромосом.

Апикальная меристема побега (Shoot Apical Meristem) — ткань, состоящая из недифференцированных делящихся клеток (апекс или конус нарастания).

Апикальное доминирование (Apical dominance) — подавление терминальной почкой побега растения роста боковых побегов из пазушных почек.

Асептика (Asepsis) – без инфицирующих или контаминирующих микроорганизмов.

Вегетативное размножение (Vegetative Propagation) — бесполое размножение растений, при котором новые особи образуются из специализированных или неспециализированных частей тела материнского организма.

Витрификация (Vitrification), См. сверхобводненность.

Время удвоения числа клеток в культуре in vitro (Cell culture doubling time) — интервал времени, за который число клеток в цитопопуляциях увеличивается вдвое.

Гамета (Gamete) – половая клетка, имеющая одинарный (гаплоидный) набор хромосом, участвующая в половом процессе с образованием зиготы (спермий, сперматозоид, яйцеклетка).

Гаметоклон (Gametoclon) – растения, регенерированные в культуре клеток, полученных из мейоспор, гаметофитов или гамет.

Гаметоклональная вариация (Gametoclonal Variation) — вариация в фенотипе генетического или эпигенетического происхождения, проявляющаяся у гаметоклонов.

Гаметофит (Gametophyte) – гаплоидное поколение в цикле развития растений, развивающееся из спор и производящее половые клетки (гаметы). У цветковых растений мужской гаметофит – незрелое двух– трехъядерное пыльцевое зерно, женский гаметофит – зародышевый мешок.

Гаплоид (Haploid) — организм с одинарным (гаплоидным) набором хромосом (символ n).

Гетерокарион (Heterokaryon) – клетка, содержащая два или более ядра в цитозоле, образовавшаяся при слиянии протопластов.

Гибридизация клеток (Cell Hybridization) – слияние протопластов двух или более клеток, приводящее к формированию синкариона.

Гибридная клетка (Hybrid Cell) – одноядерная клетка, образованная слиянием протопластов двух клеток и приводящая к формированию синкариона.

Гиногенез (Gynogenesis) — развитие растения из гаплоидных клеток женских генеративных органов.

Гомокарион (Homokaryon) – клетка, содержащая два или более генетически идентичных ядра в цитозоле, как правило образуется при слиянии протопластов двух клеток.

Дедифференциация (Dedifferentiation) — потеря дифференцированными клетками специализации и приобретение ими способности к делению.

Дигаплоид (Dihaploid) – клетка или организм, образованные гаплоидизацией полиплоида ($2n, AABB \rightarrow n, AB$).

Диплоид (Diploid) — организм с двойным набором гомологичных хромосом, представленным числом, характерным для данного вида ($2n$).

Дифференциация (Differentiation) — процесс специализации клеток, приобретения ими функций и свойств, отличных от материнских клеток.

Дифференцированные клетки (Differentiated Cells) — клетки, поддерживающие в культуре структуру и функции, присущие данному типу клеток *in vivo*.

Доминирование (Dominance) — тип аллельного взаимодействия генов, при котором один аллель (доминантный) подавляет проявление другого (рецессивного).

Индукция (Induction) — инициация образования структур или процессов *in vitro*.

Инфекция, заражение (Infection) – проникновение, размножение и

распространение в тканях организма агентов (микроорганизмов, насекомых–вредителей и др.), вызывающих заболевание.

Каллус (Callus) — ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток растений.

Кариопласт (Karyoplast) — ядро клетки, полученное энуклеацией, окруженное тонким слоем цитоплазмы и плазматической мембраной.

Кариотип (Karyotype) — совокупность признаков (число, морфология) полного набора хромосом, характерного для данного вида.

Клеточная линия (Cell Line) — продукт первого успешного субкультивирования первичной культуры клеток.

Клеточный штамм (Cell Strain) — культура клеток, полученная либо из первичной культуры, либо из клеточной линии отбором или клонированием клеток, имеющих специфические маркерные признаки.

Клон (Clone) — совокупность вегетативных потомков одного растения, развившегося из споры или семени. Популяции клонов не обязательно являются генетически однородными.

Клональное размножение (Clonal Propagation) — искусственное вегетативное размножение растений путем выращивания их из органов, тканей или клеток *in vitro*, в результате которого все растения-потомки предположительно генетически однородны и идентичны исходному растению или экспланту.

Контаминация, загрязнение (Contamination) — наличие нежелательного компонента, загрязняющего агента (биологическое, химическое, физическое тело или вещество), в физическом теле, окружающей среде, рабочем месте.

Криосохранение (Cryopreservation) – ультранизкотемпературное (ниже минус 100 °С) хранение клеток, тканей, эмбриоидов или семян.

Культура «няньки» (Nurse Culture) — культивирование *in vitro* тканей или клеток растений на среде с культивируемыми нецелевыми органами, тканями или клетками, поддерживающими рост и развитие основного экспланта.

Культура зародышей — см. эмбриокультура.

Культура изолированной ткани (Tissue Culture) — поддержание или рост тканей *in vitro* способом, обеспечивающим дифференциацию и сохранение их архитектуры и/или функции.

Культура клеток (суспензионная культура) (Cell Culture) — выращивание *in vitro* отдельных клеток или небольших их групп во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей аэрацию и перемешивание.

Культура меристем (Meristem Culture) — выращивание на питательной среде *in vitro* изолированного апекса побега.

Культура органов (Organ Culture) — поддержание жизнеспособности или рост зачатков органов, целых органов или их частей *in vitro* с целью дифференциации или сохранения их структуры или функции.

Культура тканей (Plant Tissue Culture) – культивирование или поддержание жизнеспособности клеток, тканей, органов или целого растения *in vitro*.

Культура эксплантов (Explant Culture) — поддержание жизнеспособности или рост эксплантов в культуре *in vitro*.

Методы асептики (Aseptic Technique) – методы используемые для предотвращения попадания грибов, бактерий, вирусов, микоплазм или других микроорганизмов в культуру клеток, тканей и органов, а также предотвращения взаимной контаминации клеточных культур.

Микроразмножение (Micropropagation) — технология вегетативного размножения растений *in vitro*.

Морфогенез (Morphogenesis) — процесс формообразования растительных структур различного уровня (органеллы, клетки, ткани, органа, особи).

Мутация (Mutation) — изменение в генетическом материале клеток в результате перестройки ДНК ядер и органелл, изменения структуры хромосом или путем полиплоидизации.

Недифференцированная клетка (Undifferentiated) — клетка изодиаметрической формы с большим ядром и мелкой или отсутствующей вакуолью. Пример недифференцированных клеток – клетки меристемы или эмбриоида.

Органогенез (Organogenesis) — процесс формирования органов в конусе нарастания побега, в результате которого органы растения формируются *de novo* в предшествующих структурах.

Пассаж (Passage) — перенос или пересадка клеток из одного культурального сосуда в другой на свежую питательную среду.

Первичная культура (Primary Culture) – культура клеток, тканей или органов, изолированных непосредственно от растения. Первичная культура является таковой до первой субкультуры.

Питательная среда с химически определенным составом (Chemically Defined Medium) – питательная среда из ингредиентов с известной молекулярной структурой и степенью чистоты.

Плотность клеточной суспензии (плотность цитопопуляции) (**Population Density**) — число клеток на единицу площади или объема питательной среды в культуральном сосуде.

Полиплоид (Polyploid) — организм характеризующийся измененным относительно диплоидного набора числом хромосом (символы $2n+1$, $3n$, $4n$ и др).

Привыкание, габитуация (Habituation) — приобретенная способность популяции клеток расти и делиться независимо от экзогенно поставляемых регуляторов роста.

Пролиферация (Proliferation) — новообразование клеток и тканей путем деления клеток.

Протопласт (Protoplast) — 1) живое содержимое клетки: ядро и цитоплазма. 2) растительная (бактериальная или грибная) клетка, лишенная клеточной стенки.

Псевдодиплоид (Pseudodiploid) — организм с кариотипом, отличающимся от исходного кариотипа данного вида, как следствие, с нарушенным сцеплением генов.

Размножение in vitro (In Vitro Propagation) — размножение растений в асептических искусственно созданных условиях с использованием пластиковых или стеклянных культуральных сосудов и питательной среды.

Регенерация (Regeneration) — морфогенетическая реакция на стимулирующие факторы, приводящая к образованию эмбриоидов, органов или целых растений в культуре тканей.

Редифференциация (Redifferentiation) — переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующим делением или непосредственно.

Рецессивный аллель (Recessive allele) — аллель, подавляемый доминантным аллелем и проявляющийся в диплоидной клетке или организме в гомозиготном состоянии.

Сверхобводненность (Hyperhydricity), синоним Витрификация (Vitrification) — избыточная обводненность тканей в культуре *in vitro*.

Синкарион (Synkaryon) — гибридная клетка, образовавшаяся в результате слияния содержащихся в ней различающихся ядер соматических клеток.

Слияние протопластов (Protoplast Fusion) — технология формирования одной клетки из двух и более протопластов с объединением их поверхностных мембран (плазмалемм).

Сомаклональная изменчивость (Somaclonal Variation) — фенотипическая изменчивость генетического или эпигенетического происхождения, проявляющаяся между соматклонами.

Соматклоны (Somaclones) — растения, полученные в любых формах культуры клеток с использованием соматических клеток растений.

Соматическая гибридизация (Somatic Cell Hybridization) — слияние *in vitro* протопластов генетически различающихся соматических клеток.

Соматический гибрид (Somatic Cell Hybrid) — клетка (развившееся из нее растение), образованная в результате слияния протопластов генетически различающихся соматических клеток.

Соматический эмбриогенез (Somatic Embryogenesis) — процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) из соматических негаметических клеток в культуре ткани и клеток.

Спорофит (Sporophyte) — 1) многоклеточная фаза в цикле развития растений, производящая споры. 2) диплоидное (или иного уровня пloidности) поколение в цикле развития растений, развивающееся из гаметических, зиготических или соматических клеток. У цветковых растений спорофит – тело растения.

Стерильность (Sterile) — отсутствие всех видов микроорганизмов на поверхностях, оборудовании, питательных средах, продуктах.

Стерильный (Sterile) — 1) без жизни. 2) организм, неспособный производить функциональные гаметы.

Субкультура (Subculture) — перенос или пересадка разделенных на части цитопопуляций клеток или ткани на свежую питательную среду.

Суспензионная культура (Suspension Culture) — тип культуры тканей при котором клетки или агрегированные клетки размножаются суспендированием в жидкой питательной среде.

Сферопласт (Spheroplast) — растительная клетка, лишенная большей части клеточной стенки.

Тотипотентность (Totipotency) — способность клетки дифференцироваться в клетку любой ткани организма.

Транзиентный (Transient) — проходящий с течением времени, непостоянный, временный.

Трансген (Transgene) — ген или генетический материал переданный посредством природных или генноинженерных методов из одного вида организма в другой.

Трансгенез (Transgenesis) — процесс интродукции гена (трансгена) из генома одного организма в геном другого.

Трансфекция (Transfection) — процесс преднамеренного введения нуклеиновых кислот в эукариотическую клетку.

Трансформация (Transformation) — процесс переноса и стабильной геномной интеграции чужеродной ДНК, приводящей к генетической модификации.

Удвоенный гаплоид (Doubled haploid) — клетка (развившийся из нее организм), образовавшаяся в результате удвоения гаплоидного числа хромосом.

Цибрид (Cybrid) — живая клетка, полученная при слиянии цитопласта и изолированного протопласта, – цитоплазматический гибрид.

Цитоплазматический гибрид (Cytoplasmic Hybrid) – синоним цибрида.

Цитоплазматическое наследование (Cytoplasmic Inheritance) – наследование, определяемое внеядерными генами, например, генами митохондрий или хлоропластов.

Цитопласт (Cytoplast) — ограниченная мембраной цитоплазма клетки после энуклеации.

Цитопопуляция клеток (Cell population) — совокупность культивируемых *in vitro* клеток одной особи.

Число пассажей (Passage Number) — число раз, когда клетки в культуре были субкультивированы или пассированы.

Эксплант (Explant) — клетка, ткань, орган изолированные и помещенные на искусственную питательную среду для роста или поддержания жизнеспособности (сохранения).

Электропорация (Electroporation) – создание посредством электрического напряжения транзиентных пор в плазмалемме, как правило с целью введения экзогенной ДНК.

Эмбриоид (Embryoid) — зародышеподобная структура, возникшая путем эмбриоидогенеза.

Эмбриоидогенез (Embryogenesis) – процесс инициации и развития эмбриоида.

Эмбриокультура (Embryo Culture) – культивирование *in vitro* изолированных зрелых или незрелых зародышей.

Эпигенетические вариации (Epigenetic Variation) — фенотипическое варьирование, не связанное с генетической основой, при одинаковых условиях среды.

Эпигенетическое событие (Epigenetic Event) – любое изменение фенотипа, в том числе наследуемое, не связанное с изменением последовательности ДНК. Эти изменения включают изменение в

метиляции ДНК, активации транскрипции, трансляционном контроле и посттрансляционные модификации.

Эффективность клонирования (Cloning Efficiency) – процент высаженных клеток, формирующих клон. Термин относится к тем случаям, когда колонии формируются из одиночных клеток.

Эффективность формирования колоний (Colony Forming Efficiency) – процент высаженных клеток, формирующих колонии.

Ювенильный период (Juvenile) — период онтогенеза растения, характеризующийся их морфологическими отличиями от взрослых растений и не восприимчивостью к воздействиям, стимулирующим переход к цветению.

ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Приготовление растворов

Работа в лаборатории часто требует приготовления различных растворов, например, многокомпонентных питательных сред или растворов для поверхностной стерилизации растительного материала. Концентрация компонентов раствора может быть записана в процентах (%), единицах веса на объем (г/л), единицах объема на объем (мл/л), молях (моль/л). Чтобы получать предсказуемый и воспроизводимый результат, необходимо правильно рассчитывать необходимые количества веществ.

Процентная концентрация (w, %)

Процентная концентрация (массовая доля растворенного вещества) – это отношение массы растворенного вещества к общей массе раствора, выраженное в процентах.

Пример 1: Если концентрация сахарозы в составе питательной среды должна составлять 3%, то для приготовления 100 мл среды нужно отмерить 3 г сахарозы ($w = \frac{3}{100} * 100\% = 3\%$). Соответственно в 1 л среды должно содержаться 30 г сахарозы ($w = \frac{30}{1000} * 100\% = 3\%$).

Пример 2: Если требуется добавить 0,7% агара, значит нужно взять навеску 7 г агара на 1 л питательной среды ($w = \frac{7}{1000} * 100\% = 0,7\%$).

Задачи

- 1) Необходимая концентрация сахарозы в питательной среде 13%. Сколько сахарозы нужно добавить, чтобы приготовить питательные среды следующих объемов: а) 1 литр; б) 500 мл; в) 250 мл; г) 10 мл.
- 2) Если в питательной среде должно быть 1,1% агара, сколько агара нужно добавить для приготовления 1 л среды? 20 мл среды?
- 3) В 250 мл питательной среды содержится 1,5 г агара. Какова концентрация агара в процентах?
- 4) Нужно приготовить 2% раствор NaOCl (гипохлорита натрия) для поверхностной стерилизации растительного материала. В лаборатории есть 19% раствор NaOCl. Сколько нужно взять 19%-го раствора и воды для приготовления:
 - а) 100 мл 2%-го раствора NaOCl
 - б) 300 мл 2%-го раствора NaOCl

в) 500 мл 2%-го раствора NaOCl

5) Для поверхностной стерилизации поверхностей используют 70% этанол. В лаборатории есть 95% этанол. Для приготовления 1 литр 70% раствора этанола нужно _____ мл 95% этанола и _____ мл воды.

Ответы:

1) а) $13 \cdot 1000 / 100 = 130$ г; б) $13 \cdot 500 / 100 = 65$ г или $130 \text{ г/л} \cdot 0,5 \text{ л} = 65 \text{ г}$;

с) $13 \cdot 250 / 100 = 32,5$ г или $130 \text{ г/л} \cdot 0,25 \text{ л} = 32,5 \text{ г}$; д) $13 \cdot 10 / 100 = 1,3$ г

2) $1,1 \cdot 1000 / 100 = 11$ г; $1,1 \cdot 20 / 100 = 0,22$ г

3) $1,5 / 250 \cdot 100 = 0,6\%$

4) а) $100 \cdot 2 / 19 = 10,5$ мл NaOCl и $100 - 10,5 = 89,5$ мл воды;

б) $300 \cdot 2 / 19 = 31,6$ мл NaOCl и $300 - 31,6 = 268,4$ мл воды;

с) $500 \cdot 2 / 19 = 52,6$ мл NaOCl и $500 - 52,6 = 447,4$ мл воды

5) $1000 \cdot 70 / 95 = 737$ мл; $1000 - 737 = 263$ мл

Молярная концентрация (С, моль/л)

Молярная концентрация (молярность) - это отношение количества растворенного вещества в молях к объему раствора в литрах. В растворе концентрации 1М содержится 1 моль вещества на 1 л раствора. Чтобы приготовить такой раствор нужно знать массу 1 моля вещества (молярную массу). Часто она указана на упаковке, в которой это вещество хранится. Молярная масса вещества численно равна относительной молекулярной массе и ее можно узнать, сложив относительные атомные массы атомов, входящих в молекулу вещества элементов.

Пример: Нужно приготовить 0,01М раствор ИУК (индолил-3-уксусной кислоты). Зная химическую формулу ИУК ($C_{10}H_9NO_2$) можно найти атомные массы атомов в периодической таблице Менделеева и посчитать молекулярную массу (12×10 (С) + 1×9 (Н) + 14 (N) + 16×2 (O) = 175). Масса 1 моль ИУК составляет 175 г. Чтобы приготовить 1 л раствора ИУК концентрации 0,01М нужно взять навеску 1,75 г ($175 \text{ г} \times 0,01 = 1,75$). Чтобы приготовить 50 мл такого раствора необходимо 87,5 мг ИУК.

Задачи

1) 0,01М раствор ИМК (индолилмасляной кислоты) содержит __ г ИМК на литр. $M(C_{12}H_{13}NO_2) = 203,2$.

2) Для хранения электрода рН метра используют 3,5М раствор KCl ($M=74,5$). Сколько грамм KCl необходимо, чтобы приготовить 50 мл

такого раствора? Какая у этого раствора будет процентная концентрация?

- 3) Чтобы приготовить питательную среду WPM с добавлением 1 мкМ 2iP (изопентиладенин, $M(C_{10}H_{13}N_5) = 315,7$), нужно ___ мг 2iP.

Ответы:

- 1) $203,2 * 0,01 = 2,032$ г
2) $3,5 * 74,5 * 0,05 = 13$ г; $(13/50) * 100\% = 26\%$
3) $315,7 * 1000 / 1\ 000\ 000 = 0,32$ мг

Использование стоковых растворов

Регуляторы роста и некоторые другие вещества добавляют в питательные среды в настолько небольших количествах, что их бывает невозможно точно отмерить даже на аналитических весах. В таких случаях заранее готовят стоковые растворы этих веществ.

Пример: Необходимо приготовить 1 л питательной среды, содержащей 1 мг/л 2,4-Д. На аналитических весах отмеряют 50 мг 2,4-Д, растворяют в этаноле, водой доводят объем до 50 мл. Получается стоковый раствор с концентрацией 1 мг/мл, который хранят в холодильнике. В питательную среду добавляют 1 мл этого раствора.

Задачи

- 1) Необходимо приготовить питательную среду, содержащую 2,5 мг/л 6-БАП (бензиламинопурина). Сколько нужно отмерить стокового раствора 6-БАП с концентрацией 1 мг/мл для приготовления 1 л такой питательной среды? 500 мл питательной среды? 250 мл питательной среды?
- 2) Необходимо приготовить питательную среду, содержащую 0,01 мг/л тидиазурана. Сколько нужно отмерить стокового раствора 6-БАП с концентрацией 10 мг/100 мл для приготовления 1 л такой питательной среды?

Ответы:

- 1) 2,5 мл; $2,5/2 = 1,25$ мл; $2,5/4 = 0,625$ мл
2) $0,01 * 10 = 0,1$ мл

ПРИЛОЖЕНИЕ 2. Состав питательных сред

Таблица. Состав базовых питательных сред, мг вещества /л среды

Компоненты среды	B5 Gamborg O.L. et al. (1968)	MS Murashige T., Skoog F. (1962)	WPM Lloyd G.B., McCown B.H. (1980)
Стоковый раствор 1. Макроэлементы			
NH ₄ NO ₃	-	1 650	400
KN0 ₃	2 500	1 900	-
CaCl ₂ *2H ₂ O	150	440	96
Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O	-	-	556
KH ₂ PO ₄	-	170	170
KCl	300	-	-
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	150	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	-	-
K ₂ SO ₄	-	-	990
Стоковый раствор 2. Микроэлементы			
MnSO ₄ *4H ₂ O	10,0	22,3	16,9
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	2,0	8,6	8,6
H ₃ BO ₃	3,0	6,2	6,2
KI	2,5	0,83	-
Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0,3	0,25	0,25
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	0,025	-
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
конц. H ₂ SO ₄	-	-	-
Стоковый раствор 3. Источник магния			
MgSO ₄ *7H ₂ O	250	370	370
Стоковый раствор 4. Источник железа			

FeSO ₄ *7H ₂ O	30,0	27,8	27,8
Na ₂ EDTA *2H ₂ O	36,0	37,3	37,3
Стоковый раствор 5. Органические вещества			
Thiamin*HCl	10,0	0,1	
Glycine	-	2,0	
Nicotinic acid	1,0	0,5	
Pyridoxine*HCl	1,0	0,5	
Folic acid	-	-	
Biotin	-	-	
Myo-Inositol	100	100	
Calcium pantothenate			
Adenin			
Cistein			

Библиографический список

1. Aionesei, T. Pathways to Microspore Embryogenesis / T. Aionesei, A. Touraev, E. Heberle-Bors // Haploids in Crop Improvement II / C. E. Palmer // Biotechnology in Agriculture and Forestry 56. / T. Nagata. - Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2005. - P. 11-34.
2. Bajaj, Y.P.S. Barley \times rye hybrids (*Hordecale*) through embryo culture / Y.P. S. Bajaj, M.M. Verma, M.S Dhanju // Current Science. - 1980. – Vol. 49. – P. 362–363.
3. Bang, S. W. Production and characterization of the novel CMS line of radish (*Raphanus sativus*) carrying *Brassica mauronum* cytoplasm / S.W. Bang, K. Tsutsui, S.H. Shim, Y. Kaneko // Plant Breeding. – 2011. - Vol. 130(3). – P. 410–412.
4. Bohanec, B. Doubled Haploids via Gynogenesis / B. Bohanec. - Advances in Haploid Production in Higher Plants, 2009. - P. 35-46.
5. Christou, P. Applications to plants / In: Yang N.S., P.Christou (eds). Particle bombardment technology for gene transfer. Oxford Univ. Press, 1994. - pp. 71-99.
6. Corral-Martinez, P. Refining the method for eggplant microspore culture: effect of abscisic acid, epibrassinolide, polyethylene glycol, naphthaleneacetic acid, 6-benzylaminopurine and arabinogalactan proteins / P. Corral-Martinez, J.M. Segui-Simarro // Euphytica. – 2014. с 195. - P. 369–382.
7. Crossway, A. Integration of foreign DNA following microinjection into tobacco mesophyll protoplast / A. Crossway, J.V. Oakes, J.M. Irvine, B. Ward, V.C. Knauf, C.K. Schewmaker // Mol. Gen. Genet. - 1986. – Vol. 303. – P. 179-185.
8. Custers, J.B.M. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.) / J.B.M. Custers // Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual/Edited by M. Maluszynski. 2003. – P.185-193.
9. Deshayes, A. Liposomemediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an *Escherichia coli* plasmid / A. Deshayes, L. Herrera-Estrella, M. Caboche // EMBO J. - 1985. – Vol. 4. – P. 2731–2737.
10. Finnegan, J. Transgene inactivation: plants fight back / J. Finnegan, D. McElroy // I. Bio/Technology. - 1994. – Vol. 12. – P. 883–888.
11. Fromm, M. Expression of genes transferred into monocotyledonous and dicotyledonous plant cells by electroporation / M. Fromm, L. Taylor, V. Walbot // Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. - 1985. – Vol. 82. – P. 5824-5828.

12. Hernalsteens, J.-P. An *Agrobacterium*-transformed cell culture from the monocot *Asparagus officinalis* / J.-P. Hernalsteens, L. Thia-Toong, J. Schell, M. Van Montagu // *EMBO J.* – 1984. – Vol. 3(13). – P. 3039–3041.
13. Hiei, Y. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA / Y. Hiei, S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro // *Plant J.* – 1994. – Vol. 6. – P. 271–282.
14. Joersbo, M. Electroporation: Mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in plant protoplasts / M. Joersbo, J. Brunstedt. // *Physiologia Plantarum.* - 1991. – Vol. 81. – P. 256-264.
15. Morel, G. Producing virus-free *Cymbidium* / G. Morel // *American Orchid Society Bulletin.* - 1960. - Vol. 29. - P. 495–497.
16. Murashige, T. Plant propagation through tissue culture / Murashige, T. // *Annual Review of Plant Physiology.* - 1974. – Vol. 25. – P. 135–166.
17. Paszkowski, J. Direct gene transfer to plants / J. Paszkowski, R.D. Shillito, M. Saul, V. Mandak, T. Hohn, B. Hohn, I. Potrykus // *EMBO J.* - 1984. – Vol. 3. – P. 2717–2722.
18. Pelletier, G. Intergeneric cytoplasmic hybridization in *Cruciferae* by protoplast fusion / G. Pelletier, C. Primard, F. Vedel, P. Chetrit, R. Remy, P. Rouselle, M. Renard // *Mol. Gen. Genet.* - 1983. – Vol. 191. - P. 244-250.
19. Smith, R.H. *Plant Tissue Culture. Techniques and Experiments* / R.H. Smith. Elsevier, 2013. - 188 pp.
20. Блажевич, О.В. *Культивирование клеток: Курс лекций* / О.В. Блажевич – Мн.: БГУ, 2004. – 78 с.
21. Бутенко, Р.Г. *Биология клеток высших растений in vitro и биотехнология на их основе* / Р.Г. Бутенко - М: ФБК-ПРЕСС, 1999. – 152 с.
22. Дитченко, Т.И. *Культура клеток, тканей и органов растений: Курс лекций.* Минск: БГУ, 2007. - 102 с.
23. Логвинова, Т.И. Изучение свойств штаммов дрожжей, в качестве микробиологических продуцентов кормового белка / Т.И. Логвинова [и др.] // *Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук.* - 2016. - № 12 (1). - С. 57–61.
24. Ручай, Н.С. *Технология микробного синтеза: электронный курс лекций для студентов специальности 1-48 02 01 «Биотехнология»* / Н.С. Ручай, И.А. Гребенчикова. – Минск: БГТУ, 2014. – 167 с.
25. Тимофеева, О.А. *Клональное микроразмножение растений: Учебно-методическое пособие* / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.

26. Троицкая, Е.В. Пути получения кормового белка методами биотехнологии / Е.В. Троицкая, И.В. Артамонов // Кормопроизводство, кормление сельскохозяйственных животных и технология кормов

Учебное издание

Воронина Анастасия Викторовна
Вишнякова Анастасия Васильевна
Комахин Роман Александрович
Монахос Сократ Григорьевич

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ САДОВЫХ КУЛЬТУР

Учебное пособие

Редактор С.Г. Монахос

Подписано к изданию 05.12.2023.

Объем данных 7,1 Мб.

Тираж 10 экз.

ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева
127434 Москва, ул. Тимирязевская, 49