

Л. В. Назаренко, Ю. И. Долгих, Н. В. Загоскина, Г. Н. Ралдугина

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

**УЧЕБНИК И ПРАКТИКУМ
ДЛЯ БАКАЛАВРИАТА И МАГИСТРАТУРЫ**

2-е издание, исправленное и дополненное

**Книга доступна в электронной библиотечной системе
biblio-online.ru**

Москва ■ Юрайт ■ 2019

УДК 663.1(075.8)

ББК 28я73

Н19

Авторы:

Назаренко Людмила Владимировна — доцент, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии, экологии и методики обучения биологии Института математики, информатики и естественных наук Московского городского педагогического университета;

Долгих Юлия Ивановна — доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН;

Загоскина Наталья Викторовна — доктор биологических наук, профессор, академик РАН, ведущий научный сотрудник Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН, руководитель группы фенольного метаболизма растений;

Ралдугина Галина Николаевна — кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН.

Рецензент:

Гончарук Е. А. — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН.

Н19 **Биотехнология растений** : учебник и практикум для бакалавриата и магистратуры / Л. В. Назаренко, Ю. И. Долгих, Н. В. Загоскина, Г. Н. Ралдугина. — 2-е изд., испр. и доп. — М. : Издательство Юрайт, 2019. — 161 с. — (Серия : Университеты России).

ISBN 978-5-534-05619-8

Серия «Университеты России» позволит высшим учебным заведениям нашей страны использовать в образовательном процессе издания (в том числе учебники и учебные пособия по различным дисциплинам), подготовленные преподавателями лучших университетов России и впервые опубликованные в издательствах университетов. Все представленные в этой серии работы прошли экспертную оценку учебно-методического отдела издательства и публикуются в оригинальной редакции.

В настоящем учебнике раскрыты современные представления об одном из важных разделов биологии — биотехнологии растений. Описаны базовые принципы и методы клеточной и генной инженерии высших растений, основы криосохранения. Рассматриваются особенности вторичной дифференцировки у культур растений, способы культивирования клеток растений *in vitro*, методы получения каллусных и суспензионных культур. Излагаются основные этапы истории развития биологии культивируемых клеток растений. Помимо теоретической части, в учебнике содержится лабораторный практикум, который поможет освоить навыки проведения биотехнологических работ.

Соответствует актуальным требованиям Федерального государственного образовательного стандарта высшего образования.

Для студентов, магистрантов и аспирантов высших учебных заведений, а также для всех специалистов, интересующихся биотехнологией растений.

УДК 663.1(075.8)

ББК 28я73



Delphi Law Company

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав. Правовую поддержку издательства обеспечивает юридическая компания «Дельфи».

© Назаренко Л. В., Долгих Ю. И., Загоскина Н. В., Ралдугина Г. Н., 2009

© Назаренко Л. В., Долгих Ю. И., Загоскина Н. В., Ралдугина Г. Н., 2017, с изменениями

© ООО «Издательство Юрайт», 2019

ISBN 978-5-534-05619-8

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Культуры клеток и тканей высших растений.....	8
История развития метода культур клеток и тканей растений.....	8
Получение клеточных культур высших растений и их свойства.....	11
Вторичная дифференцировка, морфогенез и регенерация растений.....	16
Регуляция морфогенеза	20
Генетическая изменчивость клеток <i>in vitro</i>	26
Соматоклональная изменчивость.....	31
Клеточная селекция	41
Способы отбора устойчивых клеток.....	47
Сохранение отселектированных признаков в ряду поколений.....	50
Контрольные вопросы и задания.....	52
Глава 2. Генетическая инженерия растений	54
Создание трансгенных растений.....	55
Ферменты, используемые в генетической инженерии.....	60
Конструирование рекомбинантных ДНК.....	63
Получение генов	66
Введение в клетку чужеродной ДНК	67
Перенос ДНК с помощью агробактерий.....	69
Отбор трансформированных регенерантов.....	71
Доказательство трансгенности трансформированных растений	71
Экспрессия интродуцированных генов.....	72
Наследование трансгенов.....	76
Фенотипическая стабильность трансгенных растений.....	78
Биобезопасность генетически модифицированных организмов.....	79
Перспективы генной инженерии	83
Трансгеноз и законодательство	84
Контрольные вопросы и задания.....	88
Глава 3. Вторичные соединения растений и их образование в условиях <i>in vitro</i>	89
Основные классы вторичных соединений	89
Культуры <i>in vitro</i> — продуценты вторичных соединений	95
Контрольные вопросы и задания.....	99
Глава 4. Криосохранение и его применение к клеточным культурам растений.....	100
Контрольные вопросы и задания.....	107

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ

Основы проведения биотехнологических работ	111
Основные правила техники безопасности	126
Лабораторная работа № 1. Получение каллусной ткани из листьев табака	128
Лабораторная работа № 2. Получение каллусов из незрелых зародышей и узлов кущения пшеницы	131
Лабораторная работа № 3. Получение каллусов из корешков фасоли.....	132
Лабораторная работа № 4. Субкультивирование каллусов	133
Лабораторная работа № 5. Получение и культивирование суспензии	135
Лабораторная работа № 6. Определение плотности суспензионной культуры и оценка ее ростовой активности.....	137
Лабораторная работа № 7. Определение степени агрегированности и жизнеспособности суспензии	139
Лабораторная работа № 8. Высев суспензионной культуры на твердую агаризованную среду.....	140
Лабораторная работа № 9. Индукция органогенеза в каллусной ткани картофеля	141
Лабораторная работа № 10. Изолирование и культивирование апикальных меристем картофеля	143
Лабораторная работа № 11. Клональное микроразмножение картофеля путем черенкования побегов.....	146
Лабораторная работа № 12. Получение микроклубней картофеля <i>in vitro</i>	148
Лабораторная работа № 13. Получение безвирусного посадочного материала методом термотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем	150
Лабораторная работа № 14. Выделение изолированных протопластов	152
Литература	153
Новые издания по дисциплине «Биотехнология растений» и смежным дисциплинам	155
Словарь терминов	156

Введение

Биотехнология — это научная дисциплина, находящаяся на грани биологии и техники. Она также является сферой практики, направленной на изменение окружающей человека природной среды в соответствии с его потребностями. Часто биотехнологию представляют как комплекс методов и приемов для получения полезных для человека продуктов с помощью биологических агентов (живых организмов, тканей и клеток).

Современная биотехнология получила свое развитие в последней трети XX века, когда были достигнуты значительные успехи в биохимии, молекулярной генетике и молекулярной биологии. Все это создало реальные предпосылки управления жизнедеятельностью клеток и, как следствие, послужило мощным стимулом практического использования фундаментальных исследований в практических целях. Таким образом, можно утверждать, что биотехнология является наиболее ярким примером того, как результаты, казалось бы «чистой науки», находят применение в практической деятельности человека.

Одним из важных разделов биотехнологии **является биотехнология растений**, основанная на использовании культивируемых в пробирке (*in vitro*) органов, тканей, клеток и изолированных протопластов растений для производства различных продуктов.

В биотехнологии растений можно выделить несколько основных направлений.

Первое связано со **способностью культивируемых клеток синтезировать широкий спектр веществ вторичного метаболизма**. К ним относятся алкалоиды, стероиды, терпены, фенольные соединения, гликозиды и некоторые другие вещества, которые находят применение в медицине, парфюмерной и пищевой промышленности. Производство вторичных метаболитов в культуре *in vitro* позволяет получать экологически чистые продукты в строго контролируемых условиях, экономить природное сырье (растения), осуществлять круглогодичное и крупномасштабное производство.

Второе направление — это использование органов, тканей и клеток растений для размножения и оздоровления ценного посадочного материала. Оно получило название **клонального микроразмножения** и связано со способностью изолированных клеток переходить к дифференциации, давать начало стеблевым побегам или соматическим зародышам и формировать целое растение. Высокий коэффициент раз-

множения, освобождение от грибковой, бактериальной и вирусной инфекции обусловили важное народнохозяйственное значение этой технологии. В настоящее время производство элитного посадочного материала картофеля, овощей, плодовых и цветочных культур не обходится без этапа клонального микроразмножения и оздоровления *in vitro*.

Третьим направлением является использование клеточных технологий в селекционной работе. Так, **опыление и оплодотворение в условиях *in vitro*** помогают в ряде случаев избежать несовместимости партнеров, выбранных для гибридизации. **Культура семяпочек и зародышей** спасает гибридные растения в тех случаях, когда зародыш не получает достаточного питания или не снабжается гормональными факторами, находясь на материнском растении. Инициация культуры тканей и растений-регенерантов от проростков, гибнущих на ранних стадиях развития, дает возможность сохранить ценные комбинации генов гибридов. **Соматическая изменчивость и индуцированный мутагенез** в культуре тканей растений в сочетании с клеточной селекцией и регенерацией растений из измененных клеток позволяют повысить генетическое разнообразие исходного материала для создания новых сортов. **Получение гаплоидных и дигаплоидных растений** при культивировании молодых клеток пыльцы или семяпочек облегчает отбор рецессивных мутаций, значительно ускоряет выведение чистых линий на основе ценных гибридов. **Соматическая гибридизация**, основанная на слиянии изолированных протопластов, дает уникальные сочетания не только ядерных геномов родителей, но и геномов митохондрий и хлоропластов. При гибридизации протопластов диких видов растений с протопластами родственных культурных растений удастся передать последним признаки устойчивости к болезням и неблагоприятным факторам окружающей среды.

Четвертым направлением биотехнологии является **криосохранение** растительного материала: семян, меристем, культивируемых клеток. Глубокое их замораживание при температуре минус 196°C, когда все процессы жизнедеятельности останавливаются, позволяет поддерживать в неизменном виде ценные штаммы культивируемых тканей-продуцентов экономически важных веществ, элитные сорта и уникальные гибриды, сохранять семена редких и исчезающих видов растений.

Современное развитие биотехнологии немыслимо без **генетической инженерии**, использующей различные свойства клеток, например способность к синтезу разнообразных веществ, и заставляющих биологические молекулы, такие как ДНК и белки, работать на достижение целей, поставленных человеком. Перенос генов, контролирующих полезные признаки, в перспективе должен обеспечить направленное изменение растений. Помимо прикладного значения генетическая инженерия играет очень большую роль в изучении функции отдельных генов и их значения в регуляции биологических процессов.

Все это подчеркивает важное значение биотехнологии растений не только как фундаментальной науки, но и важной составляющей многих прикладных работ, столь необходимых для сохранения биоразнообразия растительного царства на нашей планете, а также для поддержания жизни всего человечества.

В результате изучения данного курса студенты будут:

знать

- историю развития биологии культивируемых клеток растений;
- получение культур клеток и их свойства;
- основы генетической инженерии растений;
- вторичные соединения растений и их образование в условиях *in vitro*;
- криосохранение и его применение к клеточным культурам растений;

уметь

- правильно подбирать ферменты для конструирования векторных плазмид;
- оценивать степень риска при использовании трансгенных организмов;
- применять технологии выращивания культур клеток;
- использовать методы криосохранения живых организмов;

владеть

- навыками проведения биотехнологических работ;
- способами культивирования клеток растений *in vitro*;
- методами получения каллусных и суспензионных культур;
- механическим методом для получения изолированных протопластов.

Глава 1

КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

История развития метода культур клеток и тканей растений

Первые попытки выращивания кусочков растений в искусственных условиях предпринимались еще в конце XIX века. Немецкие ученые Фехтинг, Рехингер и Хаберландт культивировали изолированные из растений кусочки тканей (экспланты) на растворах сахарозы. Экспланты некоторое время оставались живыми, но растущей культуры тогда получить не удалось. В дальнейшем интерес к выращиванию клеток растений на питательных средах в стеклянных колбах или чашках (в стекле — *in vitro*) возникал неоднократно. Однако многочисленные усилия исследователей не привели к удачному подбору состава питательной среды, пригодной для выращивания изолированных тканей. Первый успех определила не удачно выбранная питательная среда, а удобный для выращивания в условиях *in vitro* объект. Только в 1932—1934 гг., когда Готре во Франции ввел в культуру камбиальные ткани древесных растений и паренхиму мясистых корней и клубней, а Уайт в США разработал методы длительного выращивания в пересадочной культуре корневой меристемы, началось развитие методов культуры тканей растений. В течение последующих 20 лет их последователи ввели в культуру *in vitro* десятки видов растений.

В это же время были разработаны составы питательных сред и изучено значение их отдельных компонентов для поддержания роста тканей растений. Большое значение имело открытие американскими учеными Скугом и Миллером в 1955 г. нового класса стимуляторов роста растений — цитокининов. Полученный этими исследователями в результате щелочного гидролиза ДНК животного происхождения кинетин (β -фурфурил-аминопурин) оказался способным в комбинации с β -индолил-3-уксусной кислотой (ИУК) стимулировать деление клеток сердцевинной паренхимы табака, лишенной проводящих пучков и камбия. В последующих работах было показано, что, добавляя в питательную среду ауксины и цитокинины в разных соотношениях, можно стимулировать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани или индуцировать морфогенез.

Конец 50-х и 60-е годы XX века ознаменовались рядом блестящих открытий, существенно расширивших круг методов культуры тканей. Скугом была показана возможность регенерации растений в культуре изолированных клеток табака. Затем независимо друг от друга Бутенко в СССР, Рейнерт в Германии и Стюард с соавторами в США индуцировали в суспензии моркови соматический эмбриогенез и получили растения-регенеранты. В 1960 г. в Англии Кокинг разработал метод выделения изолированных протопластов из тканей растений путем обработки их смесью целлюлитических и пектолитических ферментов. Были подобраны условия для слияния протопластов с помощью полиэтиленгликоля с последующим восстановлением клеточной стенки и способности к делению. Так было положено начало развитию технологии соматической гибридизации. В этот же период был разработан метод культуры меристем (Моррель, 1959 г., Бутенко, 1960, 1964 гг.), позволяющий быстро и с высоким коэффициентом размножать растения. Оказалось, что растения, полученные из меристем, в ряде случаев свободны от вирусных инфекций. В 1967 г. Бутенко на женьшене и диоскореи и Стаба на наперстянке, тоже независимо друг от друга, показали, что лекарственные растения, введенные в культуру *in vitro*, способны к синтезу специфических вторичных соединений. Были получены суспензионные клеточные культуры многих видов растений, что позволило в дальнейшем перейти к крупномасштабному выращиванию клеток-продуцентов в специальных аппаратах — биореакторах. Открытие индийскими учеными Гуха и Магешвари в 1964 г. индукции андрогенеза при культивировании изолированных пыльников легло в основу технологии получения гаплоидов и дигаплоидов.

На протяжении 70-х годов было открыто явление соматической изменчивости, разработаны методы индуцированного мутагенеза и клеточной селекции, имеющие большую важность для использования культур клеток при создании новых сортов сельскохозяйственных растений.

С 80-х годов начинается развитие методов генетической инженерии. В 1983 г. были опубликованы первые работы по получению трансгенных растений табака, содержащих в качестве чужеродных генов селективные маркеры устойчивости к антибиотикам и гены-репортеры. Это были чисто научные модели. Однако уже через три года начали проводиться первые полевые испытания сельскохозяйственных трансгенных растений, а спустя десять лет генетическая инженерия растений решительно заявила о себе, предложив рынку десятки экономически важных трансгенных растений.

Современное развитие биотехнологии связано с изучением биологии культивируемых клеток на молекулярном уровне. Основное внимание уделяется механизмам регуляции морфогенеза, генетической изменчивости. Одновременно ведется усовершенствование для достижения прикладных целей культивирования клеток, полученные результаты внедряются в сельское хозяйство и медицину.

В нашей стране инициатором и на протяжении многих лет куратором изучения культивируемых клеток растений была Р. Г. Бутенко. Так, в начале 60-х годов она поддержала цитогенетические исследования тканевых культур, которые позволили сформулировать ряд приоритетных представлений о генетической гетерогенности клеточных популяций и растений-регенерантов. Ею вместе с Н. А. Загорской и З. Б. Шаминой было впервые описано явление соматической изменчивости. В 70-е годы Р. Г. Бутенко и Ю. Ю. Глеба начали исследования по слиянию протопластов и получению соматических гибридов. Вместе с А. А. Кучко она получила первый в мире соматический гибрид дикого и культурного картофеля. Этот гибрид затем использовался в селекционных программах, так как от дикого вида он получил митохондриальные гены устойчивости к вирусам. Р. Г. Бутенко уделяла большое внимание практическому использованию культивируемых клеток. Под руководством ее ученицы Н. В. Катаевой были разработаны методы микроклонального размножения более 10 сельскохозяйственных и декоративных видов растений. А производство биологически активных соединений с помощью культивируемых клеток растений вышло на промышленный уровень.

На начальном этапе становления биотехнологии растений в России, работы по культуре клеток в основном проводились в Институте физиологии растений Академии наук СССР. Затем во многих институтах и университетах стали организовываться группы специалистов, занимающихся клетками и тканями растений в культуре *in vitro*. Многие из них проходили обучение и стажировку в ИФРе под руководством Р. Г. Бутенко и ее сотрудников. Во многих городах сформировались сильные научные школы биотехнологов. В Киеве под руководством Ю. Ю. Глебы были получены блестящие результаты по соматической гибридизации. В Иркутске К. З. Гамбургом и Н. И. Рекославской проведено исследование метаболизма ауксина в культивируемых тканях растений. В Новосибирске Л. А. Першиной выполнен ряд работ по отдаленной гибридизации злаковых растений с использованием метода эмбриокультуры. В Саратове под руководством В. С. Тырнова был детально изучен процесс получения гаплоидов. В С.-Петербурге в нескольких институтах начались исследования по морфогенезу и клеточной селекции. В Алматы создана комплексная биотехнологическая программа селекции злаков. Практически во всех научных центрах сейчас ведутся работы по генетической инженерии растений. Лаборатории биотехнологии появились и во многих прикладных институтах страны. Благодаря внедрению методов культуры тканей в селекцию были созданы новые сорта ячменя, риса, пшеницы, картофеля, моркови, малины и кормовых трав. Биотехнологию изучают во всех биологических и сельскохозяйственных вузах.

Таким образом, за 50 лет своего развития биология культивируемых клеток растений прошла огромный путь от первых исследований — создания системы «культуры клеток растений» до понимания мощного потенциала этой системы и создания на основе фундаментальных достижений нового направления — «Биотехнологии растений».

Получение клеточных культур высших растений и их свойства

Важные для практики технологии *in vitro* разработаны с использованием объектов разной сложности организации, начиная с изолированных протопластов и кончая изолированными органами или зародышами. Однако во всех случаях центральная роль принадлежит культивируемым клеткам. Основным представителем культивируемых в условиях *in vitro* растительных клеток является каллус.

Каллусной тканью, или **каллусом** называют ткань, возникшую путем неорганизованной пролиферации клеток растений. В свою очередь, **пролиферация** это новообразование клеток и тканей путем размножения.

Для получения каллуса фрагменты тканей разных органов растений, называемые **эксплантами**, помещают на искусственную питательную среду в пробирки, колбы или чашки Петри. Процесс получения и культивирования каллуса требует абсолютной асептики. Экспланты обрабатывают различными стерилизующими растворами, содержащими чаще всего активный хлор или ртуть (гипохлориты, сулема, диацид), к которым для лучшего смачивания добавлены детергенты. Питательные среды и посуду перед использованием стерилизуют горячим паром в автоклавах. Соединения, разрушающиеся при высокой температуре, стерилизуют путем фильтрации через специальные фильтры, размер пор которых не превышает 0,2 мкм.

В состав питательных сред входят основные элементы, необходимые для поддержания жизни растений: калий, кальций, азот, магний, фосфор, сера, а также микроэлементы: железо, цинк, бор, медь, марганец, кобальт и другие (в виде солей). Поскольку культивируемые клетки не способны к фотосинтезу, то в питательные среды добавляют углеводы, чаще всего сахарозу или глюкозу, являющиеся источниками энергии. Каллусные клетки нуждаются также в витаминах.

Таблица 1.1

Состав стандартных питательных сред для культивирования клеток растений

Компоненты сред	Концентрация в среде (мг/л)				
	Мура-сиге и Скуга	Гамборга и Эвелега (B5)	Уайта	Нича и Нич	N6
KNO ₃	1900	2500	80	950	2830
NH ₄ NO ₃	1650	—	—	720	—
Ca(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	—	—	208	—	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	134	—	—	463
MgSO ₄ × 7H ₂ O	370	250	750	185	185
CaCl ₂ × 2H ₂ O	440	150	—	189	165

Компоненты сред	Концентрация в среде (мг/л)				
	Мура- сиге и Скуга	Гамборга и Эвелега (B5)	Уайта	Нича и Нич	N6
KCl	—	—	65	—	—
KH ₂ PO ₄	170	—	12	68	400
NaH ₂ PO ₄	—	130	16,5	—	—
Na ₂ SO ₄			200		
MnSO ₄ × 4H ₂ O	22,3	13,2	5	25	4,4
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,6	2	3	10	1,5
H ₃ BO ₄	6,2	3	1,5	10	1,6
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025	0,025	0,01	0,025	—
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,25	0,25	0,001	0,25	—
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025	0,025	—	—	—
KJ	0,83	0,75	0,75	—	0,8
FeSO ₄ × 7H ₂ O	27,85	27,85	4,6	27,85	27,85
Na ₂ EDTA × 2H ₂ O	37,3	37,3	—	37,3	37,3
Мезоинозит	100	100	—	100	100
Тиамин хлорид	0,1	10	—	1	1
Пиридоксин-хлорид	0,5	1	—	0,5	0,5
Никотиновая кис- лота	0,5	1	—	0,5	0,5
Сахароза	30000	20000	20000	30000	30000
Агар-агар	7000	7000	7000	7000	7000

Потребность клеток в азоте удовлетворяется за счет введения в состав среды гидролизата казеина или отдельных аминокислот. Очень важным компонентом питательных сред являются природные фитогормоны (ИУК, ИМК, зеатин) или синтетические регуляторы роста с гормональной активностью: ауксиновой-нафтилуксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д) или цитокининовой-бензиламинопурин (БАП), кинетин и др.

Разработано несколько вариантов стандартных питательных сред (табл. 1.1). Среда Мурасиге — Скуга является наиболее универсальной. Она используется для культивирования клеток многих видов растений. Среда Гамборга-Эвелега (B5) дает хорошие результаты при культивировании тканей бобовых, а среда N6 — злаковых растений. Среда Уайта применяется для укоренения и выращивания побегов после

регенерации растений. Среда Нича и Нич рекомендуется для индукции андрогенеза в культуре пыльников. Иногда в состав питательных сред включают различные растительные экстракты, например, картофельный экстракт или кокосовое молоко. Для придания средам плотности добавляют агар-агар или агарозу.

Клетки растений чувствительны к условиям культивирования. Оптимальным для их роста режимом является температура $26 \pm 1^\circ\text{C}$ и влажность 70%.

Известно, что клетки интактного растения дифференцированы. Они предназначены для выполнения определенной функции. Большинство специализированных клеток утрачивает способность к делению. Для превращения в каллусные клетки ткани растения должны пройти **дедифференциацию**, т.е. потерять характерные для них структуры и свойства и вернуться к состоянию делящейся клетки. Этот процесс происходит под действием фитогормонов или регуляторов роста, содержащихся в питательной среде. При образовании каллусных тканей большая часть генов, экспрессирующихся в дифференцированных клетках экспланта, перестает работать, и активируются другие гены, ответственные за деление, растяжение и синтез первичных метаболитов, так как быстрое размножение это основная функция каллусных клеток. Соответственно меняется и набор синтезируемых белков, ферментов, в результате чего метаболизм клеток существенно перестраивается. В первую очередь они теряют запасные вещества — липиды, крахмал. Фотосинтезирующие клетки теряют хлорофилл и липиды хлоропластов, но при этом возрастает количество амилопластов, перестраиваются эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и элементы цитоскелета. Все эти изменения предшествуют началу делений, которое в присутствии ауксина и цитокинина начинается через 48—72 часа после индукции каллусогенеза.

Ткань, образующаяся на питательной среде из клеток экспланта, называется **первичным каллусом**. Для поддержания его роста по мере истощения элементов питания часть каллуса периодически переносят на свежую питательную среду. Время между пересадками (**субкультивированиями**) варьирует в зависимости от скорости роста тканей от 3 до 6 недель. Каллус, постоянно поддерживаемый в культуре *in vitro*, называется **пассируемым**. Культивирование каллуса на твердой питательной среде называется **поверхностным**.

Суспензионные клеточные культуры это клетки растений, выращиваемые в жидкой питательной среде. Этот способ культивирования называется **глубинным**. Состав жидкой среды, как правило, такой же, как и твердой, но в этом случае агар в нее не добавляется. Для получения суспензионной культуры лучше использовать рыхлые каллусы, распадающиеся в жидкой среде на отдельные клетки и/или агрегаты, состоящие из 5—50 клеток. Суспензионные культуры выращивают в колбах при обязательном перемешивании на качалках, чтобы обеспечить нормальное снабжение клеток кислородом. Периодически часть суспензии (**инокулюм**) переносят в свежую питательную среду

для поддержания непрерывного роста. Клетки в жидкой питательной среде размножаются обычно быстрее, чем на твердой, поэтому промежуток времени между пересадками сокращается до 2—3 недель.

При работе с суспензионными культурами можно применять методы, разработанные для культивирования микроорганизмов: получение клонов из одиночных клеток, использование селективных сред, выращивание больших масс клеток в специальных аппаратах — биореакторах. Поэтому клеточные суспензии широко используются при изучении различных физиологических процессов, при отборе мутантов, а также для производства биологически активных веществ.

Характер роста культивируемых клеток и их состояние оценивают по доле живых клеток, скорости роста и активности клеточных делений. **Жизнеспособность** клеток определяют под микроскопом с использованием специальных красителей, например, метиленовой синей, феносафранина, эозина и др. Краситель не проникает в живые клетки, сохранившие целостность плазматической мембраны, поэтому окрашиваются только мертвые клетки.

Рост культур оценивают по увеличению сырой или сухой массы ткани в цикле выращивания или по увеличению числа клеток в 1 мл. Последний показатель чаще используют для суспензионных культур. Рост тканей складывается из деления и растяжения клеток. В культуре *in vitro* он описывается **S-образной кривой** (рис. 1.1).

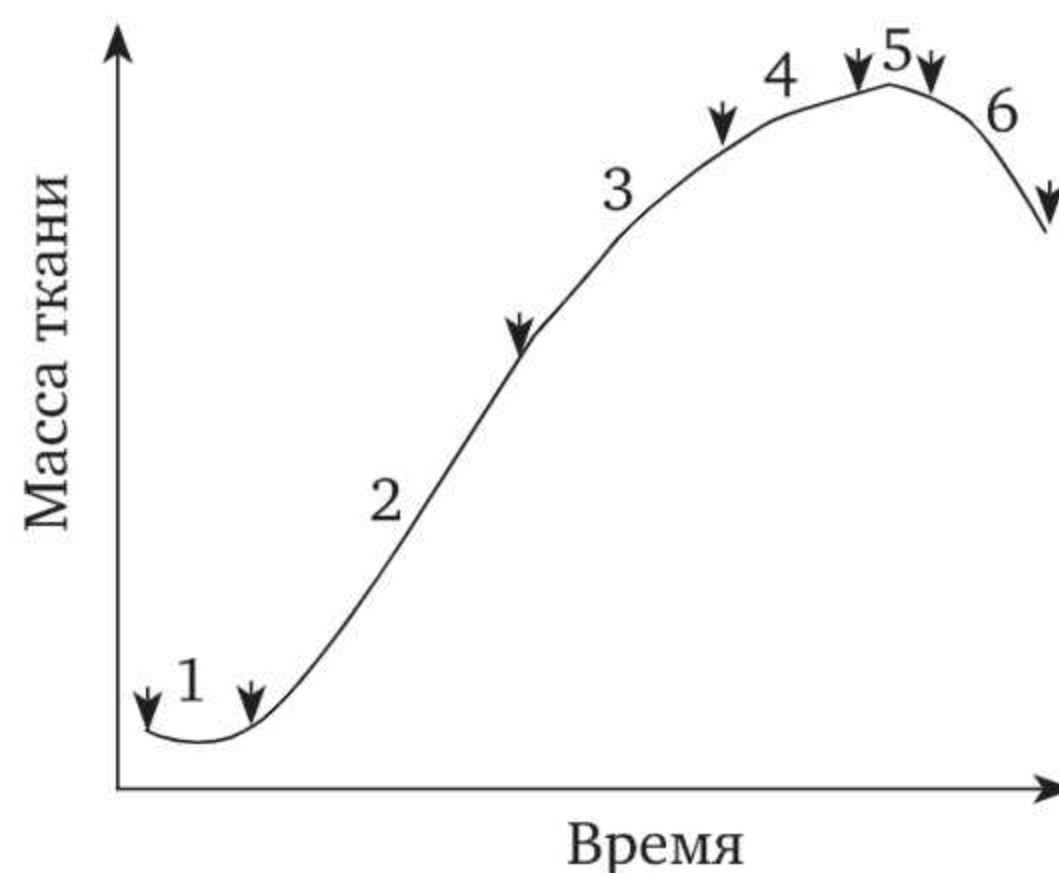


Рис. 1.1. Модельная кривая роста культивируемой ткани.

Фазы роста: 1 — латентная; 2 — логарифмическая; 3 — линейная; 4 — замедления роста; 5 — стационарная; 6 — деградации

Весь цикл роста принято делить на несколько фаз: **латентная** (лаг-фаза), где видимый рост не наблюдается; **экспоненциальная**, где рост идет с ускорением; **линейная**, где скорость роста постоянна; **фаза замедления роста**, **стационарная фаза**, во время которой масса ткани и число клеток не меняются и **фаза деградации**, сопровождающаяся гибелью клеток. В зависимости от вида растения, используемого экспланта, состава питательной среды или условий выращивания продолжительность отдельных фаз ростового цикла может изменяться.

Для характеристики активности деления используют показатель называемый **митотическим индексом**. Это доля клеток, находящихся в данный момент времени в фазе митоза. Определяют митотический индекс под микроскопом на давленных препаратах или срезах тканей, окрашенных ацетоорсеином или ацетокармином, как процент делящихся клеток от их общего числа.

Митотическая активность клеток максимальна в экспоненциальной фазе роста, затем она понижается (рис. 1.2). В зависимости от вида растения кривая митотического индекса может иметь один или два максимума. Первая волна делений клеток вызвана их переносом на свежую питательную среду. Вторая связана с повторным вступлением клеток в митоз или с наличием двух субпопуляций клеток, имеющих разную продолжительность клеточного цикла. Культивируемые клетки размножаются несинхронно, поэтому в каждый конкретный момент времени доля делящихся клеток не превышает 5%. Ближе к концу клеточного цикла деления почти прекращаются и увеличение массы ткани идет, главным образом, за счет растяжения клеток и накопления продуктов биосинтеза.

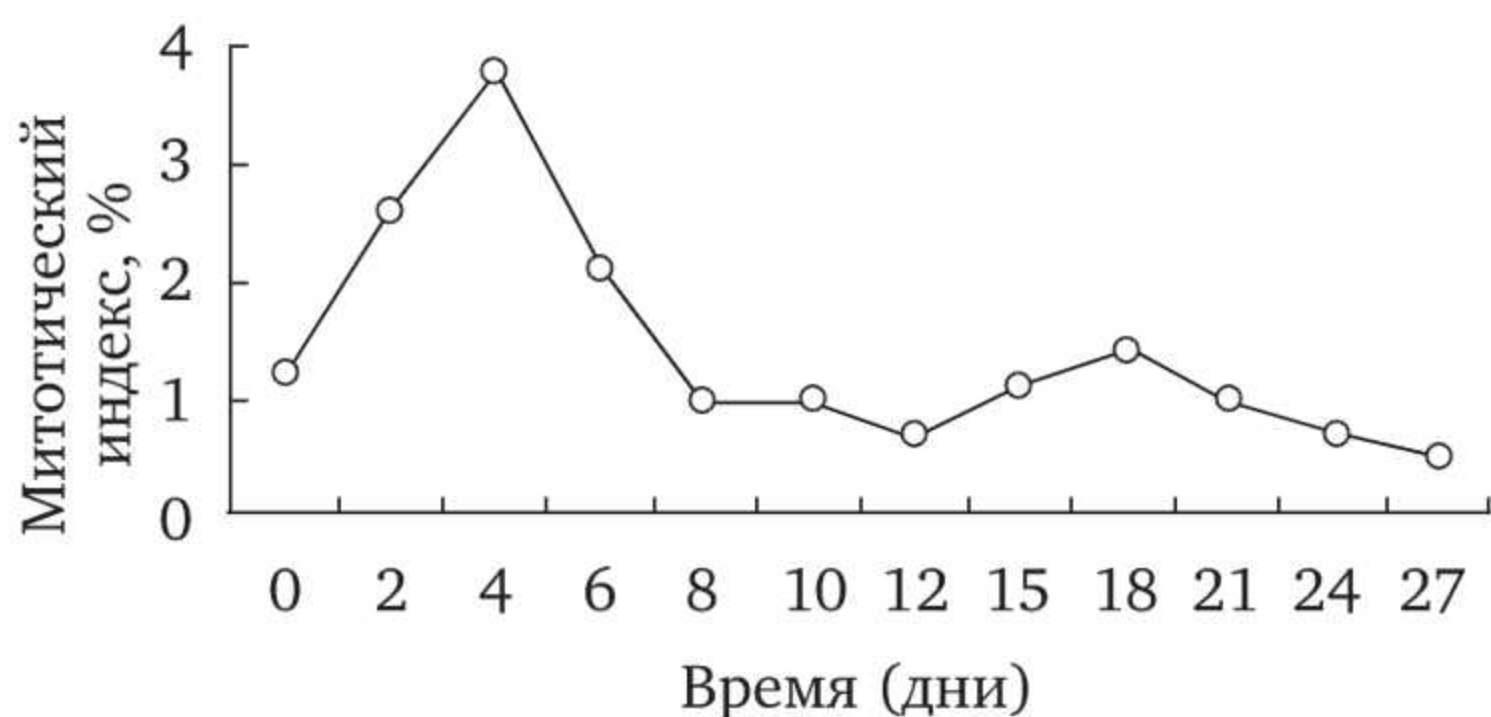


Рис. 1.2. Модельная кривая митотической активности клеток в цикле выращивания

Лаг-фазу определяют как процесс адаптации клеточной популяции к новым условиям роста. Ее длительность зависит от количества и физиологического состояния инокулята, а также состава питательной среды, газового режима и условий перемешивания. В этот период различные штаммы культур клеток способны активно изменять начальный рН питательной среды в диапазоне от 3,5—6,5 до некоторого оптимального для каждой культуры клеток значения. В лаг-фазе наблюдается высокая интенсивность дыхания, энергетический уровень клетки достигает максимума, интенсивно синтезируется ДНК, РНК, белки и другие компоненты клетки. Митотический индекс в это время еще низок.

В экспоненциальной (логарифмической) фазе митотическая активность клеточной популяции достигает максимальных величин. В этот период преобладают мелкие клетки меристематического типа; рН культуральной жидкости в период экспоненциального роста, как правило, ниже, чем в другие ростовые фазы.

Снижение частоты митозов свидетельствует о переходе клеточной популяции в фазу линейного, а затем замедленного роста. Это связано с недостатком питательных веществ и (или) ингибированием продуктами обмена. Начинается процесс растяжения и вакуолизации клеток. При замедлении роста уровень дыхания снижается. Часть клеток переходит в дифференцированное состояние. В этой фазе наблюдается увеличение синтеза вторичных веществ.

В следующей затем стационарной фазе скорость деградации клеток еще мала и может быть уравновешена делениями клеток. Поэтому масса и число клеток почти не изменяются. Продлению стационарной фазы может способствовать отсутствие лимитации по углеводному питанию, температурный оптимум, соответствующий газовый режим и др.

В фазе отмирания или деградации культуры число гибнущих клеток превышает количество вновь возникающих, поэтому общая масса ткани уменьшается.

Вторичная дифференцировка, морфогенез и регенерация растений

Клетки растений, выращенные вне организма, обладают уникальной способностью не только делиться, образуя неорганизованно растущую массу, но и переходить к вторичной дифференцировке, давая начало элементам сосудистой системы, зачаткам органов или зародышеподобным структурам, которые в дальнейшем развиваются в целое растение.

Свойство изолированных клеток полностью реализовать свой потенциал развития с образованием нового организма называется **тотипотентностью**.

Совокупность процессов дифференцировки клеток с образованием специализированных органов и тканей объединяется понятием **морфогенез в культуре *in vitro***.

Способность культивируемых тканей растений к морфогенезу (**регенерационная способность**) определяет развитие таких клеточных технологий как клональное микроразмножение, производство гаплоидов и дигаплоидов, эмбриокультура, соматическая гибридизация, клеточная селекция и генетическая инженерия. Низкая регенерационная способность многих линий и сортов является основным препятствием к широкому использованию культур клеток в биотехнологии.

Основным фактором, вызывающим переход неорганизованно размножающейся клетки к морфогенезу, является изменение набора или количества гормональных факторов в питательной среде. Наряду с гормонами на индукцию морфогенеза влияют сахара, отдельные аминокислоты и другие трофические вещества. Имеют значение также интенсивность и качество освещения, температура, аэрация и другие физические факторы.

Различают несколько видов морфогенеза: гистогенез, органогенез и соматический эмбриогенез. **Гистогенез**, или гистологическая дифференциация каллусных клеток, это образование в каллусе различ-

ных тканей: элементов сосудистой системы, млечников, волокон, трихом. **Органогенез** — это дифференциация каллусных клеток в целые органы. В зависимости от типа образующихся органов различают **гемогенез** — образование почек, **ризогенез** — закладку зачатков корней и **флоральный морфогенез** — формирование цветковой меристемы. **Соматический эмбриогенез** — это образование в каллусной или суспензионной культуре **эмбриоидов** — зародышеподобных структур, способных развиваться во взрослое растение.

При органогенезе образуются **монополярные** структуры, т.е. стебель, корень или зачаток цветка (рис. 1.3). Началом процесса органогенеза является изменение типа деления в отдельной клетке или небольшой группе клеток. При неорганизованном типе размножения после деления наблюдается увеличение размера клетки, и только после достижения определенного размера одна или обе дочерние клетки приступают к следующему делению. Клетка, которая впоследствии даст начало зачаткам органов, делится по другому типу, напоминая дробление зиготы. Деления быстро следуют одно за другим, группа мелких клеток, сначала окруженных общей оболочкой, потом свободных, образует меристематический очаг, в котором закладывается зачаток корня или стеблевого апекса (рис. 1.4).

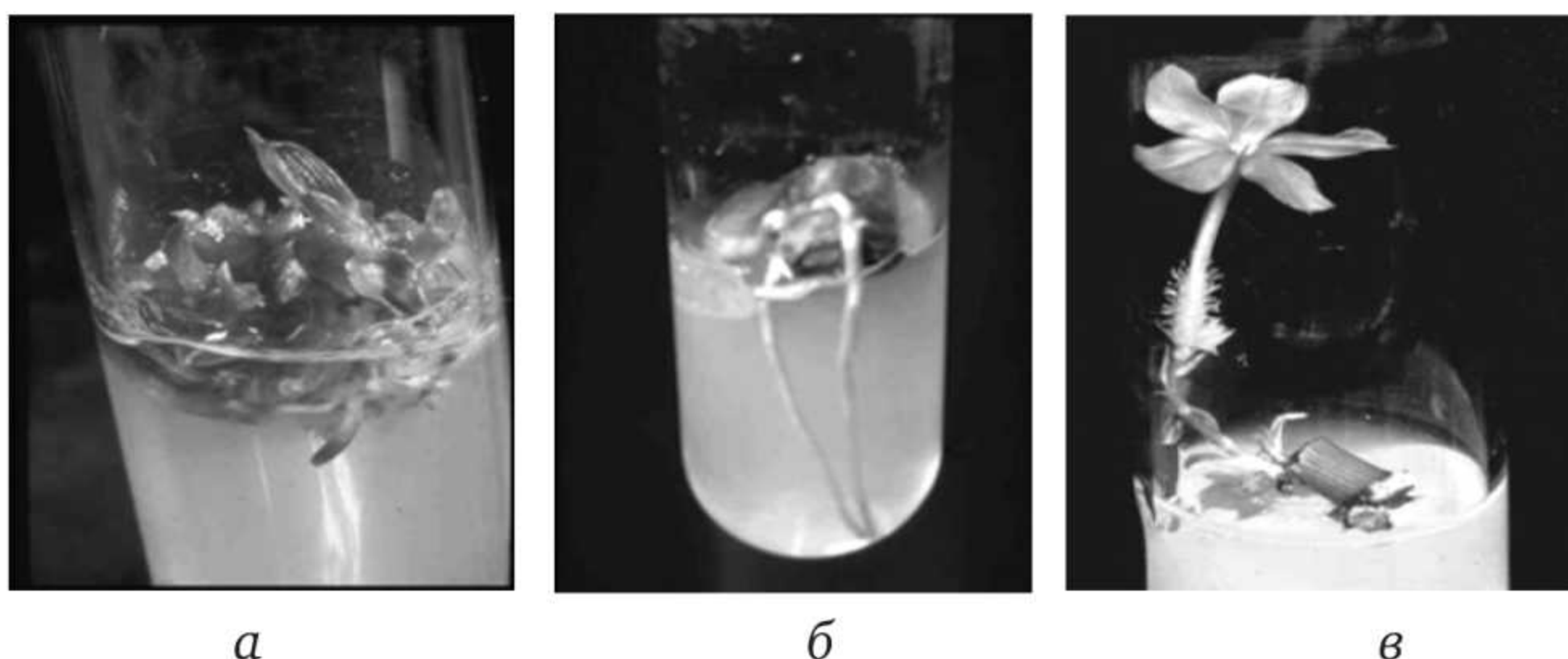


Рис. 1.3. Виды органогенеза:

а — образование побегов, б — образование корней, в — флоральный морфогенез

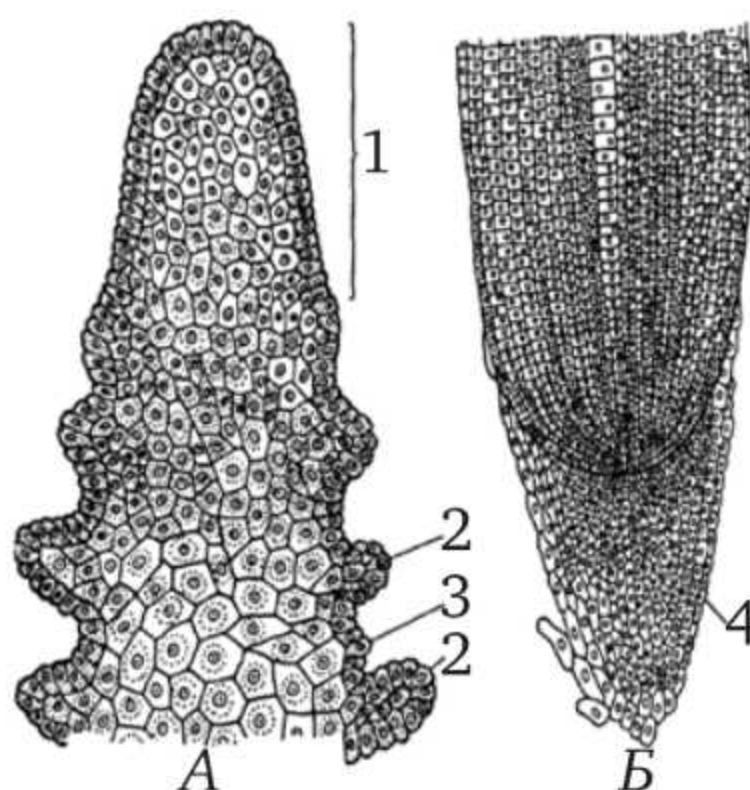


Рис. 1.4. Верхушечная меристема побега (А) и корня (Б):

1 — конус нарастания; 2 — зачатки листьев; 3 — зачаток боковой почки;
4 — чехлик, покрывающий меристематическую верхушку корня

Исследование клетки в процессе перехода к морфогенезу и во время ранних этапов развития структур с помощью цитохимических, радиоавтографических и электронно-микроскопических методов показало, что в таких клетках усиливается синтез нуклеиновых кислот, белков и перестраиваются субклеточные структуры. Большая центральная вакуоль превращается в мелкие вакуоли, беспорядочно расположенные в цитоплазме, значительно увеличивается число рибосом и активируется аппарат белкового синтеза, увеличивается число и изменяется структура митохондрий, происходит перестройка цитоскелета клетки. При формировании организованных структур происходит усиление межклеточных связей, что подтверждается увеличением числа плазмодесм, связывающих соседние клетки. Одновременно усиливается внутриклеточный и межклеточный транспорт веществ.

В исследованиях Скуга и его сотрудников, выполненных на каллусных тканях табака, была показана ключевая роль баланса ауксинов и цитокининов в индукции органогенеза. При равном содержании этих гормонов в питательной среде преобладает неорганизованный рост каллуса. Определенное превышение ауксина над цитокинином вызывает развитие корней, а обратное соотношение концентраций этих гормонов приводит к формированию почек и стеблевых побегов. В целом это положение оказалось верным при индукции органогенеза и для других видов растений, хотя конкретные концентрации и отношения гормонов могут варьировать. В качестве ауксинов для индукции органогенеза используют, как правило, НУК, ИУК или ИМК, а в качестве цитокининов — кинетин или БАП.

Чтобы регенерировать растение из морфогенного каллуса, сначала создают условия для образования стеблевых апексов и развития побегов, а затем переносят сформировавшиеся побеги на среду с преобладанием ауксина для развития корней. Таким образом, регенерация растений посредством органогенеза протекает как минимум в два этапа и требует смены питательной среды.

Одним из наиболее удивительных типов органогенеза в культуре тканей является образование не вегетативных почек, дающих начало стеблевым побегам, а цветочных почек — бутонов, из которых сразу или после образования одного-двух листочков появляются цветки.

При соматическом эмбриогенезе дифференциация культивируемых клеток приводит к образованию биполярной структуры — эмбриоида, в котором присутствуют одновременно зачатки и стебля, и корня. Начинается соматический эмбриогенез с обособления некоторых клеток. Их клеточная стенка утолщается, плазмодесменные каналы закрываются отложениями каллозы. В результате ряда делений таких клеток образуются компактные группы клеток с плотной цитоплазмой и мелкими вакуолями, называемые проэмбриогенными массами (ПЭМ). Из клеток ПЭМ образуются зародыши (рис. 1.5). Соматические эмбриониды проходят те же фазы развития, что и зиготические. Сначала формируется сферическая структура — глобулярный зародыш. Затем

у двудольных растений следует стадия сердцевидного эмбриоида, на которой идет закладка семядолей, и зародыш приобретает форму сердца. На стадии торпедовидного эмбриоида происходит развитие стеблевого и корневого апексов, зародыш вытягивается и переходит в стадию проростка (рис. 1.6). У однодольных растений морфологические и физиологические преобразования соматических эмбриоидов также повторяют фазы развития зиготического зародыша.

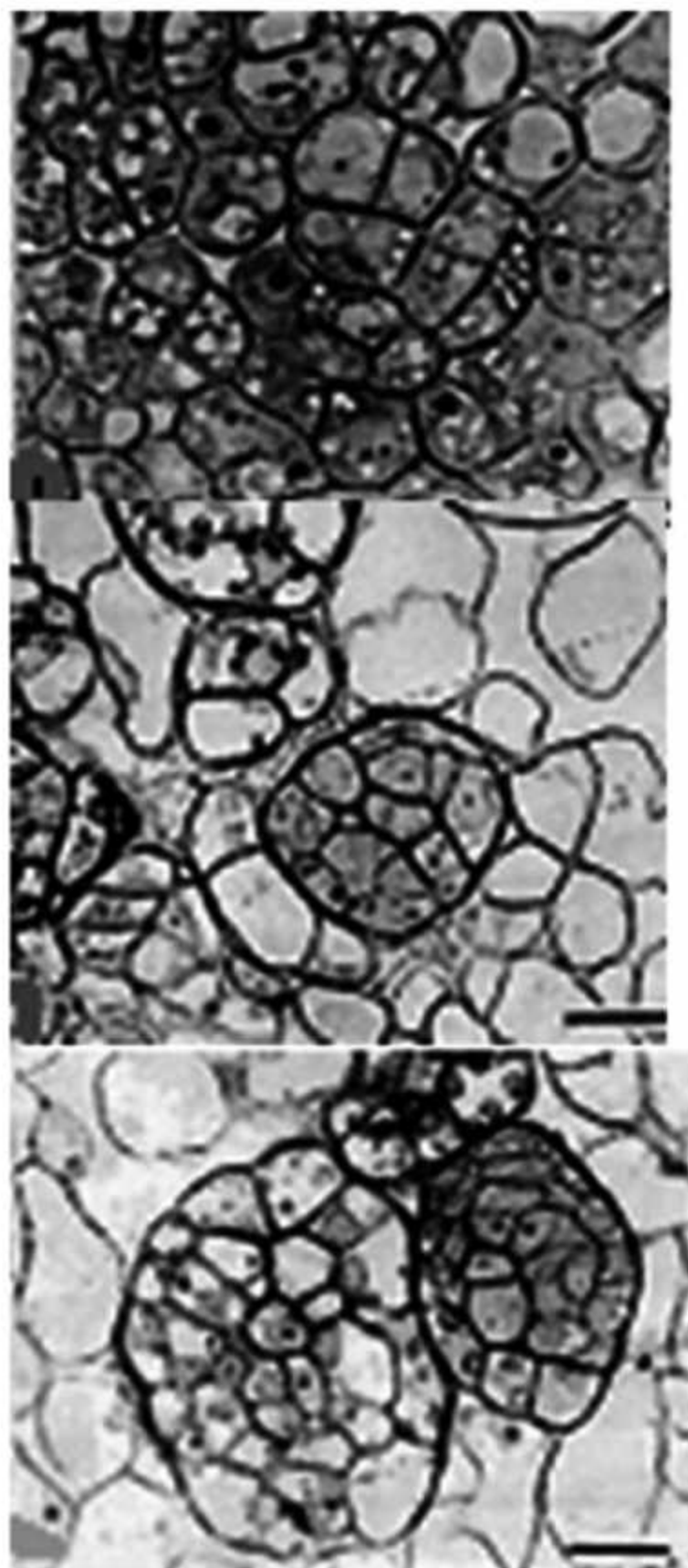


Рис. 1.5. Образование соматического зародыша из проэмбриогенных масс клеток

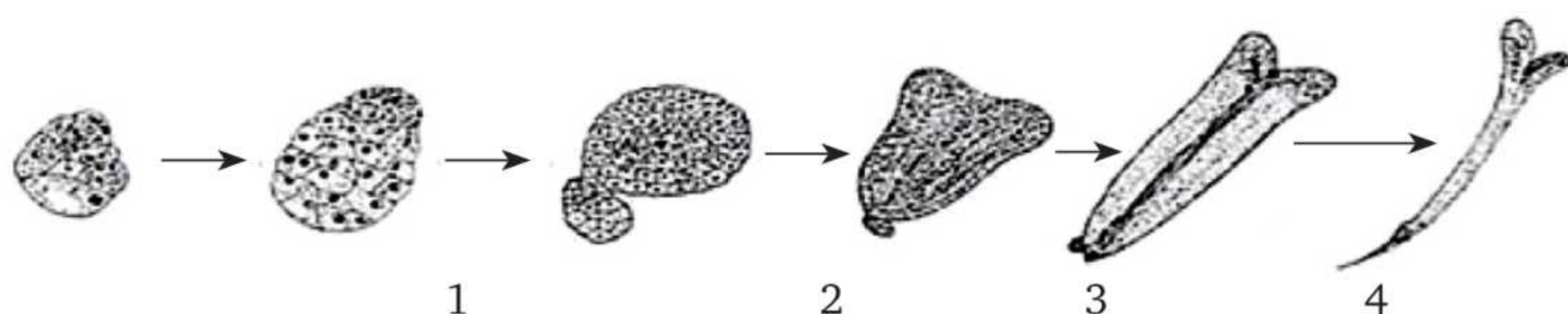


Рис. 1.6. Стадии развития у зародыша двудольных растений:

1 — глобула; 2 — «сердечко»; 3 — «торпедо»; 4 — проросток

Образование соматических эмбриоидов, как и формирование стеблевых и корневых апексов, зависит от гормонов, однако характер гормональной индукции неодинаков. Детерминация клеток по зароды-

шевому пути происходит под действием ауксина, при этом для большинства видов лучшим индуктором является 2,4-Д, а не ИУК или НУК. Присутствие 2,4-Д необходимо только до образования глобулы, дальнейшее развитие эмбриоида становится независимым от экзогенных регуляторов роста. Зародыш сам синтезирует необходимые гормоны. Присутствие в это время в среде 2,4-Д ингибирует развитие эмбриоидов, вызывает их вторичную дедифференцировку с образованием каллусных клеток. Для получения растений из соматических зародышей следует исключать 2,4-Д из среды после индукции эмбриогенеза или существенно уменьшать концентрацию ауксина. Цитокинины при соматическом эмбриогенезе не играют ключевой роли, хотя и используются у некоторых видов растений для стимуляции отдельных стадий развития зародышей.

Регуляция морфогенеза

Хотя теоретически все клетки растений являются тотипотентными, реально далеко не все культуры могут дать начало новым растениям. **Морфогенными** культурами принято считать такие каллусные линии, которые способны к клеточной дифференцировке и образованию сложных дифференцированных структур (корни, почки, соматические зародыши) (рис. 1.7). **Неморфогенными** считаются каллусные культуры, не образующие четко выраженных дифференцированных структур или органов, т.е. неспособные к морфогенезу (рис. 1.8). Как правило, большей способностью к морфогенезу обладают первичные каллусы. Длительное культивирование часто вызывает потерю регенерационного потенциала. Однако в определенных условиях культивирования клетки могут оставаться тотипотентными на протяжении нескольких лет. Например, известна каллусная линия гороха, из которой были получены растения после 15 лет культивирования *in vitro*.

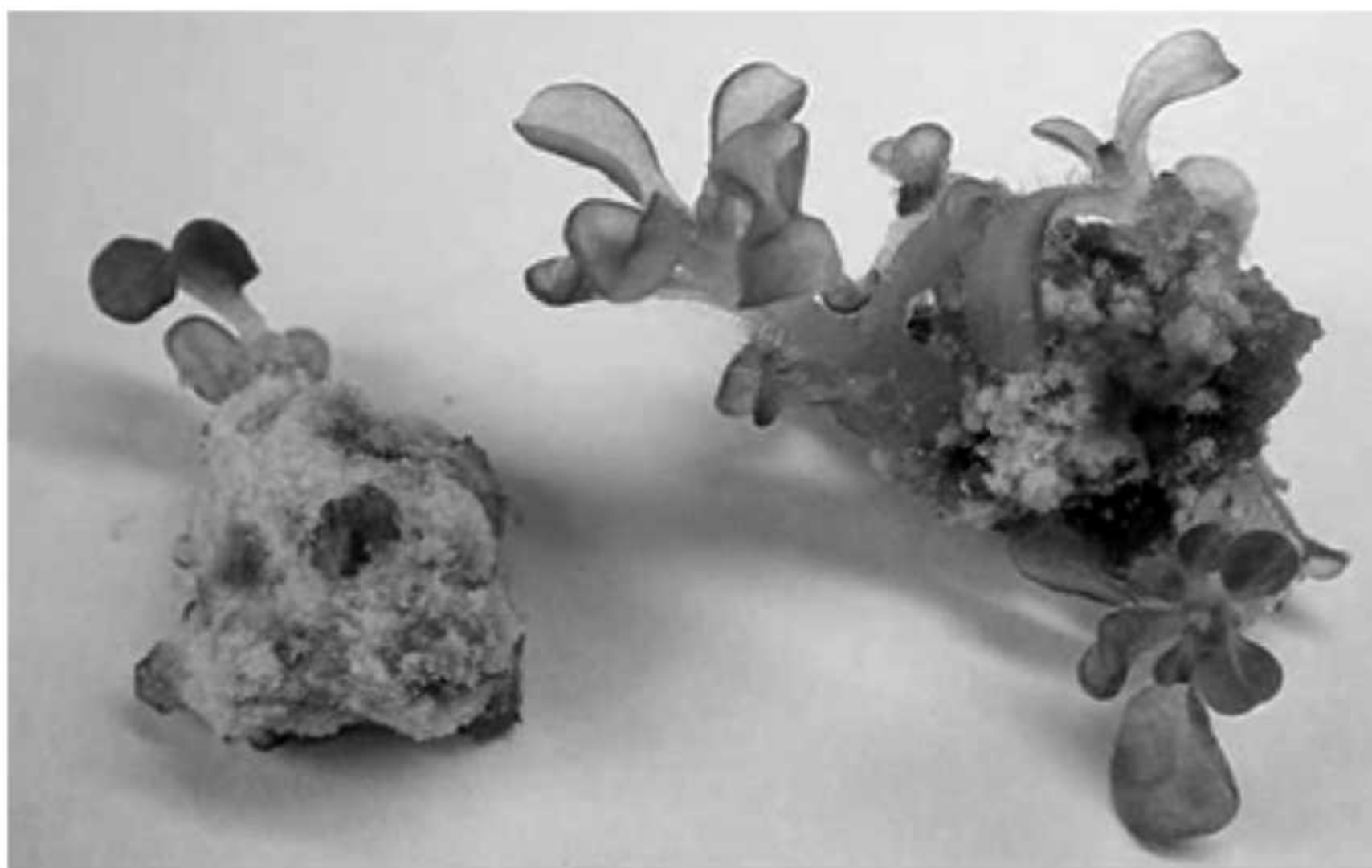


Рис. 1.7. Морфогенный каллус табака



Рис. 1.8. Каллус женьшеня, потерявший способность к морфогенезу

Способность культивируемых тканей к регенерации растений зависит от многих факторов:

- вид и сорт растения, ткани которого введены в культуру;
- орган или ткань, из которой получены экспланты;
- физиологическое состояние растения — донора эксплантов;
- состав питательной среды;
- условия культивирования и др.

Каждый вид растения требует своих условий для запуска программы морфогенеза. У одних растений морфогенный каллус образуется с высокой частотой, из любых органов, и регенерацию растений осуществить легко. Характерным примером таких «удобных» видов являются представители семейства пасленовых. Значительно труднее получить морфогенные культивируемые ткани у однодольных растений. В начале 70-х годов XX века существовало мнение, что злаковые вообще не образуют способный к регенерации каллус. Однако затем были подобраны условия, и сейчас злаковые растения активно используются в биотехнологических программах. По-видимому, тотипотентность характерна для всех видов, и вопрос только в подборе адекватных питательных сред и «стимулов» индукции морфогенеза.

В зависимости от систематического положения различается и способ регенерации растений из культивируемых клеток: для одних (табак) побеги образуются путем органогенеза, для других (однодольные) — преимущественно через соматический эмбриогенез.

Для получения способного к регенерации растений каллуса имеет значение состояние дифференцировки ткани экспланта. У некоторых видов растений каллус можно получить практически из любого органа, у других — только из определенных частей. Легче всего получить морфогенный каллус из молодых тканей растения, богатых меристематическими делящимися клетками: апикальных и пазушных меристем, незрелых зародышей, базальной части молодых листьев. У древесных растений эффективно использовать только молодые побеги. Успехи в культивировании тканей и регенерации растений у злаковых были получены благодаря использованию в качестве эксплантов незрелых зародышей или пыльников, в то время как дифференцированные клетки

листа не способны к дедифференцировке, а из клеток корня образуются только неморфогенные ткани. Зародыши некоторых видов, особенно злаковых, компетентны к образованию морфогенного каллуса только на определенной стадии развития.

На частоту образования морфогенного каллуса и регенерацию побегов влияют условия выращивания донорных растений: температура, влажность, условия освещения, минеральное питание.

Гормональная регуляция морфогенеза. Регенерационная способность культивируемых клеток в значительной степени зависит от состава питательной среды и, прежде всего, содержащихся в ней гормонов. Основными регуляторами роста каллуса и морфогенеза являются ауксины и цитокинины. Их роль в индукции органогенеза и соматического эмбриогенеза выше уже рассматривалась. Некоторые виды растений с готовностью откликаются на разные гормоны ауксинового ряда, например, морковь положительно реагирует на НУК, ИУК, 2,4-Д. Другие виды (злаковые и травы) чувствительны только к 2,4-Д. Реже используют такие ауксины как 2,4,5-трихлорфеноксиуксусная кислота (2,4,5-Т), пиклорам, 4-хлорфеноксиуксусная кислота, дикамба (3,6-дихлор-орто-анисовая кислота) и другие. Для многих культур требуется использование не одного, а нескольких ауксинов в одной среде. В качестве цитокининов для индукции морфогенеза чаще всего используют БАП в концентрации 0,1—5 мг/л. Для некоторых видов, например, хлопчатника, рекомендован тидиазурон — производное мочевины, обладающее цитокининовым действием. Эффективные концентрации гормонов лежат в пределах от 1 до 20 мкМ.

Кроме этих основных гормонов для индукции соматического эмбриогенеза используют гиббереллины — для ускорения созревания и прорастания соматического зародыша, и ингибитор роста — абсцизовую кислоту. Ее применяют в очень малых, неингибирующих концентрациях (0,1—1,0 мкМ) с целью предотвращения у соматических зародышей аномального развития семядолей, дополнительной пролиферации, вторичного соматического эмбриогенеза и преждевременного прорастания. В культуре тканей пшеницы, кукурузы, рапса АБК замедляла неорганизованный рост клеток и корнеобразование и стимулировала соматический эмбриогенез. Действие абсцизовой кислоты видо- и сортоспецифично: в одних случаях она усиливает соматический эмбриогенез, в других — ингибирует. Есть предположение, подкрепленное экспериментальными данными, что под действием экзогенной АБК снижается содержание эндогенной ИУК. Это, в свою очередь, вызывает изменение гормонального баланса, результатом чего становится изменение морфогенетической реакции клеток.

Явно ингибирующее действие на регенерационную способность культивируемых тканей оказывает этилен. Добавление в питательную среду для инициации каллуса предшественников этилена, например, 1-аминоциклопропанкарбоновой кислоты вызывало значительное уменьшение частоты образования эмбриогенного каллуса и сокраще-

ние числа полученных регенерантов. Включение в среду веществ, ингибирующих физиологическое действие этилена — норборнадиена или нитрата серебра, напротив, стимулировало образование эмбрионного каллуса и повышало эффективность регенерации у большинства испытанных генотипов на 15—20%.

Негормональная регуляция морфогенеза. Среди негормональных компонентов среды важным регулятором морфогенеза является сахароза. Концентрации ее в питательной среде, рекомендованные для регенерации растений, варьируют от 2 до 12%. В зависимости от концентрации сахарозы в одной и той же культуре могут быть индуцированы либо органогенез, либо соматический эмбриогенез. Показано, что сахароза влияет на накопление культивируемыми клетками цитокининов и ауксинов. С другой стороны, сахароза может действовать как осмотически активное вещество. Добавление в питательную среду других осмотиков (сахарозы, маннита, сорбита, полиэтиленгликоля, NaCl или KCl в низкой концентрации) ингибирует рост неморфогенного каллуса и стимулирует регенерацию растений. Возможно, частичное обезвоживание клеток в присутствии осмотиков индуцирует синтез АБК. В обоих случаях изменение концентрации сахарозы влияет на соотношение эндогенных гормонов, индуцируя различные морфогенетические реакции. Стимуляция соматического эмбриогенеза под действием осмотического стресса может иметь и другую интерпретацию: обезвоживание клеток вызывает частичный плазмолиз, что способствует изоляции клеток, индуцируя их к дифференцировке.

Большая роль в регуляции метаболизма отводится так называемым сигнальным молекулам, которые запускают каскад реакций, приводящих к изменению физиологического состояния клетки. В последнее время внимание исследователей все больше привлекают олигосахариды — фрагменты полисахаридов клеточной стенки растений или грибов. Вероятно, олигосахариды выполняют функции молекул-посредников в процессах межклеточной коммуникации, регулируя рост, развитие и выживание в неблагоприятных условиях. Биологически активные олигосахариды получили название **олигосахарины**.

Помимо состава питательной среды морфогенетический потенциал тканей *in vitro* во многом зависит от условий культивирования. Если рост недифференцированных клеток каллуса мало зависит от освещения, то для регенерации растений имеет значение не только наличие света, но и его спектральный состав. Например, у пшеницы незрелые зародыши, изолированные из растений, выращенных на синем свете, образовывали эмбрионный каллус значительно чаще, чем зародыши, взятые от растений, росших на белом или красном свете. Импульсное облучение изолированных зародышей после помещения их на питательную среду светом разного качества также влияло на частоту образования морфогенного каллуса.

Генетическая регуляция морфогенеза. К сожалению, не существует универсальных питательных сред и условий культивирования, которые

обеспечивали бы регенерацию растений из всех культур. Параметры, подобранные для одного вида или даже сорта оказываются неоптимальными для другого. Это ограничивает количество возможных объектов биотехнологии и вынуждает каждый раз заново подбирать условия регенерации растений. В одних и тех же условиях культивирования изолированные ткани разных сортов образуют морфогенный каллус с различной частотой. Например, у инбредных линий кукурузы доля зародышей, формирующих способный к регенерации растений каллус, варьировала в зависимости от генотипа от 0 до 80% (табл. 1.2).

Количество растений, которые можно получить от одного каллуса, также зависит от генотипа, при этом не всегда высокая частота каллусогенеза коррелирует с высокой частотой регенерации растений.

Гибриды от скрещивания между собой линий с высоким и с низким морфогенетическим потенциалом демонстрируют сверхдоминирование и доминирование высокой способности к морфогенезу или промежуточное наследование. Наследуемость способности к морфогенезу дает возможность проведения селекции по этому признаку. В результате последовательного скрещивания гибридов F с морфогенной родительской формой можно повысить регенерационный потенциал в 2—3 раза. Гибридизация практически ценных, но низкоморфогенных линий с высокоморфогенными позволяет вовлекать их в биотехнологические программы.

Таблица 1.2

Частота образования морфогенного каллуса незрелыми зародышами разных линий кукурузы

Линия	Доля зародышей с морфогенным каллусом, %	Линия	Доля зародышей с морфогенным каллусом, %
Гк26	0	346	27,9
F7	2,4	A619	39,6
W8	2,9	A344	64,5
Дк66	2,2	A188	76,9
F2	6,9	R91	81,5

В то же время в некоторых гибридных комбинациях наблюдается полное подавление геномом одного из родителей способности к соматическому эмбриогенезу у гибридов. Вероятно, такие линии содержат супрессор регенерационного процесса, который может передаваться потомству.

Иногда морфогенетическая способность гибридов зависит от того, какое растение было использовано в качестве материнской формы. Например, в комбинации линий кукурузы Дк66 и A188 частота образования эмбриогенного каллуса равнялась 24%, если Дк66 была материнской формой, и 50%, если отцовской. Регенерационный потенциал аллоплазматических гибридов пшеницы различался в зависимости от того, цитоплазму какого из родителей они содержали. Частота обра-

зования эмбрионного каллуса у фертильных линий кукурузы была выше, чем у линий с цитоплазматической мужской стерильностью, обусловленной генами митохондрий.

Значительные различия между генотипами по способности к морфогенезу *in vitro*, а также наследуемость этой способности указывают на существование генетической детерминации регенерационного потенциала. При этом весьма вероятно участие в регуляции морфогенеза не только ядерных генов, но и генов митохондрий.

Генетическая регуляция морфогенеза в настоящее время интенсивно изучается. Выявление ключевых генов, контролирующих компетентность клеток к регенерации растений, не только расширяет представления о механизмах дифференцировки клеток, но и дает возможность повышать морфогенетический потенциал методами генетической инженерии.

Для поиска генов, контролирующих процессы морфогенеза, и локализации их на генетических картах используют как классические генетические подходы, так и методы молекулярной генетики.

Гены, активирующиеся в процессе морфогенеза, можно условно разделить на несколько групп.

1. Гены, обеспечивающие активное деление клеток, необходимое для формирования меристематических очагов. Сюда относятся последовательности ДНК, контролирующие структуру хроматина; специфические факторы транскрипции и элонгации, усиливающие синтез определенных белков и т.п.

2. Гены ответа клеток на действие фитогормонов. Выявлен ряд генов, транскрипция которых начиналась под действием ауксина или цитокинина. Обнаружены последовательности, контролирующие уровень синтеза, рецепции, транспорта и разрушения этих гормонов. Преимущественно на поздних стадиях соматического эмбриогенеза под действием абсцизовой кислоты экспрессируются гены, кодирующие так называемые LEA (*late embryogenesis abundant*) белки, необходимые для перехода зародышей в торпедовидную стадию и дальнейшего созревания.

3. Гены, кодирующие ряд протеинкиназ, участвующих в сигнальных каскадах в процессе соматического эмбриогенеза.

4. Гены, кодирующие внеклеточные белки. Экспрессия этих генов играет важную роль как для индукции соматического эмбриогенеза, так и для развития соматических зародышей. Предполагается, что кодируемые данными генами выделяемые из клеток ферменты глюконазы и эндохитиназы могут участвовать в разрушении компонентов стенок клеток, окружающих формирующийся соматический зародыш, что способствует его полноценному питанию за счет клеточного окружения. Возможно также, что эти ферменты способствуют высвобождению из клеточных стенок сигнальных молекул, необходимых для развития эмбриоида. В частности, показано, что внеклеточные арабиногалакта-

новые белки являются сигнальными молекулами и участвуют в регуляции соматического эмбриогенеза на разных этапах.

Многообразие генов, так или иначе связанных с морфогенезом, свидетельствует о сложности и многоэтапности процесса регенерации растений из культивируемых *in vitro* клеток. Эта область исследований интенсивно развивается, и есть все основания надеяться, что в ближайшие годы генетические основы тотипотентности будут выяснены.

Таким образом, регенерация растений из культивируемых клеток зависит как от состояния самой клетки, детерминированного генотипом и называемого **компетентностью**, так и от внешних факторов. Компетентность клетки в значительной степени определяется количеством и соотношением эндогенных гормонов. Дифференцировка клеток в растения возможна при оптимальном сочетании внутренних и внешних регуляторов.

Генетическая изменчивость клеток *in vitro*

Гетерогенность культур клеток. Полученные от одного экспланта, помещенные в одинаковые условия температуры, влажности, освещенности, на одной и той же питательной среде, клетки в культуре, казалось бы, не должны различаться между собой. Но исследования показывают, что клеточные культуры гетерогенны (разнокачественны). В них наблюдаются морфологические и физиологические различия между клетками. Это проявляется на уровне формы и размера, числа ядер, степени вакуолизации, толщине стенок, активности метаболизма, способности к биосинтезу вторичных соединений. В культуре *in vitro* наряду с недифференцированными клетками присутствуют элементы сосудистой системы: трахеиды и ситовидные трубки и другие специализированные клетки. Клетки могут отличаться по продолжительности клеточного цикла, количеству запасных веществ и других продуктов вторичного метаболизма (рис. 1.9).

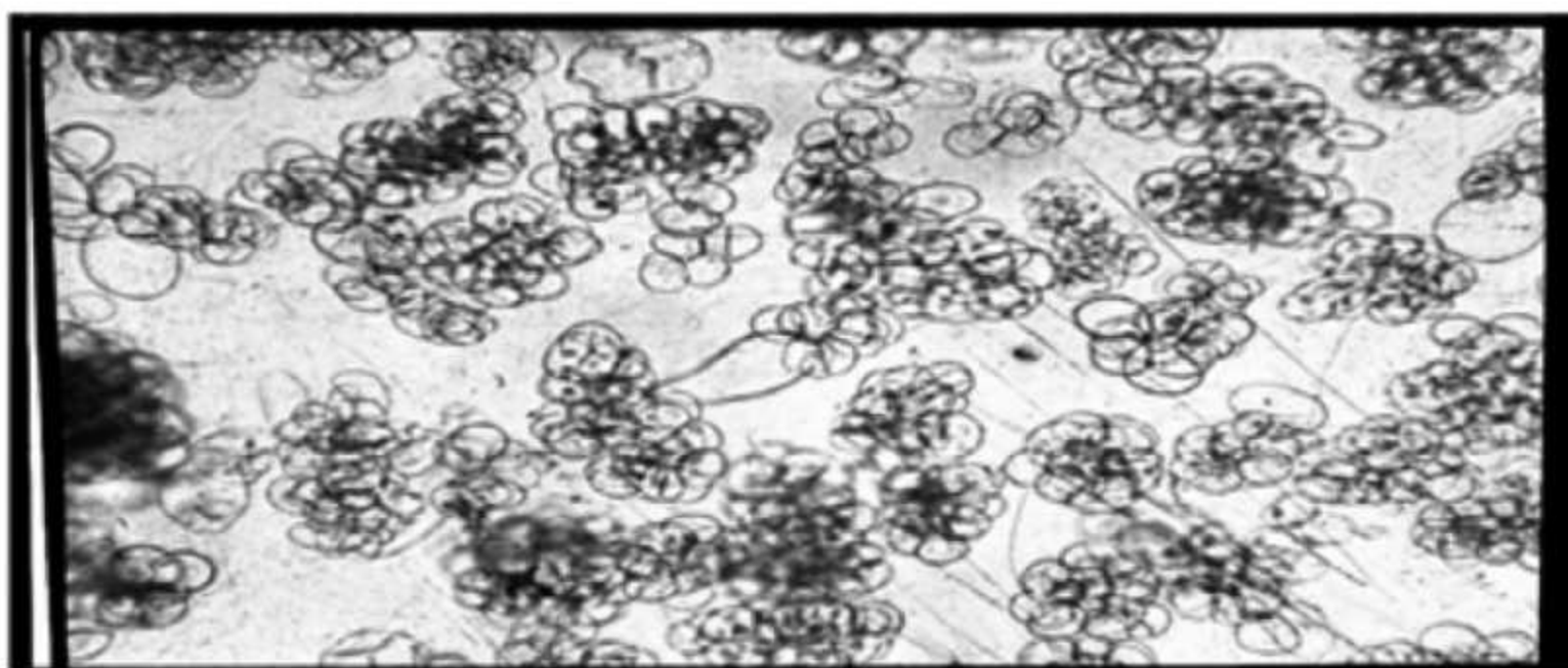


Рис. 1.9. Гетерогенность клеток в суспензионной культуре женьшеня

Перечисленные выше вариации сильно зависят от условий выращивания клеток и, как правило, не наследуются. Такие изменения, не затрагивающие генома, называются **модификациями**. Они помо-

гают клеткам адаптироваться при изменении условий выращивания. Но клетки в культуре *in vitro* могут быть неодинаковы и в генетическом отношении. Генетическая разнокачественность клеточных культур обусловлена изменениями на различных уровнях: **геномном, хромосомном** или **генном**. Геномная изменчивость подразумевает изменение числа хромосом, хромосомная — изменения структуры хромосом, а генная — **мутации** отдельных генов.

Вариации числа и структуры хромосом. Наиболее подробно исследованы геномная и хромосомная изменчивость культивируемых клеток растений. В процессе изолирования тканей из исходного растения нарушается гормональная регуляция, что приводит к аномалиям функционирования митотического аппарата. Из-за неправильного расхождения хромосом в митозе, задержки клеточного деления (цитокинеза) и других отклонений возникают полиплоидные (рис. 1.10) и анеуплоидные клетки (имеющие число хромосом, некратное гаплоидному набору), повышается частота хромосомных нарушений (аббераций) (рис. 1.11). Удвоение числа хромосом может быть результатом эндоредупликации генетического материала: клетки, находившиеся в исходном растении в G2 фазе, вместо митоза повторно вступают в S фазу. Затем такие клетки с удвоенным числом хромосом делятся и дают начало полиплоидным клонам. Другой причиной появления полиплоидных клеток является эндомитоз — процесс нерасхождения хромосом в анафазе из-за нарушения функции веретена деления.

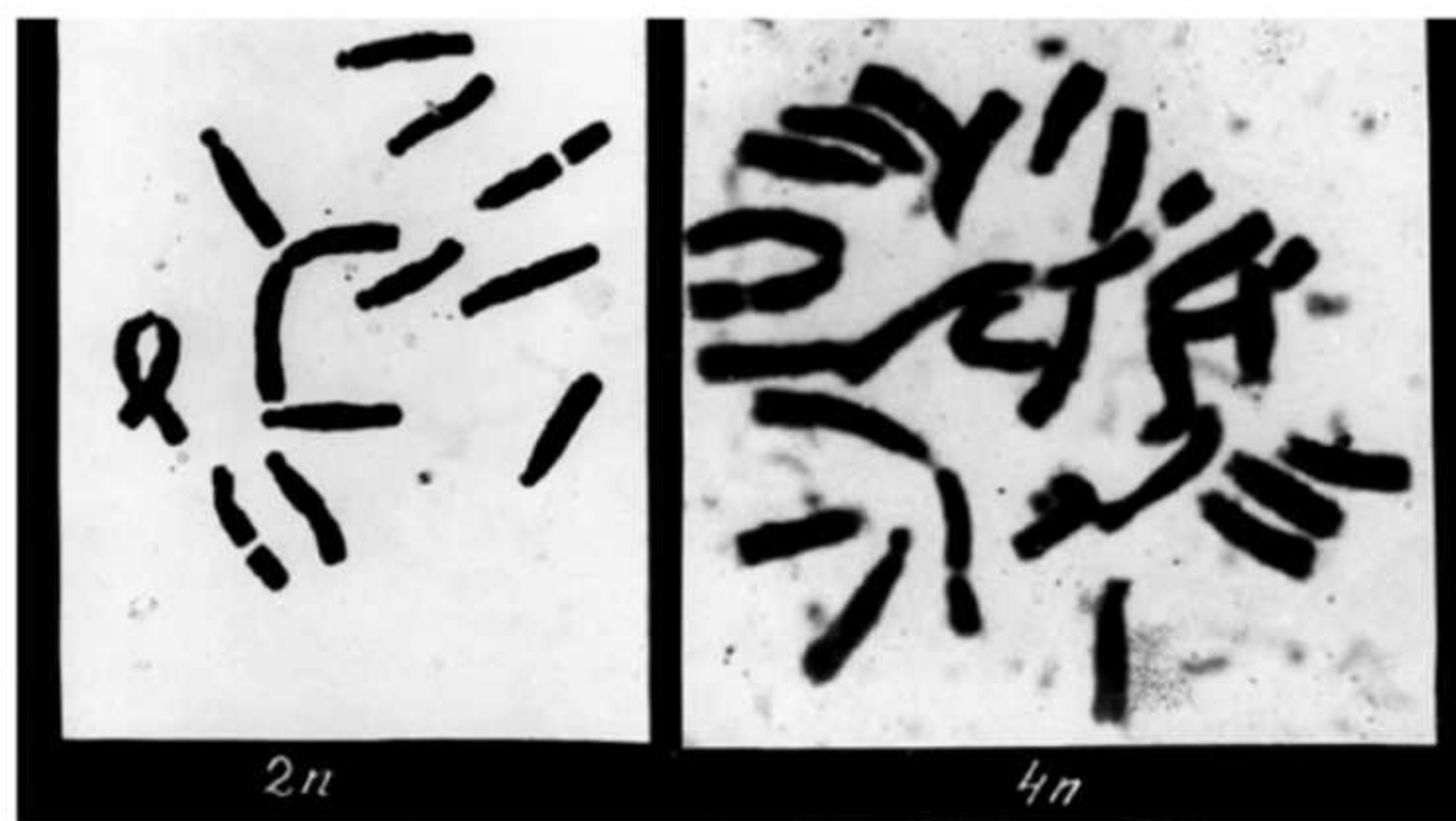


Рис. 1.10. Диплоидный и тетраплоидный набор хромосом в культивируемых *Crepis capillaries*

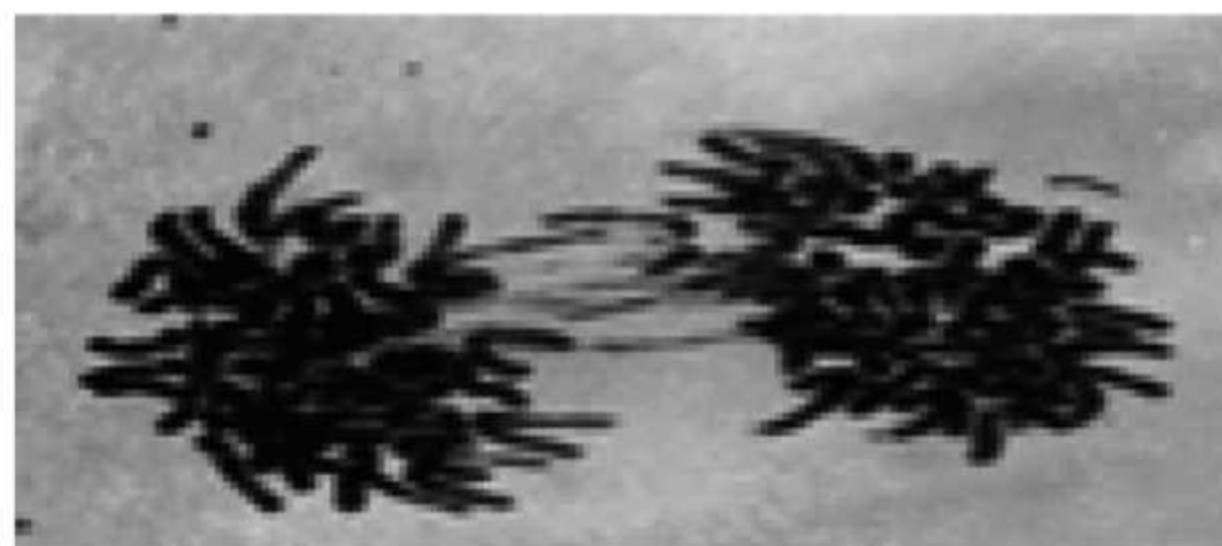


Рис. 1.11. Неправильное расхождение хромосом: образование «мостов»

Вариации числа хромосом регистрируются уже на ранних этапах культивирования. Например, в каллусах, производных от диплоидных клеток незрелых зародышей ячменя, а также мягкой и твердой пшениц, первые тетраплоидные клетки были обнаружены уже на третий-пятый дни после введения в культур), их частота в разных клеточных линиях составляла 1,6—8,7%. На восьмой день культивирования были обнаружены первые анеуплоидные метафазы. На примере каллусных культур, полученных из листовых дисков картофеля, показано, что удвоение числа хромосом происходит уже в первый день культивирования. По мере увеличения продолжительности культивирования доля полиплоидных клеток, как правило, возрастает. Иногда процесс полиплоидизации идет медленно, например, через 6 месяцев культивирования в каллусной культуре чеснока 90%, в каллусной культуре проса 76%, а в каллусной культуре ячменя 70% клеток оставались диплоидными. В других случаях число хромосом удваивалось быстро, так доля тетраплоидных метафаз в культурах пшеницы и ячменя могла достигать через 3—4 месяца 70—80% от общего числа проанализированных.

Значительно реже в процессе культивирования тканей происходит уменьшение числа хромосом. Тем не менее, явление **гаплоидизации** диплоидных эксплантов в культуре *in vitro* описано для фасоли и чеснока.

Наряду с изменением числа хромосом в культуре *in vitro* часто происходит модификация их структуры. Описаны потери (**делеции**), удвоение (**дупликации**) или поворот на 180° (**инверсии**) участков хромосом, перенос фрагмента одной хромосомы на другую (**транслокации**). Значительный прогресс в исследованиях хромосомной изменчивости был достигнут после разработки метода дифференциального окрашивания хроматина, позволяющего выделять суперспирализованные гетерохроматиновые участки хромосом. Расположение гетерохроматиновых блоков является характерным и устойчивым признаком, позволяющим идентифицировать отдельные хромосомы и регистрировать изменения их структуры (рис. 1.12).

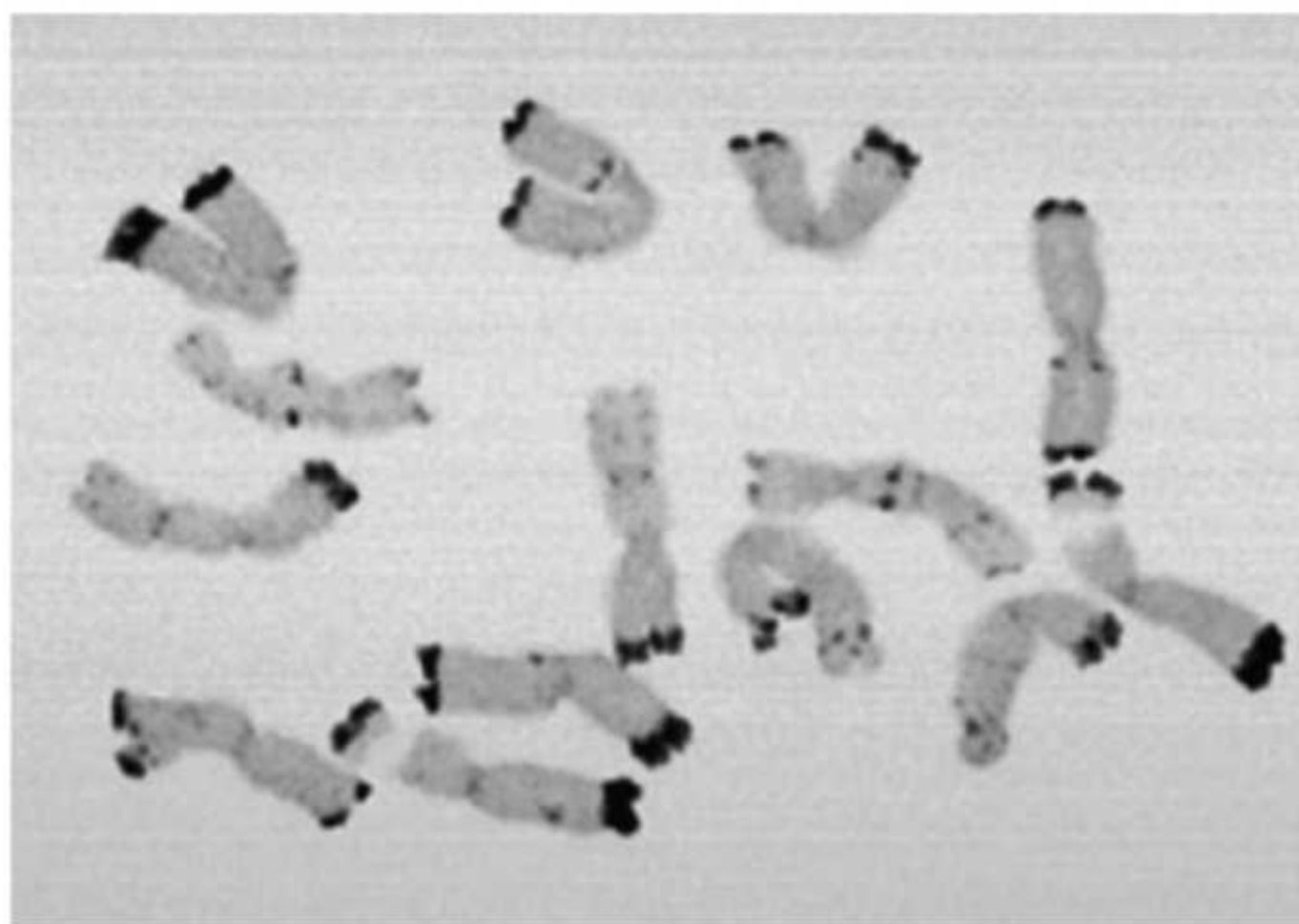


Рис. 1.12. Дифференциальная окраска хромосом

В динамике хромосомной изменчивости важная роль принадлежит частоте возникновения измененных кариотипов и их избирательной выживаемости в определенных условиях среды. Различия между клетками по числу хромосом отражаются в скорости их роста, устойчивости к неблагоприятным воздействиям и т.д., определяющим селективную ценность того или иного генотипа. В результате клетки с разным числом хромосом вступают в конкурентные взаимоотношения, что приводит к отбору наиболее приспособленных к данным условиям культивирования генотипов. В этом отношении культуры клеток растений подобны природным популяциям животных или растений, в них также возникают мутации, и действует естественный отбор. Поэтому культивируемые клетки иногда называют клеточными популяциями. Если начальный период культивирования клеток *in vitro* характеризуется повышением уровня геномной и хромосомной изменчивости, то при длительном культивировании наблюдается стабилизация клеточных популяций на определенном уровне ploидности (рис. 1.13).

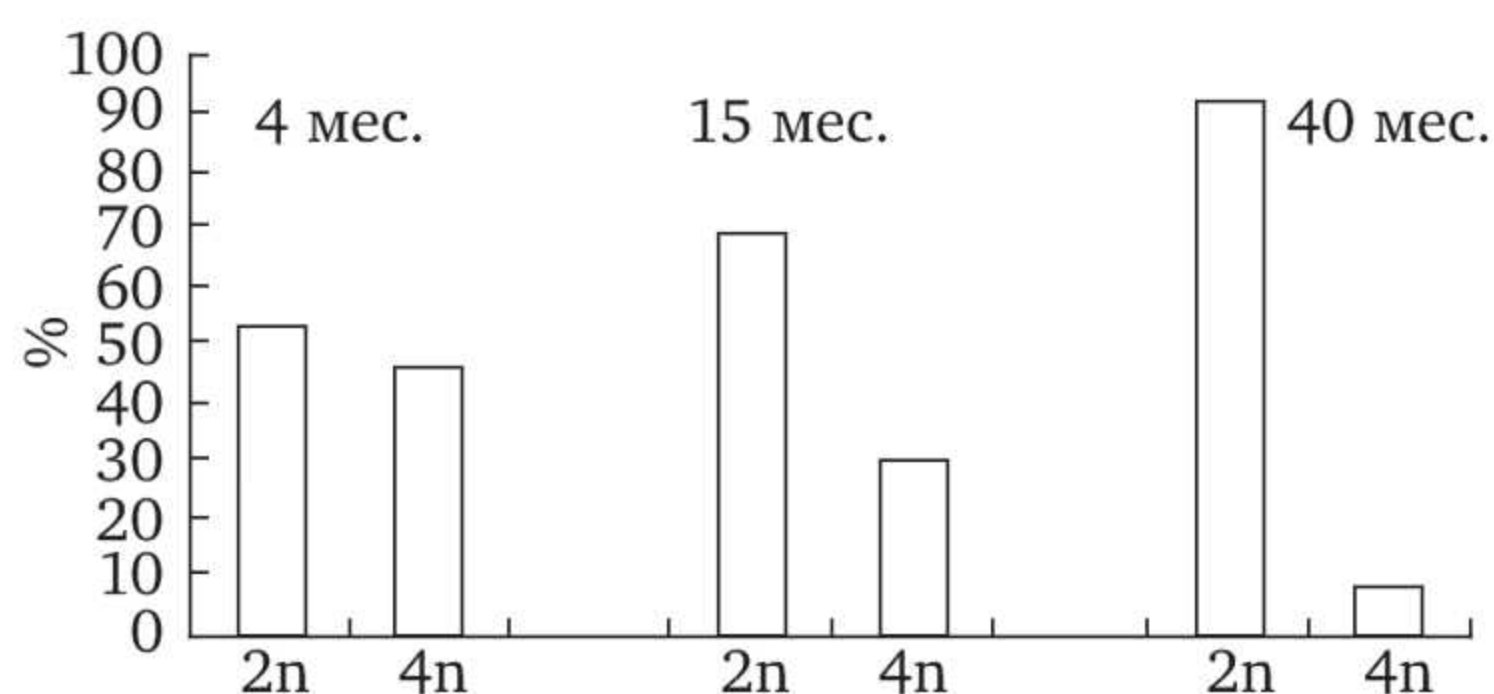


Рис. 1.13. Динамика изменения числа хромосом в клетках *Harporarpus gracilis* при длительном культивировании

Процесс преимущественного размножения клеток определенного генотипа получил название **автоселекции**. В процессе автоселекции формируется наиболее приспособленный к данным условиям кариотип или кариотипы. В качестве примера можно привести длительно пассируемую культуру клеток конских бобов. Первоначально она состояла из примерно равного количества диплоидных и тетраплоидных клеток. Однако скорость размножения диплоидных клеток была выше вследствие более короткой лаг-фазы. После 40 месяцев культивирования данной культуры диплоидные клетки почти полностью вытеснили тетраплоидные (рис. 1.14).

Иногда в стабилизированных популяциях присутствуют клетки в основном одного класса ploидности. Имеется достаточно примеров, когда полиплоидные и анеуплоидные клеточные линии постепенно превращаются в диплоидные. Но чаще культуры становятся стабильно разнородными, они содержат клетки разной ploидности, анеуплоидные, при этом соотношение метафаз с разным числом хромосом остается относительно постоянным. Такие популяции называют **миксоploидными**. Рекордсменом по стабильности миксоploидного состояния

является культура клеток женьшеня, поддерживаемая с 1960 г. и сохраняющая более 50 лет примерно одно и то же распределение клеток по числу хромосом. По-видимому, гетерогенность по числу хромосом предпочтительна для большинства клеточных популяций, так как она позволяет быстро реагировать на изменение условий преимущественным размножением наиболее приспособленного типа клеток.

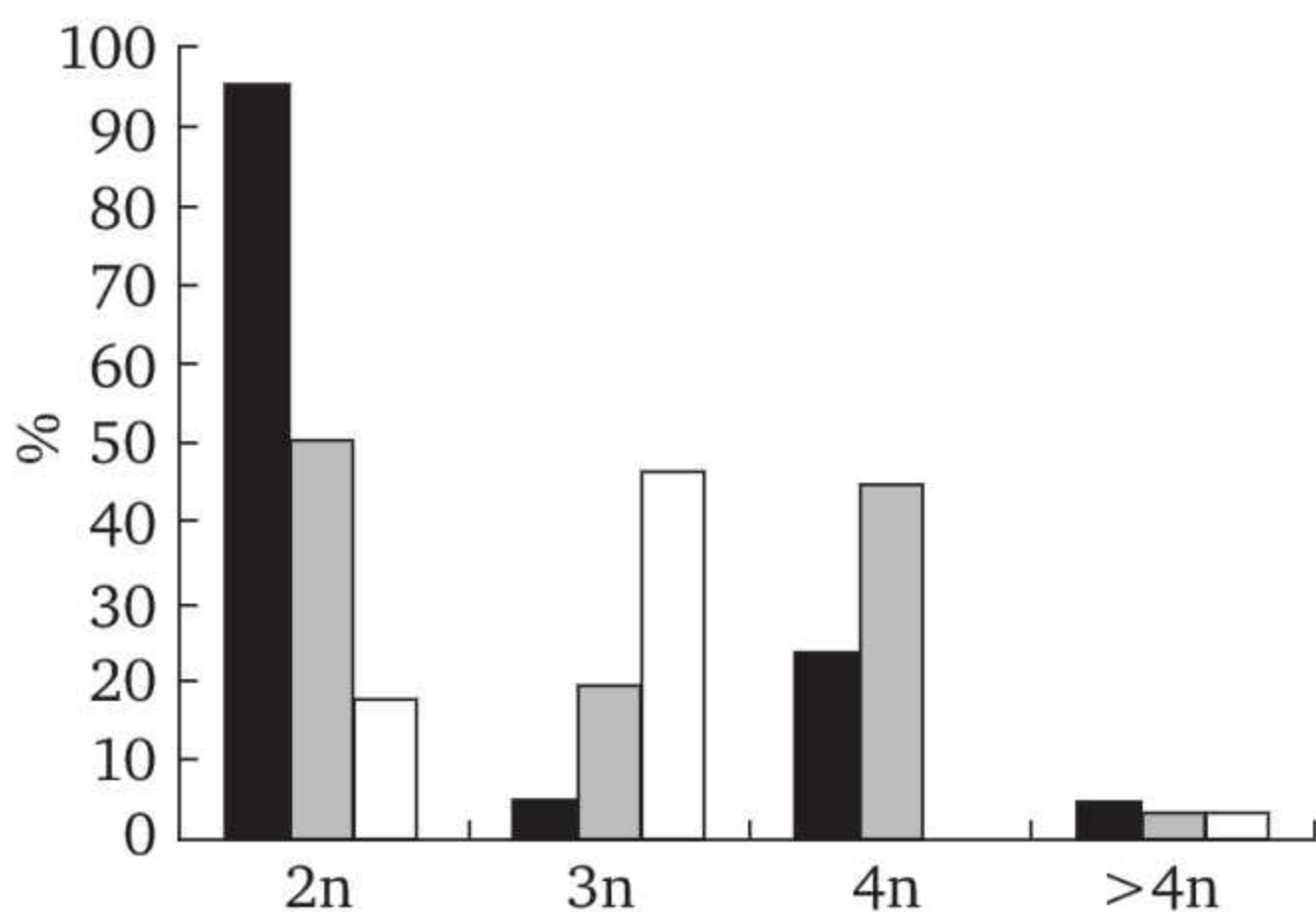


Рис. 1.14. Стабилизация популяции клеток конских бобов на диплоидном уровне

■ 1 месяц ■ 4 месяца □ 18 месяцев

Мутации отдельных генов. Большинство генных мутаций не имеет внешнего проявления на уровне культивируемых клеток, под микроскопом мутантные клетки не отличаются от немутантных. Чтобы обнаружить изменения отдельных генов, культуры выращивают в селективных условиях, способствующих росту только мутантных клеток, или используют молекулярно-генетические методы анализа ДНК. В культурах клеток растений применяют такие селективные системы как устойчивость к токсичным аналогам аминокислот и аналогам оснований нуклеиновых кислот, антибиотикам, стрессовым факторам, гербицидам, фитотоксинам, используют также системы прототрофности и ауксотрофности по фитогормонам, витаминам, аминокислотам, т.е. отбирают клетки, способные или, наоборот, неспособные расти на среде без этих веществ.

Исследуемые клетки растений высевают в чашки Петри на поверхность агаризованной селективной среды или смешивают с расплавленной и остуженной до 45°C агаризованной средой. После застывания питательной среды клетки оказываются закрепленными на определенных местах. На фоне гибели чувствительных клеток устойчивые начинают делиться и дают начало **клону** (рис. 1.15). Разделив количество образовавшихся клонов на количество высеянных на чашку клеток, можно определить частоту мутантных клеток в данной культуре. Как показали эксперименты, частота мутантных по определённому гену клеток, выявляемых таким образом, варьирует для разных видов растений и разных признаков от 10^{-5} до 10^{-8} . Однако описаны отдельные случаи, когда мутации в культуре *in vitro* возникали гораздо чаще.

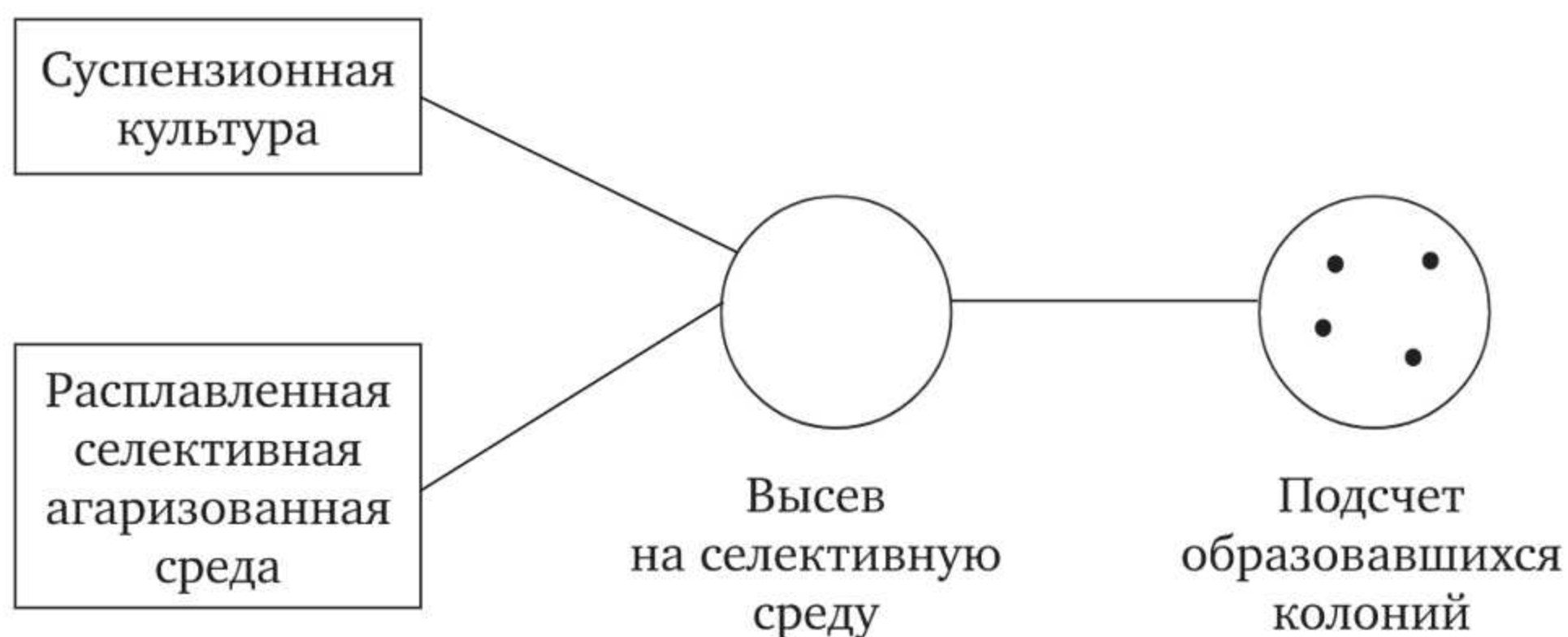


Рис. 1.15. Схема отбора мутантных клеток

Развитие методов молекулярной биологии позволяет анализировать непосредственно изменения в структуре ДНК. Было показано, что сильно подвержены изменчивости в культуре *in vitro* повторяющиеся последовательности, которые составляют около 60% генома типичных растений. Вариабельность повторяющихся последовательностей у клеточных культур проявляется, главным образом, в увеличении или уменьшении числа копий. Уникальные последовательности, кодирующие определенные белки, также иногда амплифицируются в культуре *in vitro*. Для генов, которые не могут существенно менять свою экспрессию, механизм амплификации и деамплификации является способом регуляции количества продукта. Показано, что устойчивость к гербициду фосфинотрицину у клеточной линии люцерны была следствием 4—11-кратной амплификации гена глютамин-синтазы. Устойчивость к другому гербициду глифосату у клеток табака достигалась за счет амплификации по крайней мере двух генов. Амплифицированное состояние этих генов сохранялось в отсутствии селективного давления, доказывая стабильность этого изменения.

Было показано, что изменчивости *in vitro* подвержен не только ядерный геном, но и гены хлоропластов и митохондрий. У большинства растений митохондриальная ДНК (мтДНК) существует в виде гетерогенной популяции кольцевых молекул. Наличие повторов, которые действуют как сайты гомологичной рекомбинации, делает популяцию субгеномных молекул мтДНК очень лабильной. При введении в культуру *in vitro* нередко появляются новые фрагменты мтДНК и изменяется соотношение уже существующих.

Соматоклональная изменчивость

Исследуя растения, регенерированные из культивируемых клеток, ученые установили, что растения-регенеранты не всегда идентичны исходным формам. Впервые это явление было описано в 70-х гг. XX века для регенерантов сахарного тростника и табака (рис. 1.16). Позднее индуцируемая в культуре *in vitro* и проявляющаяся у растений-регене-

рантов изменчивость получила определение «**сомаклональной вариабельности**», а измененные растения были названы «**сомаклонами**» или «**сомаклональными вариантами**».

Сомаклональная изменчивость представляет собой широко распространенное явление, так как она обнаружена у регенерантов большинства исследованных видов растений. Описаны сомаклональные вариации по морфологическим и биохимическим признакам, физиологическим параметрам. Изменения происходят как в ядерной, так и в хлоропластной и митохондриальной ДНК, встречаются растения-регенеранты с крупными перестройками генома и с точковыми мутациями.



Рис. 1.16. Первые сомаклоны табака, полученные в Институте физиологии растений РАН Н. А. Загорской и З. Б. Шаминой

Растения, полученные из культивируемых *in vitro* тканей, нередко внешне отличаются от исходных форм (рис. 1.17). Среди наиболее часто встречающихся изменений качественных морфологических признаков можно отметить вариации окраски и формы листьев, цветков, плодов, семян или клубней, наличие воскового слоя или опушенности листьев. С высокой частотой появляются растения-альбиносы, полностью или частично лишенные хлорофилла. Такой фенотип часто является следствием крупных делеций хлоропластной ДНК, хотя может быть вызван и ядерной мутацией. К варьирующим у регенерантов количественным признакам относятся высота растений, число и размеры листьев и стеблей, количество и масса семян или плодов и др. Как правило, размах изменчивости по количественным признакам у регенерантов больше, чем у исходных растений.

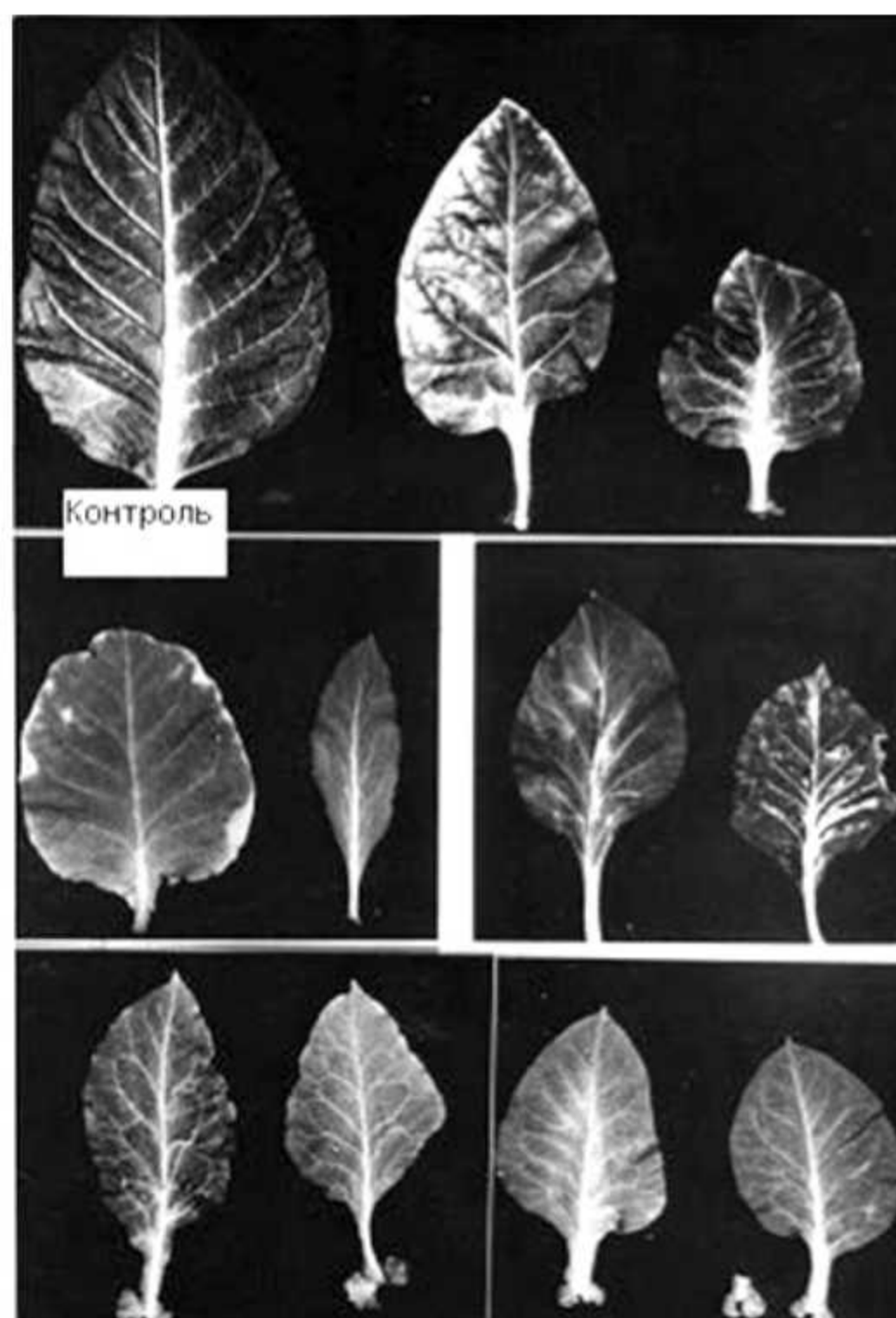


Рис. 1.17. Вариации формы листа у соматклонов табака

Наряду с вариациями морфологических признаков у растений, регенерированных из культивируемых тканей, описаны изменения и биохимических признаков. Например, отмечены отличия регенерантов от исходных растений по набору изоформ некоторых ферментов: эстеразы, пероксидазы, амилазы, алкогольдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и некоторых других ферментов. Частота соматклонов с мутациями ферментов варьировала у разных растений от 1 до 13%. У соматклонов значительно изменялся состав и количество запасных белков, жирных кислот и других соединений.

Большой интерес для изучения регуляции физиологических процессов представляют соматклоны с вариациями физиологических признаков, такими как изменения сроков цветения и созревания семян, появление мужской стерильности, устойчивость к болезням. Среди соматклонов риса и пшеницы отмечены вариации содержания хлорофилла в листьях. У пшеницы обнаружены регенеранты, которые различались по функциональной активности фотосинтеза и его первичных реакций.

Изменения числа и структуры хромосом, характерные для культивируемых *in vitro* клеток, негативно влияют на способность к регенерации растений. Показано, что растения-регенеранты образуются преимущественно из диплоидных клеток, а регенерационный потенциал цитогенетически аномальных клеток понижен вплоть до полной неспособности к морфогенезу. Поэтому частота хромосомных аномалий у регенерантов значительно ниже, чем в культуре тканей. Растения-регенеранты с хромосомными аномалиями часто имеют пониженную фертильность

и не оставляют потомства. В результате при половом размножении продолжается отсев цитогенетически ненормальных растений. Вместе с тем, клетки, несущие хромосомные аномалии, которые не снижают жизнеспособность, могут участвовать в процессе морфогенеза.

Более высокая частота кариологически аномальных форм среди регенерантов характерна для полиплоидных видов. Она может достигать 70%. По-видимому, благодаря дублированию генов на гомологичных хромосомах у аллополиплоидных видов, потеря отдельных хромосом меньше сказывается на жизнеспособности растений-регенерантов. У диплоидных видов элиминация хромосом, как правило, оказывается летальной. Вероятно, поэтому у диплоидных видов доля регенерантов с вариациями числа хромосом не превышает 10%. Однако значительная часть растений, полученных из культур тканей, может иметь различные хромосомные перестройки: транслокации, делеции, инсерции.

По мере увеличения продолжительности культивирования клеток *in vitro* возрастает доля растений-регенерантов с хромосомными нарушениями. Например, среди растений овса, полученных из каллуса после 4 и 20 месяцев культивирования *in vitro*, доля регенерантов с хромосомными абберациями составляла, соответственно, 12% и 48%.

Регенеранты, не имеющие фенотипических отличий от исходных растений, тем не менее, часто также оказываются соматклонами. В этом можно убедиться, если провести анализ ДНК, выделенной из растений-регенерантов. Применение молекулярных методов позволило выявить в клеточных культурах многочисленные изменения повторяющихся и уникальных последовательностей (рис. 1.18). Величина генетического полиморфизма в зависимости от вида растений варьирует от 1 до 40%. Для выяснения причины полиморфизма ДНК-маркеров переменные фрагменты секвенируют, т.е. определяют их последовательность нуклеотидов. Например, на соматклонах кукурузы показано, что в процессе культивирования клеток *in vitro* в исследуемых генах произошли крупные и мелкие делеции, инсерции и замены нуклеотидов.

Закономерности соматклональной изменчивости. При анализе изменчивости растений, полученных из культивируемых тканей, трудно оценить истинную частоту мутаций. Значительная погрешность возникает из-за того, что не все клетки в культуре в равной степени способны к регенерации растений. Тем не менее, можно сказать, что вероятность появления различных соматклональных вариаций неодинакова. Наиболее характерным типом соматклональных изменений являются аномалии развития (рис. 1.19). Частота подобных изменений достигает у некоторых соматклонов 100%. Большая вариабельность характерна для количественных признаков, а изменения качественных признаков происходят значительно реже. Более высокая встречаемость соматклонов с вариациями количественных характеристик может быть связана с их полигенным контролем. Например, найдено уже более 20 генов, отвечающих за высоту растения. Мутация любого из генов, контролирующего количественный признак, может привести

к его заметному изменению. Частота вариаций количественных признаков может достигать десятков процентов. В тех случаях, когда учитывалась не просто доля измененных растений, а мутации конкретных локусов, частота соматической вариабельности была значительно ниже (менее 1%).

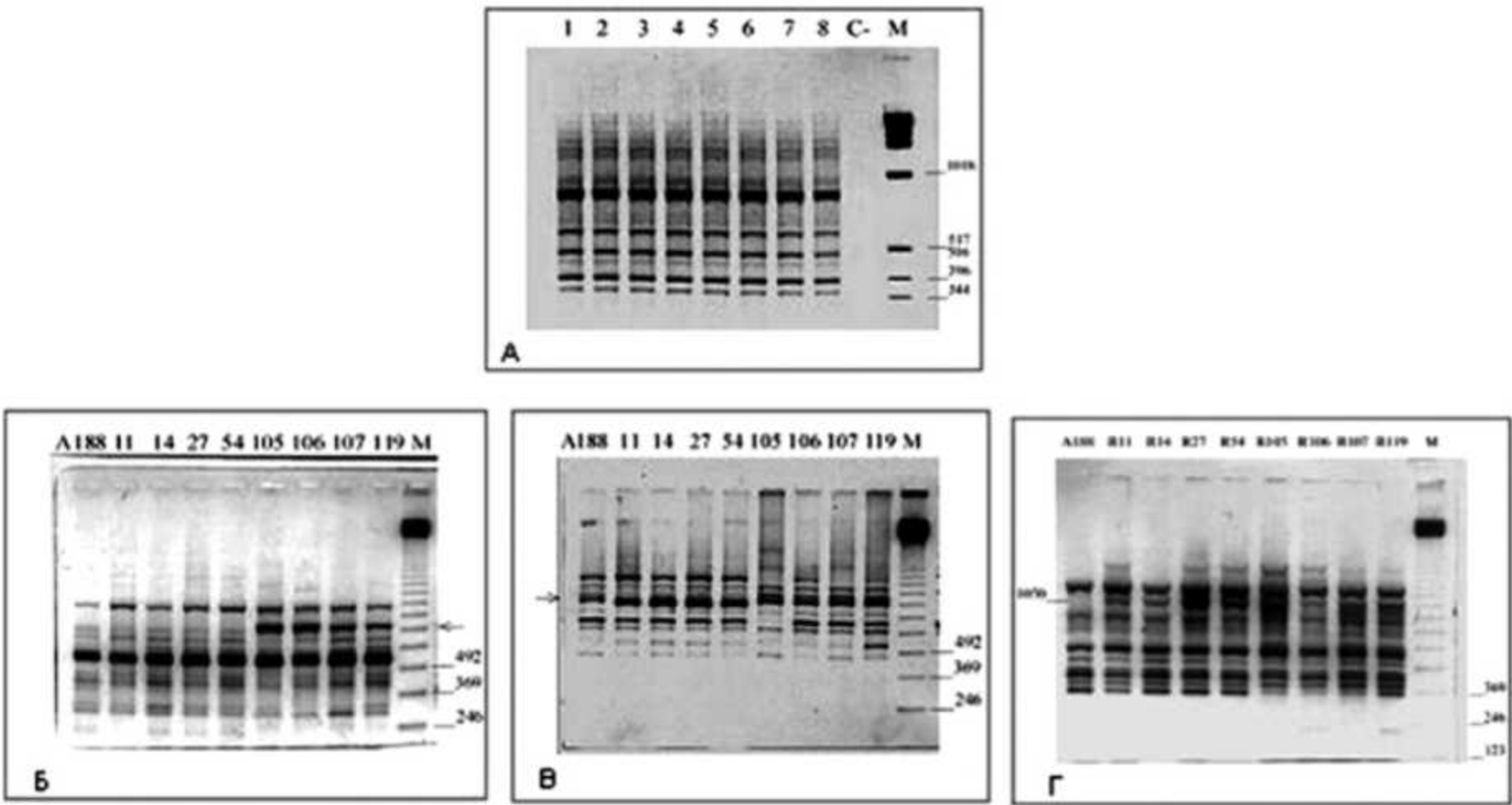


Рис. 1.18. Вариации ДНК-маркеров у соматклонов кукурузы:

А — идентичность спектров амплифицированных фрагментов у индивидуальных растений инбредной линии A188; Б—Г — профили амплифицированных фрагментов индивидуальных соматклонов (11—119) с разными праймерами;
 М — маркер молекулярной массы
 Стрелками отмечены полиморфные фрагменты

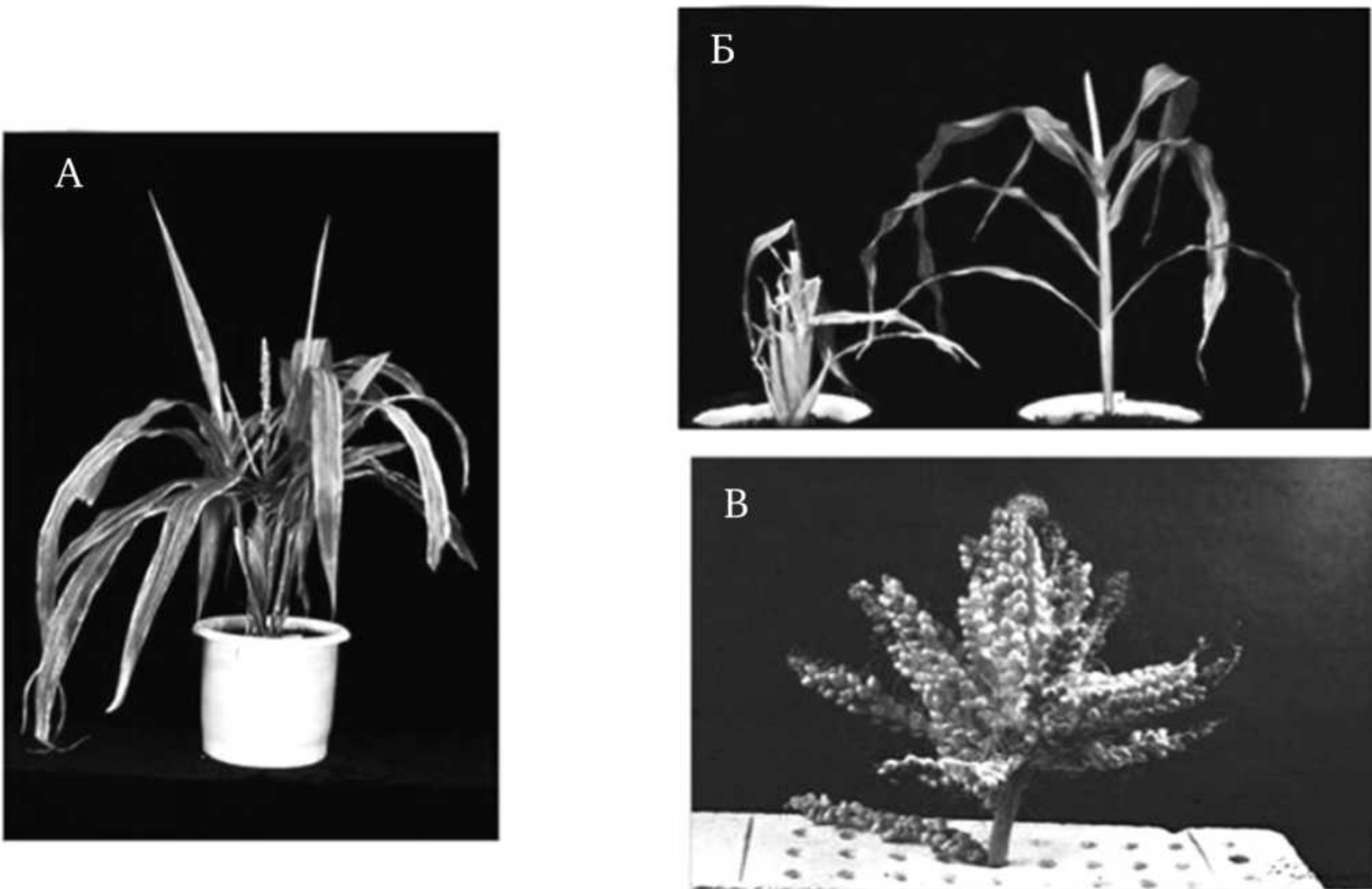


Рис. 1.19. Аномалии развития у соматклонов кукурузы:

А — кустистая форма с укороченными междоузлиями; Б — нормальное (справа) и деформированное растения, полученные из одного каллуса;
 В — развитие на метелке женских цветков

Генетические изменения возникают в клетках *in vitro* уже в первые дни культивирования. Эти мутации проявляются и у регенерантов растений. Многочисленные примеры показывают, что растения, полученные из тканей после одного-двух месяцев культивирования, уже отличаются от исходных форм. По мере увеличения продолжительности культивирования тканей *in vitro* доля аномальных растений-регенерантов, как правило, возрастает. Увеличивается также число признаков, отличающих соматклоны от исходных растений (табл. 1.3) Если среди растений, регенерированных после кратковременного культивирования, высока доля модификационных и эпигенетических изменений, то соматклоны, полученные после более длительного культивирования клеток, чаще несут истинные мутации.

Таблица 1.3

Влияние продолжительности культивирования тканей кукурузы *in vitro* на уровень генетической изменчивости растений-регенерантов

Время культивирования, мес.	Доля аномальных растений, %			
	Укороченные междоузлия	Стерильность	Хлорофилл-дефектность	Полиморфизм ДНК-маркеров
2	23,3	1,7	0	6—10
8	36,7	13,3	0	14—23
10	40	100	40	—
14	100	100	40	—

Характер наследования соматклональных вариаций. Очень важным является вопрос о наследуемости соматклональных вариаций. Показано, что природа соматклональной изменчивости многообразна.

У растений-регенерантов выявлены:

- 1) модификации, нормализующиеся в процессе онтогенеза;
- 2) изменения экспрессии генов (как наследуемые, так и ненаследуемые);
- 3) истинные мутации, связанные с изменением первичной структуры ДНК.

Модификациями называются изменения, не затрагивающие геном. Модификационные отклонения от исходного фенотипа у регенерантов могут быть вызваны условиями культивирования клеток *in vitro* на средах с большим содержанием регуляторов роста. Побег или зародыши, сформировавшиеся в таких условиях, нередко имеют аномалии развития, особенно на ранних этапах онтогенеза. Если такие регенеранты цветут и завязывают семена, то потомство их не отличается от исходных растений. Это объясняется тем, что причиной изменения были не мутации, а различные нарушения метаболизма, связанные с культивированием тканей *in vitro*.

Соматклональные вариации, обусловленные изменением активности того или иного гена, называемые **эпигенетическими**, могут переда-

ваться потомству. Такие соматоклональные вариации наследуются в первом поколении, но затем с каждым следующим поколением проявление измененного признака слабеет вплоть до полного исчезновения. Это явление, названное «затуханием признака», объясняют постепенным восстановлением уровня метилирования регуляторных элементов генов до состояния исходного растения.

В тех случаях, когда соматоклональные вариации обусловлены мутациями, они наследуются как менделевские признаки, чаще рецессивные, чем доминантные. Описаны случаи, когда соматоклоны отличались от исходных растений сразу по нескольким признакам. При этом каждый признак наследовался независимо. Количественные признаки также могут стабильно наследоваться в соответствии с генетическими правилами, разработанными для классического мутагенеза.

Как правило, изменения происходят в одном из аллелей, т.е. регенерированные растения гетерозиготны, и при их самоопылении наблюдается сегрегация. Однако описаны случаи, когда расщепление по измененному признаку в потомстве соматоклона отсутствовало, все потомки имели мутантный фенотип. Отсутствие расщепления в потомстве от самоопыления соматоклонов указывает на возможность возникновения у регенерантов мутаций в гомозиготной форме. Подобные гомозиготные соматоклональные варианты описаны у риса, кукурузы и пшеницы. Для риса стабильное наследование гомозиготных мутаций прослежено на протяжении шести поколений. Одним из возможных объяснений этого необычного явления может быть **митотическая или мейотическая рекомбинация**.

Причины и механизмы соматоклональной изменчивости. Основными причинами появления генетических вариаций являются реализация гетерогенности, существующей в соматических тканях исходных растений, и влияние условий культивирования.

В многоклеточном экспланте, взятом от исходного растения, клетки могут находиться на разном уровне дифференцировки, различаться по уровню пloidности, накапливать соматические мутации. Неоднородный эксплант при культивировании *in vitro* формирует гетерогенную популяцию, из которой, в свою очередь, могут быть получены растения, отличающиеся от исходных.

Вместе с тем, показано, что большая часть генетических вариаций возникает именно под влиянием условий *in vitro*. Гетерогенными становятся культуры, полученные из одиночных клеток или протопластов, доля измененных клеток возрастает с увеличением продолжительности культивирования. Значит, причины и механизмы изменчивости нужно искать в процессах, происходящих в клетках при введении в культуру и культивировании *in vitro*.

Клетка, существующая в организме или в культуре *in vitro*, подвергается действию регулирующих факторов: гормональных, трофических, физических, воспринимает сигналы от соседних клеток. Клетка, введенная в культуру *in vitro*, лишается регулирующих сигналов со стороны

целого организма и подвергается действию компонентов питательной среды и условий культивирования (рис. 1.20). В этом состоянии, которое можно назвать стрессовым, в клетках меняется спектр работающих генов, что регистрируется экспериментально по уменьшению активности вторичного метаболизма, амплификации и деамплификации части ДНК, изменению характера метилирования. В условиях дисбаланса регулирующих сигналов эти, в норме обратимые, процессы могут стать причиной мутаций или эпигенетических изменений.



Рис. 1.20. **Источники соматической изменчивости**

В течение многих лет предметом активной дискуссии является вопрос об индукции генетической изменчивости компонентами питательной среды, главным образом, регуляторами роста. Есть данные, что 2,4-Д, ИУК и НУК повышали частоту клеток с хромосомными аномалиями. Повышение уровня изменчивости под действием цитокининов не описано, наоборот, в ряде работ показано стабилизирующее влияние цитокининов при их применении вместе с 2,4-Д или НУК. Специальные тесты не подтверждают мутагенного действия компонентов питательной среды. Вместе с тем, не исключено влияние регуляторов роста на преимущественное размножение клеток определенного типа или на уровень метилирования отдельных последовательностей ДНК.

Вопрос о механизмах появления мутаций в культивируемых *in vitro* клетках обсуждается в литературе уже более двадцати лет. Довольно убедительной выглядит гипотеза, связывающая генерацию изменений с поздно реплицирующимися гетерохроматиновыми участками генома. Повышенная частота хромосомных aberrаций в гетерохроматиновых районах описана для культур тканей многих видов растений. В качестве причины наблюдаемых изменений структуры хромосом в настоящее время рассматривают характерное свойство гетерохроматина, а именно его позднюю репликацию в митотическом цикле. Поздняя репликация гетерохроматина задерживает расхождение хромосом в анафазе, в результате образуются мосты и разрывы, которые, в свою очередь, в случае гомологичных хромосом могут привести к дупликациям и делециям, а в случае нехомологичных хромосом — к реципрокным транслокациям.

Наличие гетерохроматина и связанные с ним особенности репликации хорошо объясняют возникновение хромосомных aberrаций, но, скорее всего не могут рассматриваться в качестве основного механизма генных мутаций. В отношении этого вида изменчивости предпочтение отдается гипотезе о роли процессов метилирования и деметилирования генома в целом и его отдельных участков, а также дифференциальной репликации отдельных последовательностей.

Метилирование оснований ДНК в промоторной области может подавлять экспрессию генов, на фенотипическом уровне это будет выглядеть как потеря функционального белка, и может быть истолковано как мутация. Повышение степени метилирования может также вызвать усиление конденсации хроматина, увеличение доли поздно реплицирующегося гетерохроматина. При этом возрастает вероятность хромосомных aberrаций, обусловленных расхождением в митозе хромосом до полного окончания репликации. Гипометилирование ДНК, напротив, способствует активации генов. Гипометилированные состояния, затрагивающие обе цепи ДНК, стабильно воспроизводятся при репликации, тем самым, обеспечивая свою наследуемость в ряду поколений.

Метилированный цитозин часто спонтанно дезаминируется и превращается в тимин, в результате возникает неправильное спаривание оснований двух цепей ДНК (Т-Г), которое в 92% случаев репарируется путем обратной замены тимина на цитозин. В нерепарированных участках при последующей репликации в строящейся цепи ДНК напротив тимина встает уже не гуанин, а аденин, т.е. происходит мутация (рис. 1.21). Таким образом, метилирование и деметилирование могут не только влиять на экспрессию генов, но и приводить к изменениям последовательности оснований в ДНК, индуцируя истинные точковые мутации.

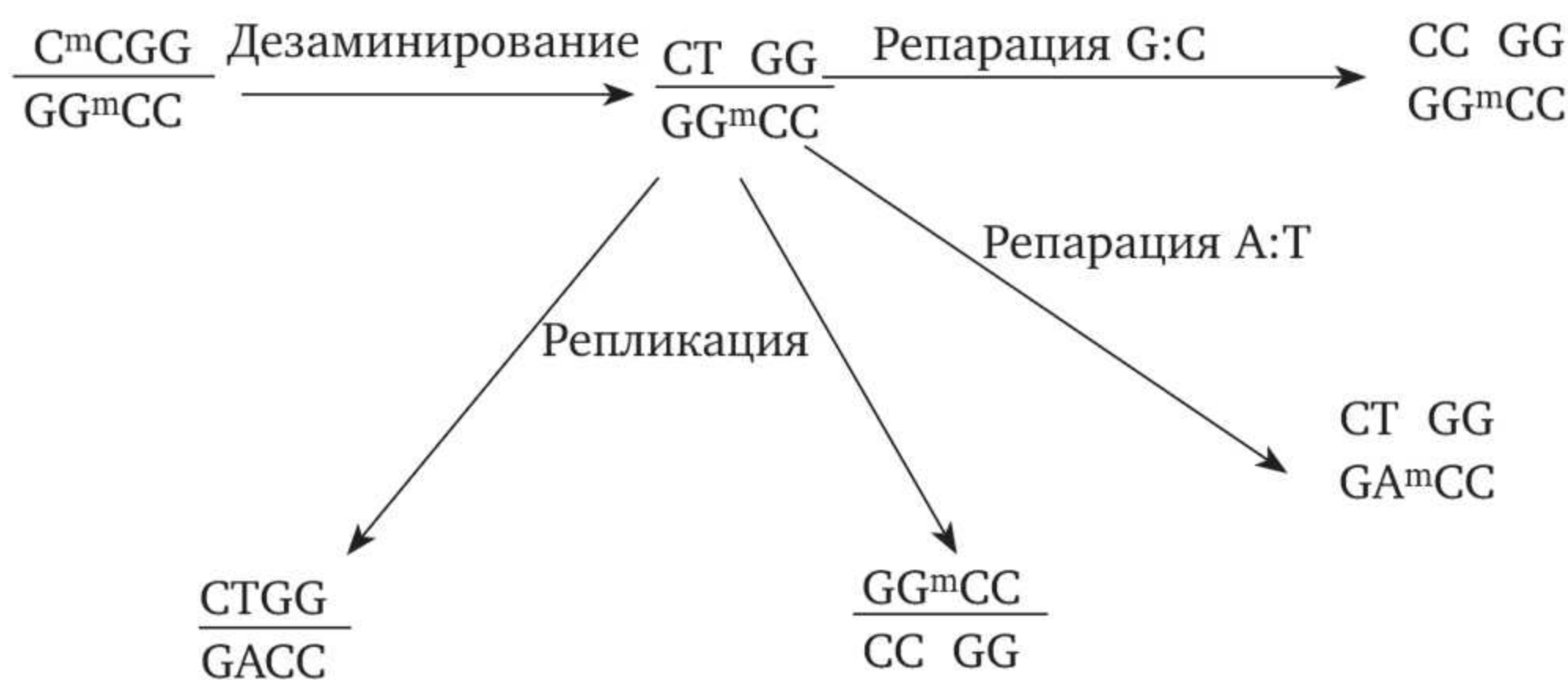


Рис. 1.21. Механизм генных мутаций, индуцированных изменением характера метилирования. ^mC — метилированный цитозин

Некоторые авторы связывают происхождение соматической изменчивости с активацией окислительных процессов в культуре *in vitro*. Известно, что свободные радикалы кислорода образуются в клетках растений *in vivo* и *in vitro* как продукты нормального окислительного метаболизма. Будучи высоко реакционноспособными, эти свободные

радикалы могут прямо взаимодействовать с молекулами ДНК, вызывая их структурные нарушения. В сложных биологических системах радикалы кислорода могут вызывать повреждения ДНК и непрямым путем, инициируя процесс перекисного окисления липидов в мембранных структурах клетки. Показано, что один из промежуточных продуктов перекисного окисления липидов малоновый диальдегид является мощным мутагеном. Стрессовые состояния, к которым можно отнести и введение в культуру изолированных из растений эксплантов, как правило, сопровождаются увеличением количества свободных радикалов.

Таким образом, в настоящее время в качестве основных причин генетической изменчивости клеток при культивировании *in vitro* рассматриваются наличие поздно реплицирующегося гетерохроматина, изменения характера метилирования в процессе дифференцировки и дедифференцировки и активацию свободных радикалов.

Изменчивость агрономических признаков у растений, регенерированных из культивируемых тканей. Среди огромного разнообразия признаков, подвергающихся соматклональной изменчивости, немало таких, которые могут найти практическое применение. Одни из первых обнаруженных соматклонов — растения-регенеранты сахарного тростника характеризовались повышенным уровнем сахара, а также устойчивостью к вирусу Фиджи, желтой пятнистости и ложной мучнистой росе. В значительной степени интерес к соматклональной изменчивости, существующий и по сей день, обусловлен именно желанием использовать это явление при создании новых сортов растений.

В дальнейшем у многих видов растений были найдены соматклоны, характеризующиеся вариабельностью тех или иных агрономических признаков (табл. 1.4.).

Таблица 1.4

Соматклоны с улучшенными агрономическими признаками

Вид растения	Полезные признаки
Сахарный тростник	Повышенный уровень сахара, устойчивость к вирусу Фиджи, желтой пятнистости и ложной мучнистой росе
Картофель	Высокая урожайность
Томаты	Скороспелость, хорошо сбалансированный рост
Ячмень и просо	Продуктивный колос, высокая масса зерен, устойчивость к полеганию
Рис	Улучшенные продуктивность и качество зерна, скороспелость, толерантность к пониженным температурам
Пшеница	Морозоустойчивость, повышенная урожайность
Картофель, томаты, рис, кукуруза, пшеница	Пониженная восприимчивость к возбудителям различных заболеваний

Соматональная вариабельность не является направленной, поэтому наряду с полезными изменениями агрономических признаков возникают вариации, снижающие жизнеспособность и фертильность регенерантов (табл. 1.5). Лишь небольшая доля соматоклонов после проверки оказывается полезной для практического применения. Нередко позитивные варианты вообще не удастся обнаружить.

Таблица 1.5

Преимущества и недостатки использования соматоклонов в селекции

Преимущества	Недостатки
Высокая частота изменчивости	Появление нежелательных изменений, потеря сортовых признаков
Наличие полезных изменений	Не всегда стабильное наследование

Иногда культивирование *in vitro* приводит к потере сортовых характеристик. Например, более высокий уровень белка в зернах пшеницы сопровождался снижением урожая. Низкая продуктивность регенерантов и их потомства и наличие нежелательных изменений наиболее характерны для растений, полученных после длительного культивирования тканей *in vitro*.

Таким образом, многими авторами на различных видах растений показано, что культивирование тканей *in vitro* повышает изменчивость по агрономическим признакам. Однако варианты с улучшенными показателями встречаются среди соматоклонов сравнительно редко. Поэтому целесообразно отбор желаемых вариантов проводить также в культуре *in vitro*.

Клеточная селекция

Клеточной селекцией называется отбор в культуре *in vitro* клеток с заданными свойствами. Преимуществом отбора *in vitro* по сравнению с традиционной селекцией является возможность манипулировать миллионами генотипов в малом объеме. Если высадить в поле растения, по количеству соответствующие числу клеток в одной колбе (а это примерно 100 миллионов), они займут десятки гектаров. Затраты на обработку такого поля и проведение селекционных мероприятий будут гораздо больше, чем в случае применения клеточной селекции. Кроме того, работы в лабораторных условиях не зависят от сезона и погоды. При использовании клеточной селекции время, необходимое для создания нового сорта, сокращается на 2—4 года.

Все операции, связанные с проведением клеточной селекции, можно разделить на несколько этапов (рис. 1.22).

1. Получение каллусной или суспензионной культуры.

Если предполагается, что в результате клеточной селекции будут получены растения с новыми свойствами, необходимо получить культуру клеток, способных к морфогенезу. Следует использовать типы эксплантов и условия культивирования, способствующие образованию морфогенных тканей.



Рис. 1.22. **Схема клеточной селекции**

2. Субкультивирование в течение 2—3 месяцев для увеличения количества клеток и повышения генетического разнообразия.

В процессе субкультивирования отбираются клетки, способные к регенерации растений. Иногда для повышения частоты мутаций клетки обрабатывают химическими или физическими мутагенами.

3. Выбор вида и концентрации селективного фактора.

Вид селективного фактора зависит от поставленной цели. Чтобы выбрать концентрацию селективного фактора или определить степень жесткости селективных условий, определяют реакцию растений и культивируемых клеток на стрессор в определенном диапазоне его концентраций. В качестве селективного выбирают такое воздействие, при котором выживает и сохраняет способность к морфогенезу 20—30% клеток.

4. Инкубация культивируемых тканей в селективных условиях, отбор выживших клонов.

Селективные агенты добавляют в среду культивирования клеток. Выжившие клетки вновь пересаживают на селективную питательную среду. Такой отбор повторяют несколько раз.

5. Стабильно устойчивые клоны переносят на среду для регенерации растений.

6. Проверка устойчивости растений-регенерантов.

Растения, полученные из устойчивых клонов, помещают в селективные условия. При этом выбирается такая концентрация стрессора, которая в значительной степени или полностью ингибирует рост исходных растений.

7. Размножение выживших растений.

8. Проверка устойчивости потомства растений-регенерантов.

Седьмой и восьмой этапы проводятся уже не в лабораторных, а в полевых условиях. На этом заканчивается работа биотехнолога. Образцы, которые продемонстрировали стабильное и наследуемое проявление улучшенных признаков, передают селекционерам и включают в селекционный процесс. Таким образом, методы биотехнологии не заменяют традиционную селекцию, а служат для повышения ее эффективности и ускорения селекционного процесса.

Получение растений, толерантных к неблагоприятным природным условиям. На уровне отдельных клеток трудно вести отбор по таким многокомпонентным признакам как урожайность, продолжительность вегетационного периода, фотопериодичность и др., определяемым в большей степени на уровне целого организма. Вместе с тем культивируемые ткани успешно используются для улучшения качества и количества растительного белка, увеличения продукции ряда соединений вторичного метаболизма. Для отбора растений с увеличенным содержанием незаменимых аминокислот используют селекцию на средах, содержащих их токсичные аналоги. Повышенное содержание триптофана было отмечено в растениях, регенерированных из клонов, резистентных к 5-метилтриптофану. На средах с ингибирующими концентрациями лизина и треонина были выделены линии и регенерированы растения с измененной активностью фермента аспараткиназы. В результате мутации уменьшилась чувствительность аспараткиназы к ингибированию лизином. Полученные растения характеризовались повышенным в несколько раз содержанием аминокислот, синтез которых идет по аспаратному пути: лизина, треонина, изолейцина и метионина.

Однако чаще всего клеточная селекция применяется для отбора форм, толерантных к различным биотическим и абиотическим стрессам.

Очень важным является вопрос о соответствии реакции на стрессы целых растений и изолированных клеток, который исследован пока еще недостаточно полно, и имеющиеся данные довольно противоречивы. Так, показана положительная корреляция между реакциями каллусных тканей и растений при исследовании влияния повышенной кислотности почвы и токсичного уровня алюминия, а также действия высоких и низких температур. А вот чувствительность к засолению *in vivo* и *in vitro* совпадает не всегда. Описаны случаи, когда каллусные ткани, полученные от солетолерантных сортов, были более устойчивы к NaCl, чем ткани, выделенные из солечувствительных форм. Но есть и обратные примеры: утрата свойства солеустойчивости в культуре *in vitro* описана для типичного галофита солероса. Противоречивость опубликованных данных, вероятно, связана с многообразием защитных реакций, среди которых часть координируется на организменном уровне (например, наличие специальных желез для выведения соли из организма растения, отложение солей в покровных тканях и др.), а часть регулируется на клеточном уровне. С учетом приведенных данных следует с большой осторожностью использовать изолированные клетки для тестирования устойчивости тех или иных сортов культурных растений. Вместе с тем, накоплено уже много данных о большой роли молекулярных механизмов в обеспечении устойчивости растений к биотическим и абиотическим стрессам. Поэтому высока вероятность повышения толерантности у растений, регенерированных из отобранных *in vitro* резистентных клеточных линий.

Для селекции толерантных к неблагоприятным условиям окружающей среды клеток чаще всего используют непосредственно стрессовый фактор: NaCl или Na₂SO₄ для отбора солеустойчивых вариантов, гербициды, соли тяжелых металлов и т.п. (табл. 1.6). Путем клеточной селекции на средах с хлоридом натрия получены солеустойчивые растения табака, люцерны, пшеницы и других видов. В селективных системах с Na₂SO₄ отобраны растения ячменя, табака и др., толерантные к сульфатному засолению. Ряд холодоустойчивых форм получен из клеток, выделенных *in vitro* по способности переживать инкубацию при низких положительных температурах.

Таблица 1.6

Примеры отбора толерантных к неблагоприятным природным условиям растений с использованием различных стрессовых факторов

Селективный фактор	Признак	Вид растения
NaCl	Устойчивость к хлоридному засолению	Пшеница, кукуруза, табак, люцерна
Na ₂ SO ₄	Устойчивость к сульфатному засолению	Ячмень, табак
Низкие положительные температуры	Холодоустойчивость	Рис, хризантема
Кислый рН и соли алюминия	Устойчивость к солям алюминия, способность расти на кислых почвах	Ячмень, рис, сорго
Аноксия	Устойчивость к корневому затоплению	Пшеница, сахарный тростник

Путем отбора клеток, устойчивых к низким значениям рН и солям алюминия, получены растения ячменя, риса и сорго, толерантные к этому металлу и успешно растущие на кислых почвах. С помощью метода клеточной селекции были получены растения кукурузы, устойчивые к гербицидам амидазолинону и сетоксидиму. В результате отбора клеток на средах с постепенно повышающимися концентрациями гербицидов были выделены клеточные линии, растения из которых выдерживали дозы гербицидов в 3—10 раз более высокие, чем исходные формы.

Иногда применяют специальные селективные системы, выбор которых основан на использовании специфических механизмов устойчивости (табл. 1.7).

Таблица 1.7

Примеры отбора устойчивых растений с помощью специальных селективных систем

Селективный фактор	Признак	Вид растения
L-азетидин-2-карбоновая кислота	Солеустойчивость	Рис, соя, табак
Тиазолидинкарбоновая кислота	Солеустойчивость	Люцерна, манго

Селективный фактор	Признак	Вид растения
Оксипролин	Солеустойчивость	Рис
Оксипролин	Морозоустойчивость	Пшеница, ячмень
Полиэтиленгликоль	Засухоустойчивость	Рис, кукуруза
Маннит	Засухоустойчивость	Пшеница, табак
Этионин	Солеустойчивость	Табак
Морская вода	Солеустойчивость	Пшеница, табак

Например, установлена положительная корреляция между накоплением в клетках пролина и повышением устойчивости растений к обезвоживанию, вызванному засолением, засухой или низкими температурами. Активность ферментов, катализирующих биосинтез пролина, ингибируется избытком продукта, что не дает возможности существенно повысить в тканях уровень этой аминокислоты. Для повышения эндогенного уровня пролина проводят селекцию на средах, содержащих его токсичные аналоги. В этих условиях выживают только те клетки, у которых ферменты биосинтеза пролина нечувствительны к ингибированию по типу обратной связи, и концентрация пролина увеличена. Путем отбора клеток в присутствии L-азетидин-2-карбоновой кислоты получены толерантные клеточные линии сои, табака и риса. На средах с другим аналогом пролина — тиазолидинкарбоновой кислотой удалось выделить устойчивые клетки люцерны и манго. Толерантные к оксипролину клеточные культуры и растения получены у риса, ячменя и пшеницы. Устойчивые к аналогам аминокислоты варианты характеризовались повышенным содержанием пролина и, как правило, были более устойчивы к NaCl, чем исходные формы. Растения пшеницы и ячменя, полученные путем клеточной селекции на среде с оксипролином, обладали повышенной морозоустойчивостью. Для отбора толерантных к холоду растений селекция на средах с пролином оказалась более эффективной, чем прямой отбор при пониженной температуре.

Засоление и низкая температура вызывают обезвоживание растительных тканей, поэтому увеличение способности клеток удерживать воду способствует повышению устойчивости к этим стрессовым факторам. Для отбора клонов, толерантных к обезвоживанию, используют среды с осмотиками: полиэтиленгликолем, маннитом, сорбитом. В селективной системе с ПЭГ были получены солеустойчивые клеточные линии и растения риса, а с использованием маннита — солеустойчивые растения табака и пшеницы.

Избыток соли нарушает метаболизм серы в растениях, вызывает уменьшение пула серосодержащих аминокислот цистеина и метионина. Нехватка этих аминокислот создает неблагоприятные условия для протекания сопряженных с метаболизмом серы путей биосинтеза азотистых соединений, углеводов и липидов. Суперпродукция метионина

способна восполнить дефицит серы, возникающий в условиях засоления. Для отбора клеток с повышенной активностью биосинтеза метионина рекомендованы среды с его токсическим аналогом этионином.

Еще одним селективным фактором, имитирующим сульфатно-хлоридное засоление, является морская вода, добавленная к питательной среде в ингибирующих рост клеток дозах. Полученные из выживших на селективных средах каллусов растения табака и пшеницы были толерантны к токсичным для растений дикого типа концентрациям солей и характеризовались в стрессовых условиях повышенным содержанием пролина.

Каждая из перечисленных систем отбора солеустойчивых клеток имеет свои преимущества. В случае использования специальных селективных систем направлены отбираются варианты, солеустойчивость которых обусловлена определенным механизмом. При проведении селекции на средах с хлоридом или сульфатом натрия разнообразие механизмов устойчивости у отселектированных форм будет значительно больше, хотя без специального исследования нельзя будет сказать, какова конкретная причина толерантности. Использование в качестве селективного фактора морской воды имеет практическую направленность на получение растений, для полива которых можно применять соленую воду.

Получение растений, устойчивых к болезням. Большим разнообразием характеризуются селективные системы, используемые для получения растений, устойчивых к патогенам. В тех случаях, когда поражающим фактором являются токсичные продукты жизнедеятельности патогенных грибов или бактерий, для отбора устойчивых клеток в питательную среду добавляют фильтрат культуральной жидкости возбудителя или очищенный токсин. Путем селекции на средах с культуральным фильтратом *Fusarium* или фузариевой кислотой получены растения люцерны, томатов, картофеля и пшеницы с повышенной устойчивостью к фузариозу. Отбор на средах с продуктами жизнедеятельности разных видов *Helminthosporium* позволил выделить формы пшеницы, кукурузы, ячменя и риса, невосприимчивые к гельминтоспорозу. Аналогичным образом получены растения табака, устойчивые к *Pseudomonas syringae*, растения картофеля, устойчивые к кольцевой гнили и другие невосприимчивые формы разных видов культурных растений.

Однако выделяемые патогенами токсины не всегда являются единственным или главным поражающим фактором. Поэтому устойчивость к токсинам может не коррелировать с устойчивостью к возбудителям болезней. В этом случае для отбора толерантных растений рекомендованы другие системы клеточной селекции. Одним из способов является инокуляция клеток каллусных культур спорами возбудителя болезни. После развития инфекции отбирают непораженные сектора и регенерируют из этих клеток растения. Таким способом были выделены растения риса, устойчивые к пирикулярриозу.

В связи с высокой скоростью мутирования патогенов, приводящей к возникновению новых рас, специфическая устойчивость растений

по принципу «ген на ген» не может надолго их защитить. Поэтому большой интерес представляют различные виды неспецифической устойчивости, обусловленные характером взаимодействия паразита и хозяина. Например, для активного роста и спороношения грибы родов *Phytophthora* и *Pythium* нуждаются в определенных растительных стеринах. На растениях с нестандартным составом стерина данные грибы не способны паразитировать. Для отбора таких растений культивируемые ткани картофеля подвергали действию полиеновых антибиотиков, в присутствии которых выживали только клетки с измененным соотношением стероидных соединений. Из резистентных к антибиотикам клеток были регенерированы растения, среди которых удалось отобрать образцы, устойчивые к фитофторе. Данная селективная система оказалась полезной и для создания растений, устойчивых к насекомым-вредителям, которые также нуждаются в стероидных соединениях растительного происхождения для осуществления линьки, метаморфоза личинок и формирования репродуктивной системы.

Другой подход к повышению устойчивости растений связан с ограничением проникновения в них патогенов. Одним из первых этапов заражения является разрушение клеточных стенок растений гидролитическими ферментами, продуцируемыми возбудителем. Было высказано предположение, что снижение чувствительности к пектиназе и целлюлазе повысит устойчивость к патогенам. По крайней мере, по отношению к пектиназе это предположение оказалось верным. Среди растений картофеля, регенерированных из каллусов на среде с пектиназой в сублетальной концентрации, были формы с повышенной устойчивостью к фитофторозу, черной ножке и кольцевой гнили. При этом до 15% регенерантов характеризовались невосприимчивостью одновременно к нескольким патогенам.

Одним из механизмов защиты от патогенных грибов является выделение растением различных ингибиторов. Большинство ингибиторов является фенольными соединениями или их окисленными формами. Накопление фенольных соединений и активация окисляющих их ферментов коррелирует с устойчивостью к патогену. Предшественниками в биосинтезе фенольных соединений являются фенилаланин и триптофан, поэтому обогащение клеток этими аминокислотами может привести к повышенной продукции фенольных соединений. Использование токсических аналогов аминокислот 5-метил-триптофана и парафторфенилаланина действительно позволило выделить клоны с суперпродукцией основной аминокислоты. У выделенных клонов активность защитных реакций была намного больше уровня в контрольных клонах.

Способы отбора устойчивых клеток

Наряду с правильным выбором селективного фактора на эффективность клеточной селекции существенно влияет определение способа отбора устойчивых клеток. Идеальным объектом для селекции мутан-

тов являются суспензионные культуры с преобладанием одиночных клеток или протопласты. В них легко проникает селективный фактор. Клоны, которые образуются при размножении одиночных клеток или протопластов в селективных условиях, однородны, что значительно увеличивает стабильность признака и исключает возможность регенерации химерных растений.

Для выделения устойчивых клеток из суспензии применяют «пассивный» отбор или клонирование. В первом случае суспензионную культуру длительно выращивают в среде с селективным агентом. В этих условиях размножаться могут только устойчивые формы, на фоне гибели чувствительных клеток их доля постепенно увеличивается, пока вся суспензия не будет состоять только из резистентных клеток. При клонировании клетки или протопласты высевают на агаризованные селективные среды, и отбирают растущие колонии. Второй способ позволяет быстрее и надежнее выделить мутантные клетки из общей массы. Для получения форм с более высокой резистентностью выросшие колонии ресуспендируют и повторно клонируют на среду с более высокой концентрацией селективного фактора.

Селекцию в суспензионных культурах или в культурах протопластов успешно используют для выделения мутантных клеточных линий, но растения в этом случае получить удастся далеко не всегда. Это связано, прежде всего, с тем, что не для всех видов разработаны воспроизводимые методы регенерации растений из одиночных клеток и протопластов. Кроме того, в процессе длительного культивирования, необходимого для получения хорошей суспензионной культуры, клонирования и проверки устойчивых клонов, способность к морфогенезу нередко утрачивается. Поэтому чаще селекцию проводят на уровне каллусных культур. Маленькие кусочки каллуса высаживают на селективные среды. Поскольку доступ фактора отбора внутрь каллусных инокулюмов затруднен, для полной элиминации чувствительных клеток при использовании каллуса требуется более продолжительная селекция, чем в случае суспензионных культур.

Существует несколько способов отбора резистентных каллусов. В первом случае используют среды с высокой концентрацией селективного фактора и субкультивируют каллусы до тех пор, пока не останутся только стабильно устойчивые клетки. Такой вариант клеточной селекции обеспечивает гарантированный отсев всех чувствительных клеток. Однако длительная инкубация клеток в жестких селективных условиях негативно влияет на их способность к регенерации растений.

Другие схемы клеточной селекции предусматривают использование умеренных концентраций селективного фактора. При таком способе отбора происходит обогащение культуры устойчивыми клетками, степень обогащения зависит от продолжительности культивирования в селективных условиях. При менее жестком отборе клетки сохраняют способность к морфогенезу, но существует риск выживания не мутантных, а просто адаптированных клеток. Из-за этого получен-

ные из выживших каллусов растения не всегда являются устойчивыми. Такой «мягкий» способ клеточной селекции требует обязательного продолжения отбора на уровне растений.

В тех случаях, когда частота мутантных клеток в культуре очень низка, рекомендуют проводить «ступенчатую» селекцию, т.е. отбор на средах с постепенно повышающейся концентрацией селективного фактора. Популяция клеток, обогащенная устойчивыми формами на первых этапах селекции, лучше переносит жесткие условия отбора на последующих этапах.

Описанные схемы клеточной селекции могут быть проиллюстрированы конкретным примером. Для отбора растений кукурузы, толерантных к ионам кадмия, каллусы культивировали на селективных средах, содержащих 50 или 100 мг/л хлорида кадмия (рис. 1.23).

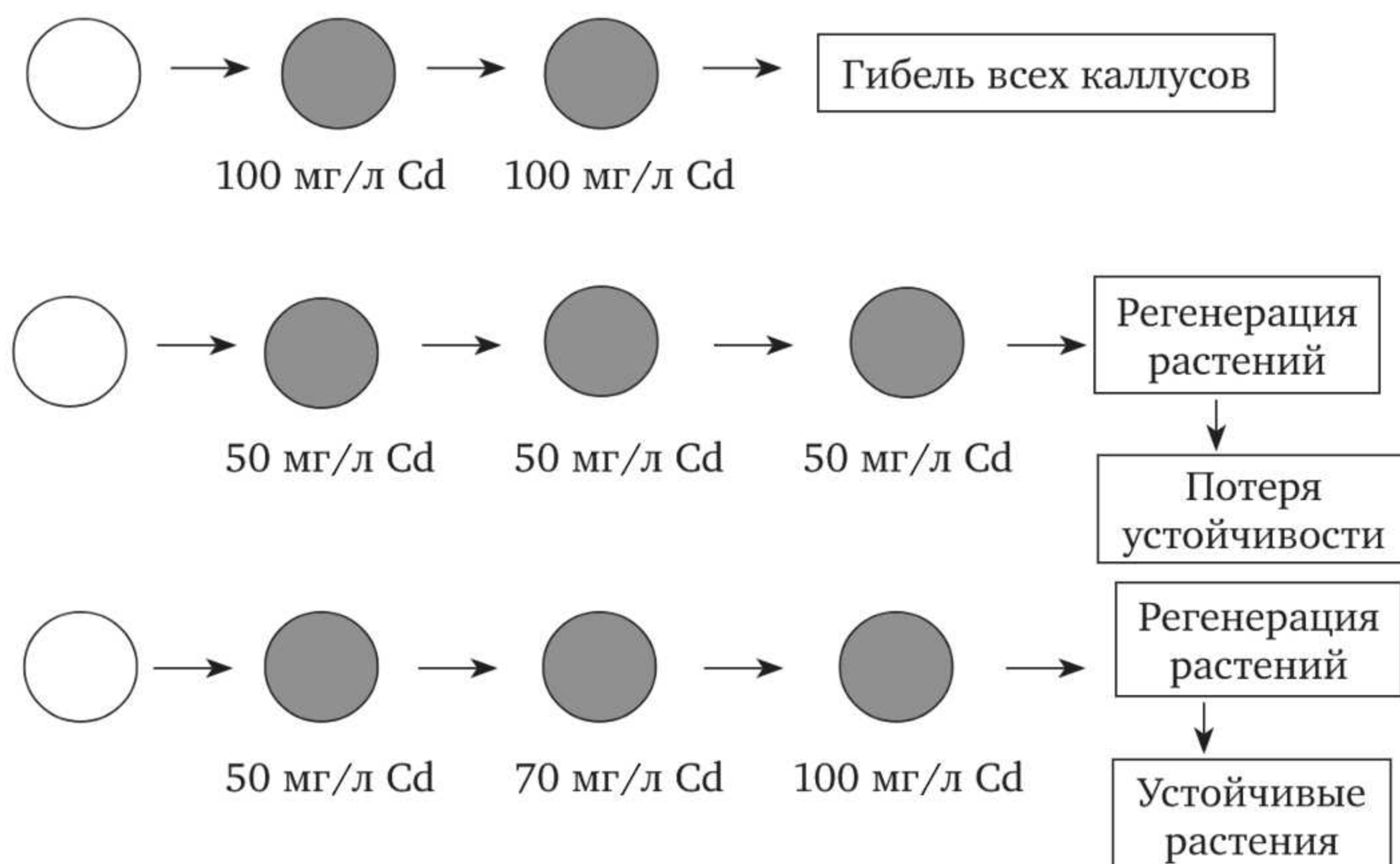


Рис. 1.23. Схемы различных способов отбора толерантных к ионам кадмия растений

На среде со 100 мг/л CdCl_2 все каллусы погибли. На среде с более низким содержанием кадмия выжило около 50% клеток. После трех месяцев селекции были отобраны растущие клоны. Однако регенерированные из них растения были так же чувствительны к тяжелому металлу, как и до селекции. Тогда был использован ступенчатый отбор: каллусы сначала инкубировали на среде с 50 мг/л кадмия, выжившие клоны пересаживали на среду с 70 мг/л кадмия, а выжившие на второй среде пересаживали на среду, содержащую 100 мг/л CdCl_2 . После трех циклов селекции осталось только 10% от начального числа каллусов, но полученные из них растения были значительно более устойчивы к кадмию, чем исходные.

Длительное культивирование в селективных условиях способствует более полной элиминации чувствительных клеток, и, следовательно, повышает надежность клеточной селекции. Однако следует учитывать,

что длительное культивирование *in vitro* отрицательно сказывается на морфогенетическом потенциале тканей, а также увеличивает риск появления нежелательных соматоклональных вариантов. Кроме того, частота соматоклональной изменчивости повышается при искусственной дестабилизации генома в результате использования селективных условий. Например, селекция на среде, содержащей фузариевую кислоту, привела к существенному увеличению доли аномальных форм среди регенерированных растений томатов. Аналогичные результаты получены и при сравнении соматоклонов гороха, полученных после культивирования на стандартной среде и на среде с гербицидами. Одной из причин ускорения изменчивости в селективных условиях считается окислительный стресс, сопровождающий любые неблагоприятные воздействия.

Для культур с высоким уровнем соматоклональной изменчивости можно рекомендовать кратковременное (1—3 месяца) выращивание в селективных условиях с последующей регенерацией растений. За это время происходит обогащение популяции устойчивыми клетками. Во многих случаях кратковременная селекция оказывается эффективнее продолжительной инкубации клеток в культуре. Например, выживаемость и рост при засолении регенерантов, полученных после трехмесячной инкубации каллусов риса на среде с NaCl, были лучше контроля, а растения, регенерированные из каллуса после восьми месяцев отбора, уступали исходным по солеустойчивости. Однако следует учитывать, что кратковременная селекция *in vitro* требует обязательного продолжения отбора на уровне растений. Очень эффективным является проведение этапа регенерации растений также в селективных условиях. Морфогенез значительно чувствительнее к стрессовым факторам по сравнению с ростом клеток, поэтому растения получают, главным образом, из устойчивых клеток.

Сохранение отселектированных признаков в ряду поколений

Очень важным является проявление признака устойчивости не только у регенерированных растений, но и сохранение его в ряду поколений. К сожалению, это бывает не всегда. Стабильно наследуются только те признаки, которые обусловлены мутациями. В результате клеточной селекции получено много растений со стабильным наследованием признаков, как при самоопылении, так и после скрещивания с другими образцами. В тех случаях, когда был проведен генетический анализ устойчивости к стрессам, показано расщепление, близкое к менделевскому моногенному. Так, устойчивость к пиклораму у полученных после клеточной селекции растений табака была обусловлена моногенной ядерной мутацией с промежуточным наследованием. С доминантной моногенной мутацией была связана устойчивость к ионам алюминия у табака и резистентность к оксипролину, сопровождающаяся повышенной морозоустойчивостью у пшеницы.

Следует учитывать, что растения-регенеранты, как правило, гетерозиготны, и в потомстве идет расщепление по данному признаку. Наилучшим способом закрепить ценное свойство является отбор в потомстве регенерантов гомозиготных по селектируемому признаку растений.

На современном этапе уже не вызывает сомнения возможность использования клеточной селекции для создания форм растений с улучшенными агрономическими показателями.

У многих видов, включая такие сельскохозяйственные культуры, как пшеница, кукуруза, рис, картофель, овес, кормовые травы и др., созданы исходные формы для селекции, характеризующиеся устойчивостью к абиотическим стрессам (табл. 1.8), болезням и вредителям (табл. 1.9), имеющие повышенное содержание белка, обогащенного незаменимыми аминокислотами.

Таблица 1.8

Толерантные к абиотическим стрессам исходные формы и сорта, полученные путем клеточной селекции

Признак	Объекты
Солеустойчивость	Картофель
	Ячмень
	Рис
	Пшеница
	Люцерна
	Клевер
Холодоустойчивость	Рис
	Пшеница
Толерантность к Al и кислым почвам	Ячмень
	Сорго
	Рис
Устойчивость к гербицидам	Рапс
	Сахарная свекла

Таблица 1.9

Устойчивые к болезням растения, полученные методом клеточной селекции

Возбудители болезней	Объекты
<i>Fusarium spp.</i>	Ячмень
	Люцерна
	Томаты
	Клевер
	Лен

Возбудители болезней	Объекты
<i>Helminthosporium spp.</i>	Пшеница
	Ячмень
	Кукуруза
	Овес
	Рис
<i>Corynebacterium sep.</i>	Картофель
<i>Pseudomonas syringae</i>	Кормовая свекла
<i>Phytophthora spp.</i>	Картофель
	Земляника

У томатов, сахарного тростника, риса, сорго, сои, люцерны, льна, сельдерея и некоторых других культур на базе соматклонов и растений, регенерированных из клеток после селекции *in vitro*, выведены новые сорта.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое биотехнология и каковы ее цели?
2. Перечислите основные виды объектов, используемые в биотехнологии.
3. Расскажите о клеточной инженерии растений и ее целях?
4. Что означает термин *in vitro*?
5. Перечислите основные этапы развития биотехнологии.
6. Что означает термин «тотипотентность клеток»?
7. Каков вклад Х. Фехтинга, С. Рехингера и Дж. Хаберландта в развитие биотехнологии?
8. Какие ученые разработали методы культивирования клеток растений в условиях *in vitro*?
9. Кто является основоположником метода клонального микроразмножения растений?
10. Перечислите основные направления использования культур изолированных клеток и тканей растений в биотехнологии?
11. Какой процесс определяет формирование каллусной ткани растений?
12. Какую роль выполняют ауксины и цитокинины при каллусогенезе?
13. Что происходит с клетками и тканями растений в процессе их дедифференциации?
14. Дайте определение каллусной ткани.
15. Какие существуют типы каллусных тканей?
16. Перечислите основные фазы роста клеток и расскажите о каждой из них.
17. Какие физиологические особенности, свойственные клеткам растения, сохраняются в условиях *in vitro*?
18. Расскажите о физиологической асинхронности клеточных культур растений.
19. Каковы причины генетической гетерогенности культур в системе *in vitro*?
20. Что такое гормоннезависимость клеточных культур растений?
21. Дайте определение суспензионным культурам клеток.

22. Какие основные условия требуются для культивирования клеточных суспензий?
23. Что такое «морфогенез» в условиях *in vitro*?
24. Расскажите о вторичной дифференцировке каллусной клетки?
25. Объясните роль гистогенеза в клеточных культурах растений.
26. Какие типы морфогенеза характерны для культур *in vitro*? Расскажите о них.
27. Какие условия необходимы для перехода клеток к морфогенезу?
28. Перечислите стадии формирования соматических эмбриоидов из каллусной клетки.
29. Дайте определение термина «клональное микроразмножение».
30. Какие преимущества характерны для метода клонального микроразмножения по сравнению с традиционными методами размножения растений?
31. Кто и когда впервые начал работы по клональному размножению растений и на каком объекте?
32. Перечислите основные этапы клонального микроразмножения растений и расскажите о них.
33. Расскажите о методах *in vitro*, которые используются для селекции растений.
34. Что такое «эмбриокультура» и для чего она используется?
35. Перечислите способы получения гаплоидов в условиях *in vitro*?
36. Какие приемы необходимо использовать при проведении клеточной селекции?
37. Какие условия необходимы для получения стабильно устойчивых линий клеточных культур?
38. Перечислите преимущества клеточной селекции в условиях *in vitro* по сравнению с обычными методами селекции?

Глава 2

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Составной частью биотехнологии является генная или генетическая инженерия. Она возникла в результате стремительного прогресса разных составных частей физико-химической биологии и является собранием технологий, использующих свойства клеток, например, их способность синтезировать различные вещества и заставляющих биологические молекулы, такие как ДНК и белки, работать на достижение целей, поставленных людьми.

Историю развития генетической инженерии можно условно разделить на три этапа:

Первый этап связан с доказательством принципиальной возможности получения рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*. Эти работы, касающиеся получения гибридов между различными плазмидами, были выполнены в начале 70-х годов прошлого века Гербертом Бойером и Стэнли Коэном. С помощью ферментов рестриктаз вырезался некий перспективный участок ДНК, прикреплялся к плазмидам, выделенным из бактерий, и такие сконструированные плазмиды доставляли гены в бактерию. Все эти манипуляции с использованием исходных молекул ДНК из различных видов и штаммов бактерий, получили название рекомбинантной ДНК-технологии.

Второй этап связан с началом работ по получению рекомбинантных молекул ДНК между хромосомными генами прокариот и различными плазмидами, доказательством их стабильности и жизнеспособности.

Третий этап — начало работ по включению в векторные молекулы (ДНК, используемые для переноса генов и способные встраиваться в генетический аппарат клетки-реципиента) генов эукариот, главным образом, животных.

Суть генной инженерии состоит в том, что процесс рекомбинации производится вне организма и таким образом преодолеваются все ограничения, с которыми сталкиваются ученые, используя приемы классической селекции. Сама генная инженерия возможна потому, что основными составляющими элементами всех живых существ являются клетки. Все клетки имеют сходную структуру, состоят из одних и тех же строительных материалов и функционируют за счет сходных, по существу, процессов. ДНК, являющаяся носителем наследственных признаков, содержит всю информацию, необходимую для синтеза белков, и управляет клеточными процессами, определяя, когда и какие белки

синтезируются. Все клетки «разговаривают» на одном и том же генетическом «языке». Содержащееся в ДНК одной клетки «руководство» может быть успешно прочитано и исполнено клетками других живых организмов. Это единообразие жизни на клеточном уровне и обеспечивает основу генетической инженерии.

Объектами генетической инженерии являются самые разнообразные биологические системы: микроорганизмы, клеточные линии насекомых, растений и млекопитающих, вирусы насекомых, растений и млекопитающих, многоклеточные организмы — выбор системы зависит от целей эксперимента. Однако во многих случаях именно генетически модифицированная самовоспроизводящая биологическая единица — микроорганизм, вирус, животное или растение — является конечным коммерческим продуктом генной инженерии.

Создание трансгенных растений

С давних времен человек методом искусственного отбора создавал сорта культурных растений для питания и других хозяйственных нужд. Такая селекция проводилась для увеличения продуктивности, плодovitости и урожайности, устойчивости к вредителям и заболеваниям, неблагоприятным условиям среды, для улучшения вкуса, внешнего вида, лежкости плодов и овощей, для повышения содержания белка в зерне и многого другого.

Современные методы генетики и селекции позволили многократно ускорить этот процесс, однако основой таких работ был геном только того вида, который использовался в селекционной работе, и все возможности всегда были ограничены этими рамками. В последние десятилетия XX века был предложен способ перешагнуть через этот барьер и придать культурным растениям и сельскохозяйственным животным свойства и признаки, которыми они не обладали ранее. Этот способ — **создание трансгенных или генно-модифицированных организмов. Генно-модифицированные организмы** (или организм) — это любые неклеточные, одноклеточные или многоклеточные образования, способные к воспроизводству или к передаче наследственного генетического материала, отличные от природных организмов, полученные с применением методов генной инженерии, и содержащие генно-инженерный материал, в том числе гены, их фрагменты или комбинации генов.

Возможность получать трансгенные растения существует в связи с тем, что растительные клетки обладают тотипотентностью, т.е. возможностью регенерации *in vitro* нормальных, фертильных растений из недифференцированных соматических тканей.

Для создания трансгенных растений необходимо иметь:

- 1) средства внедрения чужеродных генов в реципиентные растительные клетки (векторные молекулы);
- 2) гены, которые необходимо ввести в растение;

- 3) способы внедрения чужеродных генов;
- 4) методы доказательства трансгенности трансформированных растений (наличие в их геноме трансгена);
- 5) методы доказательства экспрессии трансгенов в природной селектируемой системе.

Векторные молекулы для трансформации растений. Для того чтобы донести рекомбинантную ДНК в клетку-реципиент, встроить ее в геном, позволить идентификацию трансформированных клеток, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена, служат векторные молекулы или векторы.

Вектор — молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. К векторам предъявляют определенные требования.

1. Векторы должны иметь область, чувствительную к определенной эндонуклеазе рестрикции, которая расщепляет вектор, как правило, в одном участке, превращая его кольцевую форму в линейную. К линейной ДНК с помощью ферментов лигаз «пришивают» ген или гены и затем снова замыкают ее в кольцо, и рекомбинантную ДНК вводят в клетки.

2. Вектор может реплицироваться в определенных клетках. Репликация осуществляется посредством специфического участка ДНК.

3. В составе векторной молекулы должен быть маркерный ген, который после проникновения вектора в клетку придает ей фенотип, свидетельствующий о присутствии вектора.

4. Гены, которые переносятся векторной молекулой, экспрессируются в трансформированных (трансфецированных) клетках, т.е. в векторную молекулу надо встроить также регуляторные и терминаторные последовательности.

Строение агробактерий. Удобный способ доставки чужих генов в растительные клетки был подсказан самой природой. Трансформация растений осуществляется с помощью почвенных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* (вызывающих образование опухолей в виде тератом или «корончатых галлов») и *Agrobacterium rhizogenes* (образующих опухоли в виде пучка корней — «hairy root» или, так называемые, «бородатые корни»). Как и у большинства других бактерий, часть их генома находится не в основной хромосоме, а в плазмидах. Например, *A. tumefaciens* штамм с58 имеет следующую хромосомную организацию: 2 м.п.н. линейной, 2.8 м.п.н. кольцевой хромосомы и 206.479 п.н. плазмиды). Ti-плазмиды (tumor-inducing, опухолеобразующие), найденные в *Agrobacterium tumefaciens* или Ri-плазмиды (root-inducing, корнеобразующие) в *Agrobacterium rhizogenes*, оказались подходящим инструментом для генной инженерии.

Агробактерии являются мезофильными обитателями почвы, среди них встречаются как сапрофитные (*A. radiobacter*), так и фитопатогенные (*A. tumefaciens*, *A. rubi*, *A. rhizogenes*, *A. vinis*) виды. Это короткие, подвижные грамотрицательные палочки с перитрихальными жгутиками.

Опухолевый рост у растений, индуцированный патогенными штаммами *Agrobacterium*, представляет собой особый случай паразитизма: паразит (агробактерия) изменяет обмен веществ у хозяина, вводя свою генетическую информацию в его геном. Такое явление получило название «**генетическая колонизация**». Этот процесс является уникальным примером горизонтального переноса ДНК между царствами — бактерий и высших растений. Ферментативный механизм растения, отвечающий за транскрипцию собственной ДНК и синтез белка, распознает чужеродную ДНК из бактерии как свою собственную и транскрибирует ее вместе с обычными растительными генами, синтезируя опины, вещества которые служат бактериям в качестве источника углерода и азота. Это создаёт селективные преимущества для агробактерий, так как только они имеют гены, ответственные за деградацию этих соединений. Опины являются не только субстратом катаболизма агробактерий, но и индуктором трансмиссивности Ti-плазмид, участвуя в индукции конъюгативного обмена плазмидами между агробактериями и в их переносе в близкородственные бактерии рода *Rhizobium*, т.е. способствуют распространению этих плазмид в популяции. В зависимости от типа синтезируемых опинов штаммы агробактерий подразделяются: *A. tumefaciens* на октопиновые и нопалиновые, а *A. rhizogenes* на маннопиновые, агропиновые и кукумопиновые.

В природе образование опухоли начинается с повреждения стебля растения у самой земли. От пораненных растительных клеток отделяются различные компоненты клеточной стенки (глюкоза, глюкуроновая кислота, галактоза, галактуроновая кислота, арабиноза, манноза, фукоза, целлобиоза и ксилоза), а также начинают синтезироваться специальные вещества — предшественники лигнина — ацетосирингон и гидроацетосирингон, способствующие заживлению раны. Патогены чувствительны ко всем этим веществам и начинают двигаться к поврежденному участку ткани по градиенту концентрации этих веществ со скоростью 60 мкм/сек, а затем прикрепляются к клеткам растения в местах повреждений. Бактериальные сайты связывания и рецепторы растений являются конститутивными, т.е. оба партнера обладают ими еще до момента взаимодействия. После прикрепления к поверхности клеток растения бактерии начинают образовывать целлюлозные фибриллы, которые видны при микроскопировании через 90 минут после добавления бактерий и к 10 часам инкубации формируют сеть, покрывающую поверхность растительных клеток. Фибриллы служат более прочному закреплению бактерий на поверхности хозяина. За целлюлозные фибриллы могут зацепиться свободно плавающие клетки бактерий, за счет чего увеличивается множественность заражения. Скопления бактерий на поверхности растения возрастают также в результате размножения.

Плотный контакт бактерий с плазмалеммой растительной клетки обеспечивается вследствие повреждения клеточных стенок пектолитическими ферментами, выделяемыми бактериями. Этот контакт необ-

ходим для передачи ДНК от бактерий в растительную клетку. Передача ДНК происходит без нарушения целостности мембраны растительной клетки, но требует определенного её состояния — компетентности. Она возникает вследствие связывания имеющихся в экссудатах углеводов с периплазматическим доменом бактериального рецептора, который представляет комплекс с белком-продуктом бактериального хромосомного вирулентного гена *ChvE*.

В геноме *A. tumefaciens* находится три генетических локуса, необходимых для трансформации растительной клетки. Один локализован на агробактериальной хромосоме, а другие два на Ti-плазмиде. Первый компонент системы трансформации — это Т-ДНК (от англ. *transferred DNA*, т.е. «переносимая ДНК») переносимая в растение часть Ti-плазмиды, на которой локализованы гены синтеза ферментов, вызывающие формирование опухолей на растении, а также гены синтеза опинов. В отличие от транспозонов, Т-ДНК после встраивания не может переноситься вторично, так как не несет генов, ответственных за перенос.

Вторая — это *vir*-система (*vir* — *virulence inducing region*, область регулирующая вирулентность), кодирующая гены, контролирующие синтез и перенос Т-ДНК в растение. Она находится за пределами Т-ДНК и не переносится в растительную клетку. *Vir*-гены экспрессируются под воздействием сигнальных молекул. Кластер *vir*-генов состоит из 6—7 генов в зависимости от штамма агробактерии. Например, в Ti-плазмиде нопалинового типа в области *vir* локализовано шесть различных групп комплементации *virA*, *virB*, *virC*, *virG*, и *virD*, *virE*, организованных в единый регулон. Октопиновая Ti-плазида *Arh 5* имеет дополнительный локус *virF*, расположенный справа от локуса *virE*.

Белки этих генов обеспечивают отделение Т-ДНК от Ti-плазмиды. Регуляторная система, контролирующая экспрессию генов *vir*, работает следующим образом — экспрессируемый конститутивно ген *vir A* выполняет функцию рецепции комплекса белка *ChvE* и передает этот сигнал в бактериальную клетку. Этот мембранный хеморецептор после принятия внешнего сигнала активирует продукт гена *virG*, который в свою очередь выступает в качестве позитивного регулятора собственной транскрипции и транскрипции остальных генов *vir*. Индукция *vir* генов обратимая, и каскад реакций может быть прерван, что очень важно для патогена: в случае, если хозяин больной и нежизнеспособный организм, то перенос Т-ДНК в его клетки не осуществляется.

После активации *vir*-генов в оболочке бактерии образуется разрыв, через который Т-ДНК переносится в растительную клетку. (Похожим образом у бактерий происходит половой процесс, когда микробы просто обмениваются копиями плазмид.)

На Ti-плазмиде находятся также гены, кодирующие ферменты катаболизма опиона и сайт инициации репликации (*ori*), который обеспечивает стабильное поддержание плазмиды в агробактериях и запускается путем самозапуска (*quorum sensing system*) при достижении концентрации клеток в бактериальной популяции определенного порога.

У агробактерий, кроме того, имеются бактериальные хромосомные гены, продукты которых также участвуют в процессе трансформации. Это третий компонент *vir*-системы переноса Т-ДНК в растения. К нему относятся *chrV*-гены (*chromosomal virulence*): *chvA*, *chvB*, *chvE*, *chvD*, *chvG*, *chvI*, а также несколько других хромосомных генов — *miaA*, *ros*, *pscA*, *ivr*. В отличие от плазмидных, хромосомные гены экспрессируются конститутивно.

Продукты первых трех хромосомных генов влияют на поверхностные свойства агробактерий и определяют способность агробактерий прикрепляться к поверхности растительной клетки.

Т-ДНК, являясь фрагментом *Ti*-плазмиды, ограничена двумя прямыми повторами из 25 нуклеотидов, которые «обманывают» ферменты растительной клетки, заставляя их принять Т-ДНК за родную и встраивать ее в собственный геном. Правый конец обозначается П (RB — right border), левый соответственно Л (LB — left border). В этой области сайт-специфические эндонуклеазы, кодируемые *vir*-областью, производят одноцепочечный разрыв, служащий началом репликации по типу разматывающегося рулона, происходящей в процессе транспорта плазмиды. Репликация обеспечивает сохранение плазмиды в материнской клетке и появление ее копии в дочерней. Для нормального процессинга Т-ДНК и переноса в растительную клетку особенно важна ее правая граница, которая одна может определять полярность переноса Т-ДНК. Удаление правой границы из *Ti*-плазмид делает агробактерии полностью авирулентными. Замена ее на искусственно синтезированную, так же как и на левую, восстанавливает вирулентность бактерии. ДНК, помещенная между этими границами, может быть перенесена и встроена в ядро растительной клетки. Максимальный размер фрагмента ДНК, который может быть перенесен, пока не определен.

После переноса в ядро растительной клетки, Т-ДНК встраивается в геном в виде одной или нескольких копий. При этом одна из нитей плазмидной ДНК деградирует, а другая за счет рекомбинации с гомологичным участком ДНК клетки-хозяина может включиться в хромосому или внехромосомную единицу.

Как уже упоминалось ранее, в Т-ДНК в зависимости от типа *Ti*-плазмиды находится от семи до тринадцати генов, ответственных за опухолевый фенотип. Гены 1 и 2 (*iaaMn* и *iaaH* [*tms1* и *tms2*]) кодируют ферменты, принимающие участие в синтезе растительного гормона ауксина (индолилуксусной кислоты), в то время как ген 4 (*tmr* известный также как ген *ipt*), кодирует изопентенилтрансферазу, синтезирующую цитокинин изопентенила аденозин 5'-монофосфат. Эти ферменты начинают синтезироваться за счет клеточных механизмов синтеза белков. Одновременная транскрипция генов 1, 2 и 4 приводит к повышению уровня фитогормонов внутри трансформированных клеток. Результатом этого является повышение митотической активности и образование опухолей. Другие гены Т-ДНК кодируют синтез опинов, представляющих собой производные аминокислот и сахаров.

У Ri-плазмид имеются общие черты с Ti-плазмидой, в том числе гомологичная *vir*-область. На ее T-ДНК имеются гены, кодирующие опины и два гена синтеза ауксина, которые в значительной мере гомологичны ауксиновым генам *tms1* и *tms2*. Однако эти гены в индукции корнеобразования «hairy root» играют вспомогательную роль, а основную роль играют гены *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*, не имеющие гомологии ни с одним из генов T-ДНК *A. tumefaciens*.

В начале 80-х годов различными группами исследователей Ti- и Ri-плазмиды были модифицированы путем удаления онкогенов (генов синтеза фитогормонов и опинов) из области T-ДНК. Из агробактериальных плазмид была также удалена вся лишняя ДНК, не нужная при клонировании и был добавлен сайт инициации репликации, вырезанный из плазмиды кишечной палочки *E. coli*, чтобы можно было в ней клонировать плазмиды. Такие модифицированные плазмиды называли «обезоруженными». После переноса с их помощью ДНК в ядро растительной клетки нормальный рост растения не нарушался. На место удалённых онкогенов в T-ДНК встраивают нужные гены: один или несколько целевых и не менее двух маркерных, которые позволяют отобрать сначала клетки кишечной палочки, а потом растительные, в которых перенос генов прошел удачно — ген устойчивости к определенному антибиотику или кодирующий светящийся белок, и т.п.

Все такие работы по конструированию векторных плазмид проводят с помощью специальных ферментов.

Ферменты, используемые в генетической инженерии

При конструировании векторных плазмид используют специальные ферменты, которые можно подразделить на несколько групп:

- 1) ферменты, с помощью которых получают фрагменты ДНК (рестриктазы);
- 2) ферменты, синтезирующие ДНК на матрице ДНК (полимеразы) или РНК (обратные транскриптазы);
- 3) ферменты, соединяющие фрагменты ДНК (лигазы);
- 4) ферменты, позволяющие осуществлять изменение структуры концов фрагментов ДНК.

Рестриктазы. Для выделения фрагментов ДНК используют ферменты, которые специфически расщепляют молекулы ДНК, — бактериальные *эндонуклеазы рестрикции* (*рестриктазы*).

Все рестрикционные эндонуклеазы узнают специфические, довольно короткие последовательности ДНК и связываются с ними. Этот процесс, определяемый типом фермента, сопровождается разрезанием молекулы ДНК, либо в самом сайте узнавания (последовательности, которые распознаются эндонуклеазами и в которых происходит расщепление молекулы ДНК), либо в каком-то другом сайте.

Различают 3 основных класса рестриктаз. Рестриктазы 1-го класса осуществляют разрывы в произвольных точках молекулы ДНК, а рестриктазы

2-го и 3-го классов узнают и расщепляют ДНК в строго определенных точках внутри сайтов узнавания или на фиксированном от них расстоянии. В генной инженерии используются исключительно ферменты 2-го класса, которые узнают последовательности, содержащие от 4 до 6 нуклеотидных пар, поэтому рестриктазы делят на мелко- и крупнощепящие.

Мелкощепящие рестриктазы узнают тетрануклеотид и вносят в молекулы гораздо больше разрывов, чем крупнощепящие, узнающие последовательность из шести нуклеотидных пар. Это связано с тем, что вероятность встречаемости определенной последовательности из четырех нуклеотидов гораздо выше, чем последовательности из шести нуклеотидов.

Если сайт рестрикции окажется внутри гена, то обработка ДНК-рестриктазой приведет к его инаktivации. Вероятность такого события очень велика при обработке мелкощепящими рестриктазами и незначительна при применении крупнощепящих эндонуклеаз. Поэтому с целью получения неповрежденного гена расщепление проводят поочередно несколькими крупнощепящими рестриктазами, либо применяют прием «недорестрикции», т.е. рестрикцию проводят в таких условиях, когда происходит расщепление лишь в одном сайте.

В настоящее время выделено более 500 рестриктаз класса 2. Для их обозначения используются сокращенные названия микроорганизмов — продуцентов. Род микроорганизма обозначается прописной буквой, а вид — двумя строчными; штамм обычно не указывается. Римские цифры — порядковый номер данной эндонуклеазы в ряду прочих рестриктаз, выделенных из данного микроорганизма. Например, *HpaI* и *HpaII* — это соответственно первая и вторая рестрицирующие эндонуклеазы класса 2, выделенные из *Haemophilus parainfluenzae*.

Одна из самых употребляемых в генной инженерии рестриктаза *EcoRI* — это эндонуклеаза, выделенная из *Escherichia coli*. Подобно многим другим рестриктазам, этот фермент расщепляет ДНК по *палиндромной последовательности*, т.е. короткому сегменту ДНК, в котором обе цепи при считывании в направлении 5'→3' имеют одинаковую последовательность. Для *EcoRI* это последовательность 5'-GAATTC-3'. *EcoRI* расщепляет фосфодиэфирные связи обеих цепей между G и A. Разрывы в цепи ДНК располагаются наискось друг от друга, в результате чего образуются одноцепочечные комплементарные концы с «хвостами» из четырех нуклеотидов в каждом («липкие» концы). Каждый одноцепочечный «хвост» заканчивается 5'-фосфатной группой, а 3'-гидроксильная группа противоположной цепи как бы утоплена. Эти комплементарные «липкие» концы (AATT), удерживаются вместе за счет спаривания оснований. Их, однако, можно легко отделить друг от друга путем небольшого нагревания. При охлаждении липкие концы гибридизуются вновь в правильной ориентации.

Помимо рестриктаз, гидролизующих (расщепляющих) полинуклеотидную цепь с образованием «липких» концов, существуют рестриктазы, которые вносят разрывы в цепи строго друг против друга с образованием фрагментов ДНК с «тупыми» концами. Сайты узнавания

для них могут состоять из четырех, пяти, шести, восьми или более пар нуклеотидов.

Обработка образца ДНК определенной рестриктазой всегда дает один и тот же набор фрагментов — при условии, что расщепление происходит по всем сайтам узнавания. Если использовать несколько ферментов рестрикции и сначала обработать ДНК каждой из рестриктаз в отдельности, а затем их комбинациями, можно построить физическую карту данной ДНК, т.е. установить порядок следования сайтов рестрикции вдоль молекулы. Определив размер полученных фрагментов с помощью гель-электрофореза, можно найти положение рестрикционных сайтов.

ДНК-лигаза. Создание рекомбинантных ДНК было бы невозможно без использования рестрицирующих эндонуклеаз. Однако одних только ферментов рестрикции недостаточно для осуществления молекулярного клонирования. Водородные связи между теми четырьмя основаниями, которые образуют липкие концы, недостаточно прочны, чтобы удержать два объединившихся фрагмента ДНК. Устранение разрывов в сахарофосфатном остове молекулы, т.е. восстановление связи между 3'-гидроксильной концевой группой одной цепи и 5'-фосфатной группой другой, проводят ферментом *ДНК-лигазой* бактериофага Т4, которую открыли в 1961 г. Мезельсон и Вейгл. Лигаза фага Т4 универсальна, так как помимо лигирования «липких» концов способна катализировать реакцию воссоединения двухцепочечных фрагментов ДНК с «тупыми» концами, которые сближаются друг с другом после того, как объединяемые фрагменты связываются с ферментом.

Обратная транскриптаза (ревертаза). При конструировании векторных молекул используется также фермент, синтезирующий ДНК на матрице РНК, который называется *обратная транскриптаза* или *ревертаза*.

При изучении ретровирусов, геном которых представлен молекулами одноцепочечной РНК, было обнаружено, что в процессе внутриклеточного развития ретровирус проходит стадию интеграции своего генома в виде двухцепочечной ДНК в хромосомы клетки-хозяина. В 1964 г. Темин выдвинул гипотезу о существовании вирусспецифичного фермента, способного синтезировать на РНК-матрице комплементарную ДНК. В 1970 г. Темин с Мизутани, а также независимо от них Балтимор, открыли искомый фермент в препарате внеклеточных вирионов вируса саркомы Рауса. Данная РНК-зависимая ДНК-полимераза получила название *обратная транскриптаза*, или *ревертаза*. Она обладает, по крайней мере, тремя ферментативными активностями:

- 1) ДНК-полимеразной, использующей в качестве матрицы как РНК, так и ДНК;
- 2) активностью РНКазы Н, гидролизующей РНК в составе гибрида РНК—ДНК, но не одно- или двухцепочечную РНК;
- 3) ДНК-эндонуклеазной активностью.

Очищенная обратная транскриптаза синтезирует ДНК как на РНК-, так и на ДНК-матрицах.

Ферменты, позволяющие осуществить изменение структуры концов фрагментов ДНК. Полимеразы. Впервые ДНК-полимераза была выделена Корнбергом с сотрудниками в 1958 году из *E. coli*. ДНК-полимераза I *E. coli* (Pol I) не связывается с молекулами двухцепочечной кольцевой ДНК, а только с одноцепочечными формами, полученными после денатурации. Фермент состоит из мономерной полипептидной цепи с молекулярной массой 103 кДа и имеет 3-х доменную структуру. Каждый домен обладает своей ферментативной активностью: 5'—3' полимеразной, 3'—5' экзонуклезной и 5'—3' экзонуклеазной.

Для целей генетической инженерии часто используют, так называемый, фрагмент Кленова, состоящий из полимеразы и 3'—5' экзонуклеазы. Фрагмент Кленова (Pol 1K) обычно используют для достройки одноцепочечных 5'-концов на двухцепочечной ДНК, часто генерируемых рестриктазами, до тупых; для синтеза второй цепи на одноцепочечной ДНК, а также для гидролиза одноцепочечных 3'-концов на двухцепочечных молекулах ДНК.

Другая полимераза поли (А) — полимеразы *E. coli* была открыта в 1973 году Сиппелом. Она катализирует присоединение к 3'-ОН концу одноцепочечных молекул РНК поли (А) последовательностей. Применяется при подготовке молекул РНК к копированию с них комплементарной ДНК для введения радиоактивной метки в 3'-конец РНК.

Терминальная трансфераза (концевая дезоксинуклеотидилтрансфераза)

Фермент был обнаружен Боллумом в 1962 году в тимусе теленка. Его субстратом при использовании в качестве кофактора ионов Mg^{2+} является одноцепочечная ДНК с 3'-ОН концом или двухцепочечная ДНК с выступающим одно цепочечным 3'-ОН концом. Если в качестве кофактора используются Co^{2+} , этот фермент может катализировать присоединение дезоксинуклеотидов к 3'-ОН концу двухцепочечной ДНК с тупыми концами. При введении в реакцию, направляемую терминальной трансферазой, дезоксинуклеотидов лишь одного типа образуются молекулы ДНК, имеющие гомополимерные 1-цепочечные 3'-концы. Таким же образом можно достроить другим молекулам ДНК гомополимерные 3'-концы, комплементарные первым. Смешение полученных препаратов ДНК при определенных условиях может приводить к формированию гибридных молекул ДНК. Именно с помощью концевой дезоксинуклеотидилтрансферазы в 1972 г. был выполнен первый эксперимент по рекомбинации молекул ДНК *in vitro*.

Конструирование рекомбинантных ДНК

Для конструирования рекомбинантной ДНК, содержащей в своем составе ген, который должен экспрессироваться, придерживаются следующей стратегии. На матрице РНК с помощью обратной транскрип-

🔥 VIDEO BOOM 🔥 **Жинсий алока ҳа**

тазы синтезируют комплементарную ДНК (кДНК) или из клонотеки (библиотека клонов — коллекция клонов) выделяют клетки, несущие фрагмент генома с нужным геном, и клонируют их в соответствующем векторе. Фрагменты геномной ДНК подвергают модификации — удаляют из них некодирующие области и участки соседних генов. Часто для проведения этой операции необходимо секвенирование данного фрагмента ДНК. Ген встраивают в специальный вектор для экспрессии, содержащий различные **регуляторные элементы** (промоторы, терминаторы и др.), которые обеспечивают экспрессию после введения рекомбинантной плазмиды в клетку.

Промоторы — последовательности ДНК, расположенные перед началом структурного гена и определяющие степень активности РНК-полимеразы. Выбор промотора при создании трансгенных конструкций имеет особое значение. Существует общая закономерность: прокариотические промоторы могут обеспечить активность любого гена, в том числе и эукариотического, только в прокариотическом организме. В эукариотическом организме может функционировать только ген, имеющий эукариотический промотор. Поэтому при переносе генов от одного вида растений к другому можно использовать гены с их собственными промоторами. Но если в растительную клетку переносится бактериальный ген, то его прокариотический промотор должен быть заменен соответствующим эукариотическим. Для растений часто используют промоторы от растительных вирусов, которые эволюционно приспособлены работать в растительной клетке.

Промотор может быть сильным и слабым. Сильный промотор инициирует синтез мРНК часто, слабый — гораздо реже. При этом очень важно при конструировании вектора не изменить последовательность оснований промотора, которая определяет частоту инициации синтеза мРНК. Замена одного основания в этой последовательности может привести к уменьшению частоты инициации в 1000 раз.

Регуляторные промоторные системы подразделяются на:

а) *конститутивные* — действующие во всех тканях организма. К наиболее сильным конститутивным промоторам для экспрессии в растениях относится 35S промотор вируса мозаики цветной капусты (p35SBMЦК — p35SCaMV). Он функционирует во всех растительных тканях в течение всей жизни растения;

б) *специфические* — действующие в определенных тканях или классах растений или животных. Например, промоторы, контролирующие экспрессию в клетках на определенных стадиях роста и развития растения или работающие только в фотосинтезирующих тканях (промотор гена малой субъединицы фотосинтетического фермента рибулозо-бисфосфат-карбоксилазы [pРБФК]). Для экспрессии чужеродных генов в однодольных могут использоваться промоторы *Ubi1* кукурузы и *Act1* риса;

в) *индуцибельные* — работающие при определенных условиях: температуры, освещения, концентрации фитогормонов и т.д., например, салицилат-индуцируемый промотор, промотор эндопептидазы,

промотор теплового шока сои. Такие промоторы используются в тех случаях, когда исследователь ставит задачи достичь тонкой регуляции активности трансгенов в пространстве (в определенных тканях) и времени (в определенный период развития). Многие из таких промоторов достаточно универсальны, например, некоторые промоторы генов теплового шока. В частности, промотор гена *hsp70* из дрозофилы равно эффективен и в клетках растений. Особый интерес представляют промоторы, индуцируемые низкомолекулярными химическими эффекторами, часто не свойственными растениям. В зависимости от типа промотора, индукторами могут служить тетрациклин, дексаметазон, бензотиадиазол, этанол, ионы меди и другие соединения. Эти промоторы очень важны для фундаментальных исследований трансгенных растений, позволяя четко дифференцировать первичные и вторичные эффекты изучаемого гена и тем самым прояснить его истинную биологическую функцию. Они перспективны также для биотехнологии, так как позволяют вызвать экспрессию гена в заданный период, когда она уже либо не препятствует нормальному росту и развитию растения, либо не вызывает иных отрицательных последствий.

Регулируемые извне индуцибельные промоторы, контролирующие соответствующие гены, могут способствовать одновременному прохождению растениями основных стадий онтогенеза (переход к цветению, опадение листьев и др.), что важно для практики сельского хозяйства. Существует промотор, индуцирующийся при механическом стрессе (поранении) или при обработке растений элиситорами. Использование такого промотора, соединенного с целевым геном, дает возможность выращивать трансгенные растения как обычные вплоть до стадии уборки урожая, а далее срезка растений индуцирует экспрессию целевого гена, продукт которого накапливается в собранной биомассе.

Терминаторы. В векторе должна также обязательно присутствовать терминаторная нуклеотидная последовательность, расположенная на 3'-конце трансгена. Добавление терминаторов транскрипции предотвращает нежелательное прохождение через трансген РНК-полимеразы, если промотор хозяйского генома случайно оказывается поблизости от места встраивания. При концевом добавлении сравнительно коротких (>300 п.н.) участков связывания ядерного матрикса (МАР) трансген имеет больше шансов образовать независимую петлю хроматина или включиться в состав транскрибируемого эухроматина. В обоих случаях это приводит к повышению и стабилизации уровня экспрессии трансгена. Для растений часто используется терминаторная последовательность гена нопалин-синтазы из *Agrobacterium tumefaciens*.

Другие элементы. Кроме промотора, экспрессию чужеродных генов могут усиливать другие элементы, например, **модуляторы**, а также **энхансерные последовательности**, действующие независимо от своего положения относительно кодирующей части гена и состояния начальной точки синтеза РНК. Они расположены на расстоянии от одного до нескольких сотен нуклеотидов до промотора.

Схема конструирования рекомбинантных плазмид. Никакого единого, универсального набора методик по конструированию рекомбинантных плазмид не существует, но чаще всего их проводят по следующей схеме:

1) из организма — донора нужных генов — экстрагируют нативную ДНК (клонлируемая ДНК, встраиваемая ДНК, ДНК-мишень, чужеродная ДНК);

2) подвергают ее ферментативному гидролизу (расщепляют, разрезают) и соединяют (лигируют, сшивают) с другой ДНК (вектор для клонирования, клонирующий вектор) с образованием новой, рекомбинантной молекулы (конструкция «клонлирующий вектор-встроенная ДНК»).

Создание векторов на основе Ti-плазмид. Неонкогенные векторы на основе плазмид агробактерий бывают 2-х типов: цис или транс, в зависимости от того, находится ли Т-ДНК на том же репликоне, что и *vir*-гены, или на отдельной плазмиде.

В первом случае (цис-действующие *vir*-гены) вектор называют **коинтегративным**, а во втором случае при использовании транс-действующих *vir*-генов, его называют **бинарным**.

Бинарные векторы конструируют на основе плазмид, содержащих последовательности границ Т-ДНК и способных реплицироваться как в *E. coli*, так и в агробактерии, поскольку содержат сайты инициации репликации (*ori*) и для *E. coli*, и для *A. tumefaciens*. Эти векторы устроены таким образом, чтобы последовательности границ фланкировали множественные сайты для клонирования, позволяющие осуществить вставку чужеродной ДНК, и маркеры, обеспечивающие прямую селекцию трансформированных растительных клеток. Бинарные векторы варьируют по размерам, стабильности репликации в агробактериях, наличию рестрикционных сайтов для встраивания чужеродной ДНК, наличию маркерных генов для селекции трансформированных растений и селекции трансконъюгатов.

Для получения коинтегративного вектора используют плазмиду-помощницу, которая способна реплицироваться в *E. coli*. Чужеродные гены клонируют в ней, а затем путем рекомбинации между соответствующим штаммом агробактерии и *E. coli* создают коинтегративный вектор.

Оба вектора несут селективный маркерный ген, который используется либо в *E. coli*, либо в *A. tumefaciens*, правую фланкирующую последовательность Т-ДНК (П), растительный селективный маркерный ген, ген, который нужно ввести в геном, и фрагмент Ti-плазмиды, гомологичный участку ДНК неонкогенной Ti-плазмиды.

Получение генов

Ген, которым хотят протрансформировать растение, чтобы придать ему новые свойства, носит название ген интереса или целевой ген.

В растения можно встраивать практически любой ген из любого организма прокариотического или эукариотического.

Гены возможно получить несколькими путями: выделением из ДНК, химико-ферментным синтезом и ферментативным синтезом.

Во многих случаях гены выделяют из растений, у которых просеквенирована, т.е. определена последовательность геномов и известны функции многих генов. Так, к настоящему времени полностью просеквенированы геномы *Arabidopsis thaliana*, который является модельным объектом во множестве исследований, а также риса, табака и ряда других растений. Это могут быть и бактериальные гены, так как геномы многих бактерий секвенированы, и гены, выделенные из животных клеток.

Выделение генов из ДНК проводят с помощью рестриктаз. Однако метод имеет существенные недостатки, так как достаточно трудно подобрать действие ферментов для строгого вычленения нужного гена. Вместе с последовательностью его нуклеотидов захватываются «лишние» нуклеотиды или, наоборот, ферменты отрезают часть гена, превращая его в функционально неполноценный.

Зная первичную структуру белка, синтез которого кодирует желаемый ген, можно применить химико-ферментный синтез с использованием синтезаторов ДНК. Этот метод позволяет точно воссоздать нужную последовательность нуклеотидов, а также вводить в гены участки узнавания рестриктаз, регуляторных последовательностей и пр.

Кроме того, ген можно создать с помощью обратной транскрипции РНК, выделенной из соответствующего организма. Ферментативный синтез гена на основе выделенной матричной РНК, (мРНК) является в настоящее время наиболее распространенным методом. Вначале из клеток выделяют мРНК, среди которых присутствует мРНК, кодируемая геном, который требуется выделить. Затем в подобранных условиях на выделенной из клетки мРНК, как на матрице, с помощью обратной транскриптазы (ревертазы) синтезируется нить ДНК, комплементарная мРНК (кДНК), на которой синтезируется вторая нить ДНК с использованием ДНК-полимеразы или ревертазы.

Введение в клетку чужеродной ДНК

При введении чужеродной ДНК различают процессы трансформации и трансфекции. **Трансформацией** называется процесс введения вектора в клетку, вызывающий в ней наследственные изменения. **Трансфекцией** называется процесс инфицирования клеток с помощью чужеродных ДНК, не приводящий к наследственным изменениям в клетке.

Эффективность проникновения экзогенной ДНК в клетку низкая. Из каждых 10^4 — 10^5 плазмид в клетки попадает только одна. Поэтому среди клеток, подвергшихся трансформации, только небольшая часть оказывается трансформированной. При высеве всех клеток на селективную среду, содержащую какие-либо специальные добавки (в основном антибиотики), только клетки, содержащие встроенные гены, начинают

делиться и образуют колонии, которые называются клоном, а сам процесс клонированием. Отбор по определенному биологическому признаку, в частности по устойчивости к антибиотику, называется селекцией.

В настоящее время применяются 2 основные группы методов переноса ДНК в клетки растений: прямые и агробактериальные.

Прямой перенос ДНК в растительную клетку

При этом способе используются различные методы: электропорация, бомбардировка, микроинъекции, воздействие полиэтиленгликоля (ПЭГ), поливинилового спирта или ионов Са, и высокого pH. Эти методы трудоемки и дорогостоящи, однако в некоторых случаях без них никак не обойтись.

В некоторых из этих методов (электропорация, воздействие ПЭГ, поливинилового спирта или ионов Са и высокого pH) в качестве объекта для введения ДНК используются протопласты — клетки, лишенные клеточной стенки. Их получают, воздействуя на растительную ткань растворенными в осмотике ферментами, разрушающими пектин и целлюлозу — пектиназой (мацерозимом) и целлюлазой. Осмотик, в качестве которого используются или многоатомные спирты (маннитол или сорбитол) или сахара (глюкоза или сахароза), необходим, чтобы протопласт после «переваривания» клеточной стенки не разрушился. После всех манипуляций протопласты высевают на питательную среду, где они образуют клеточную стенку, делятся и формируют колонии, из которых в дальнейшем могут образоваться трансформированные растения-регенеранты.

Электропорация — основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран. В среду для электропорации добавляют протопласты и плазмидную ДНК, которую необходимо ввести в клетки. Через среду пропускают высоковольтные импульсы (напряжение 200—350 В, длительность импульса 30—60 мс), приводящие к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы молекулы ДНК, могли из внешней среды войти в клетку в результате действия осмотических сил. При этом объем клетки увеличивается. Напряженность электрического поля и продолжительность его действия, концентрации трансформирующей ДНК и реципиентных клеток для каждой системы клеток подбирают экспериментально, с тем, чтобы достичь высокого процента поглощения ДНК выжившими клетками. Показано, что в оптимальных условиях электропорации количество трансформантов может достигать 80% выживших клеток.

Трансформация протопластов с помощью ПЭГ, ионов Са и высокого pH. Раствор ПЭГ добавляют к суспензии протопластов, смешанных с плазмидой и инкубируют в течение 20—30 мин. При другом способе в суспензию протопластов в растворе CaCl_2 добавляют щелочь, создавая pH 10—12, и выдерживают в этих условиях 15—20 мин. После таких обработок протопласты отмывают центрифугированием и высевают на питательные среды.

ПЭГ и ионы Са воздействуют на плазматическую мембрану, окружающую протопласты, удаляя с неё положительный заряд, отталкивающий молекулы ДНК. На нейтрально заряженную мембрану прикрепляется плазмидная ДНК и проходит в клетку за счет пиноцитоза — формирования пузырьков, окруженных липидной мембраной, в которых находятся молекулы ДНК. В клетке липидная оболочка растворяется и ДНК встраивается в геном клетки.

Трансформация с помощью биологической баллистики (/ биолистики / бомбардировки). Метод биологической баллистики (биолистики), несмотря на свою сложность, является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов (из прямых) трансформации растений, особенно однодольных растений. Суть метода заключается в том, что на мельчайшие частички инертного металла (вольфрам, титан, золото), диаметром 0,6—1,2 мкм, прикрепляется ДНК вектора, содержащего необходимую для трансформирования генную конструкцию. Металлические частички, несущие ДНК, наносят на пластиковую пулю и помещают внутрь биолистической (генетической) пушки на расстоянии 10—15 см над растительной тканью-мишенью. В пушке вакуумным насосом уменьшается давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления частички металла с огромной скоростью выбрасываются из специального отверстия, над которым помещается пуля, и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядро клеток.

Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру, погибают из-за огромного количества и давления металлических частиц, в то время как в зоне 0,6—1 см от центра находятся наиболее удачно протрансформированные клетки. Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации. Несомненным достоинством этого метода является то, что при его использовании могут быть трансформированы не только ядерные, но и органелльные геномы, чего не удастся осуществить другими методами.

Трансформация микроинъекцией. При этом способе каждый отдельный протопласт прикрепляют на специальную подложку и с помощью супертонкой стеклянной иглы впрыскивают в него векторную ДНК. Затем протопласты отделяют от подложки и помещают в питательную среду, где они после образования клеточной стенки могут делиться, образуя микрокалусы, из которых в дальнейшем может регенерировать растение. Метод в настоящее время почти не используется из-за большой трудоемкости.

Перенос ДНК с помощью агробактерий

Другая, наиболее распространенная группа методов—трансформация с помощью *A. tumefaciens* или *A. rhizogenes*, имеющих генно-модифицированные плазмиды Ti или Ri.

Трансформация *in vitro*. При агробактериальных методах переноса используется, как правило, метод совместного культивирова-

ния эксплантов в течение некоторого времени (обычно 2—3 суток) с суспензией агробактерии (co-cultivation), а затем экспланты переносят для регенерации каллуса или прямого побегообразования на среду, содержащую антибиотики для подавления роста бактерий. Экспланты, используемые в таких экспериментах по трансформации, могут быть двух видов: большими гетерогенными или малыми гомогенными. Большие экспланты — это, как правило, участки органов, содержащих огромное число клеток: листья и стебли, сегменты гипокотилей и семядольные листья проростков, соцветия и различные части цветка, сегменты корней. Малые экспланты — микроспоры и проэмбрио, а также одиночные клетки, образовавшиеся из протопластов.

Этот метод достаточно универсален и пригоден для многих видов растений, хорошо образующих регенеранты. Таким способом к настоящему времени получено большинство трансгенных растений различных генотипов. Однако сложностей хватает и при использовании агробактериальной трансформации. Основными трудностями являются — отсутствие универсальных методов переноса генов в клетку, сложность получения соответствующих систем культуры тканей и регенерации растений, необходимость подбора соответствующего штамма агробактерии. Успех получения трансгенных растений зависит от множества факторов, поэтому в каждом конкретном случае приходится подбирать строго индивидуальные условия для каждого генотипа растения.

Трансформация *in planta*. Агробактериальную трансформацию можно проводить, инфицируя растения через поранение ткани каким-либо острым инструментом, на котором находятся агробактерии, например, уколов препаративной иглой апикальную меристему проростка или пазушную почку растения. Побег, выросший из такой почки, затем срезают и высаживают на селективную среду, чтобы отобрать трансформированные растения.

Другой способ трансформации *in planta* — через нанесение суспензии агробактерий с активированными *vir*-генами на пестики цветков растений с последующим опылением пыльцой, собранной с других растений того же сорта. Так можно трансформировать, например, кукурузу или любое другое растение, имеющее достаточно большой пестик. В некоторых случаях проводят предварительную трансформацию пыльцевых зерен с дальнейшим опылением цветков. Для растений арабидопсиса, имеющих очень маленькие цветки, разработан метод трансформации путем опускания нераскрывшихся цветочных бутонов в агробактериальную суспензию. Дальнейший отбор трансформированных растений проводят, высевая образовавшиеся после трансформации семена в селективных условиях. Метод трансформации *in planta* имеет преимущество перед классической процедурой трансформации, поскольку при этом можно избежать некоторых стадий культивирования тканей и последующей регенерации. Однако этот метод очень трудоёмок, т.к. частота трансформации при его использовании очень мала и требуется проведение очень большого объема работ.

Отбор трансформированных регенерантов

К сожалению, частота трансформации (отношение числа эксплантов с трансформированными побегами к общему числу эксплантов), независимо от использованных методов трансформации, достаточно мала. В связи с этим в генетической инженерии важное значение имеет возможность отбора трансформированных организмов.

Для этого используют селективные и маркерные гены. Наиболее распространенными селективными генами являются бактериальные гены устойчивости к антибиотикам (прокариотный ген неомисинфосфотрансферазы *nptII*, придающий трансгенным растениям устойчивость к канамицину, или *hpt* ген — устойчивость к гигромицину) или гены, делающие растения устойчивыми к гербицидам (*bar* — биалофосу; *dhfr* — к метотрексату; *esps* — к Раундапу). При помещении эксплантов на среды, в которых присутствует селективный агент, образовавшиеся из трансформированных клеток побеги остаются живыми, а остальные погибают.

Однако использование селективных соединений имеет свои недостатки. Хотя селективные гены эффективно экспрессируются у большинства растений, но некоторые виды растений чрезвычайно чувствительны к селективным соединениям, что приводит к массовой гибели растительной ткани (даже трансформированной) на селективной среде. Другие же виды растений могут быть толерантны к высокой концентрации селективного фактора, что также затрудняет отбор трансформантов. Кроме того, эффективность отдельных соединений как селективных агентов способна меняться в зависимости от типа выбранного экспланта или вида ткани. Поэтому очень часто селективные факторы приходится подбирать эмпирически в зависимости от вида используемого экспланта.

В качестве маркерных генов часто используются какие-либо нерастительные гены, обуславливающие либо легко тестируемую энзиматическую активность (GUS, CAT, NOS и др.), либо гены-«репортеры» — индикаторные гены, применяемые при разработке систем трансформации для «транзиторной» кратковременной экспрессии при предварительном анализе конструируемых векторов, например, ген зеленого флуоресцирующего белка медузы (green fluorescent protein — *gfp*) или бактериальный ген *gus*, ферментный белок которого при взаимодействии со специальным субстратом окрашивает ткани растений в синий цвет. При использовании маркерных генов важными факторами являются простота, дешевизна и специфичность методов детектирования.

Доказательство трансгенности трансформированных растений

После первоначального отбора трансформированных растений или тканей с помощью маркерных или селективных генов необходимо доказать присутствие вводимого целевого гена с помощью молекулярных

методов. Наиболее часто используют методы **полимеразной цепной реакции** (ПЦР — PCR) или **ДНК-гибридизации** (Саузерн-блоттинга — Southern-blotting).

Метод ПЦР заключается в том, что к анализируемому образцу ДНК добавляют в избытке 2 синтетических олигонуклеотида-праймера размером около 20 нуклеотидов. Каждый из них комплементарен одному из 3'-концов фрагмента ДНК. ДНК нагревают (денатурируют) для разделения цепей двойной спирали, а при охлаждении происходит гибридизация праймеров с комплементарными участками фрагментов ДНК. В результате в растворе будут находиться одонитевые ДНК с короткими двухцепочечными участками—затравками (праймерами). При добавлении нуклеотидов и ДНК-полимеразы синтезируются комплементарные цепи и образуются идентичные фрагменты ДНК (первый цикл). Реакцию останавливают, и ДНК снова денатурируют прогреванием. В процессе охлаждения праймеры, находящиеся в избытке, вновь эффективно гибридизуются, но уже не только с цепями исходной ДНК, но и с вновь синтезированными. Внесение в систему ДНК-полимеразы инициирует второй цикл полимеразной реакции. Многократное повторение описанной процедуры позволяет провести 30 и более циклов ферментативного удлинения праймеров. При этом число сегментов ДНК, ограниченных с обоих концов используемыми праймерами, с каждым циклом ПЦР увеличивается экспоненциально (приближается к зависимости 2^n , где n — число циклов). Выход всех других продуктов реакции увеличивается по линейной зависимости. Таким образом, в процессе рассматриваемой реакции эффективно амплифицируется только та последовательность ДНК, которая ограничена праймерами. Получаемый сегмент ДНК надежно выявляется в виде дискретной полосы после электрофоретического разделения молекул ДНК и окраски их этидиум бромидом.

Процедура Саузерн-блоттинга заключается в следующем — исследуемую ДНК подвергают денатурации и фиксируют на твердой подложке, например на нитроцеллюлозном или нейлоновом фильтре. Меченый (радиоактивно или флуоресцентно) ДНК-зонд (обычно длиной от 100 до 1000 п.н.) тоже денатурируют, наносят на фильтр с исследуемой ДНК и проводят их отжиг. Для удаления негибридизовавшегося ДНК-зонда фильтр промывают и визуализируют метку. Если гибридизация между зондом и исследуемой ДНК произошла, то никакой метки на фильтре не обнаруживается.

Экспрессия интродуцированных генов

Доказав трансгенность полученных после трансформации регенерантов, необходимо показать экспрессию встроенных целевых генов, так как без стабильной экспрессии растение не может быть использовано ни в исследовательских, ни в хозяйственных целях. Для доказательства активности гена также используют ряд молекулярных методов.

Основные из них — **дот-блот анализ** (dot blot analysis — анализ методом гибридизации препаратов ДНК или РЕПС, нанесенных капельно на твердый носитель без предварительной рестрикции и электрофореза, с меченым ДНК-зондом) и **Нозерн-блоттинг** (Northern blot analysis — метод гибридизации ДНК-зондов с электрофоретически разделенными молекулами РНК, аналогичный методу **Саузерн-блоттинга**). Из ткани растений выделяют тотальную РНК и молекулы РНК, разделенные электрофорезом, переносят с геля на нитроцеллюлозный или нейлоновый мембранный фильтр. После гибридизации с комплементарными одноцепочечными мечеными молекулами ДНК (ДНК-зонды) или РНК выявляют сигналы в определенной области электрофореграммы, что позволяет обнаружить гомологию РНК и ДНК-зонда. При использовании этих методов экспрессию трансгена можно увидеть по наличию и количеству специфических транскриптов.

Однако в ряде случаев экспрессию гена проще и надежнее контролировать по конечному белковому продукту (**вестерн-блоттинг** — Western blot analysis — метод выявления некоторых белков). После разделения с помощью электрофореза, белки соединяют с мечеными радиоактивным веществом антителами и идентифицируют при рентгенологическом исследовании или по тому эффекту, который этот белок вызывает.

Уровень и стабильность экспрессии трансгенов в растении можно повысить при специальном конструировании концов вводимой ДНК.

Известно, что обязательным элементом генетической конструкции, без которого ген не экспрессируется, является промотор. И при создании трансгенных растений уровень экспрессии контролируемого промотором гена, кодирующего чужеродный белок, часто оказывается ниже, чем хотелось бы. Для решения проблемы поиска наиболее эффективного промотора, в растениях тестируют различные конструкции «промотор-ген», выбирая опытным путем наиболее активную.

Если исследователь ставит более сложные задачи в плане регулирования активности трансгенов, то в его распоряжении имеется в настоящее время достаточно широкий выбор промоторов и других регуляторных элементов, комбинирование которых позволяет достичь более тонкой регуляции активности трансгенов в пространстве (в определенных тканях растения) и времени (в определенный период развития).

Генетическая активность введенного гена в клетках может зависеть от метилирования ДНК, которое играет важную роль в регуляции экспрессии генов в процессе развития. Показано, что необычные структуры в молекуле ДНК, так же, как и встроенная, в процессе генетической трансформации экзогенная ДНК, нередко подвергаются метилированию. Существует класс белков, которые специфическим образом связываются с метилированными участками ДНК, делая их недоступными для действия ряда ферментов, в том числе, возможно, и для полимераз. Получено много экспериментальных доказательств роли метилирования ДНК в инактивации эукариотических промоторов, а, значит,

и в регуляции активности генов. Напротив, гипометилирование промоторной области генов, в особенности CpG островков, как правило, свидетельствует о функциональной активности генов.

Достаточно низкая активность встроенных генов наблюдается в случаях многокопийности. Генотипы с несколькими копиями трансгенов не обладают требуемыми признаками и выбраковываются в ходе селекционного процесса. Даже в случае встраивания одной копии трансгена его активность может быть недостаточной. Поэтому получают много трансформантов, из которых отбирают лучшие по активности трансгенов и по комплексу хозяйственных признаков, без видимых мутаций и других нарушений.

Часто уровень экспрессии зависит в значительной мере от того, в какую область ядерного хроматина попал введенный ген. Экспрессия трансгена, как правило, высока при его попадании в область активного хроматина. Кроме того, оказалось, что при встраивании в ядерный геном конструкция ДНК нередко претерпевает существенные изменения (перестройки, дупликации, инверсии и т.д.), что приводит в основном к снижению экспрессии.

Было установлено также, что обычно применяемые процедуры трансформации вовсе не безразличны и для генома растения-хозяина. Во-первых, встраивание трансгена может нарушить первичную структуру какого-либо хозяйского гена и тем самым вызвать его инактивацию. Это событие, по-видимому, нередко, особенно с учетом того, что трансгены чаще встраиваются в транскрибируемые области хроматина (эухроматин). В последующих поколениях такой инактивированный ген может перейти в гомозиготное состояние, выражаясь в непредусмотренной и обычно нежелательной фенотипической мутации. Во-вторых, при агробактериальном или физическом переносе генов в растительный геном в последнем нередко отмечают разного рода перестройки, вплоть до транслокации фрагментов хромосом. Все это также может менять нормальное функционирование генома растения. Эти события случайны, и направленно увеличить экспрессируемость введенного гена нельзя. В таких случаях можно только отобрать растения-трансформанты, у которых наблюдается высокая экспрессия интегрированного гена.

Для кардинального повышения уровня экспрессии используют различные подходы. Во-первых, методом сайт-специфического мутагенеза изменяют те участки гена, которые могли бы быть ответственны за снижение эффективности транскрипции или трансляции в растении-хозяине. Например, изменяют нуклеотидную последовательность трансгена, не изменяя аминокислотное строение белка. Это возможно сделать в связи с вырожденностью генетического кода, зная, что за одни и те же аминокислоты отвечают различные кодоны. Такие гены будут содержать кодоны, чаще используемые растениями по сравнению с теми, которые «предпочитают» грамположительные бактерии (в случае использования в качестве целевых генов бактериального происхож-

дения) или по сравнению с теми, которые предпочтительнее для одних растений, чем для других. Можно внести также изменения, предотвращающие образование вторичной структуры у мРНК или исключающие появление сайтов полиаденилирования, характерных для растений, что может также снижать уровень экспрессии.

Еще одна важная проблема получения трансгенных растений — это проблема «**замолкания**» **генов** (gene silencing). Было обнаружено, что у достаточно заметной доли трансгенных растений интродуцированный ген через какое-то время теряет свою активность, перестаёт экспрессироваться, хотя физически сохраняется в геноме. То есть получается, что растение обладает способностью активно противостоять экспрессии чужеродной ДНК. Было выяснено, что одним из основных факторов проявления «замолкания» генов является число идентичных копий гена, встроенных в геном. Чем больше таких копий и чем они протяженнее, тем больше вероятность «замолкания» генов. Это связано с тем, что длинные последовательности (более 100—300 п.н. ДНК) сигнальных частей трансгена (промоторы, терминаторы и др.) могут иметь гомологии с участками хозяйского генома.

Явление ослабления активности гена при увеличении числа его копий весьма широко используется в генетической инженерии для улучшения качественных характеристик сортов или пород. Так, с помощью привнесения дополнительных копий отдельных генов растений получены томаты с длительным сроком хранения (у них снижена активность фермента, разрушающего в процессе естественного созревания пектин, или фермента ответственного за образования фитогормона — этилена), картофель с повышенным качеством крахмала (без амилозы), соя, рапс с улучшенным качеством масла, кофе без кофеина.

Другой фактор «замолкания генов» обнаружили, когда, задавшись целью получить сорт петуний с более яркими бордовыми лепестками, ввели в ее клетки ген, отвечающий за синтез красного пигмента одного из антоцианов. Однако многие цветы, вместо того, чтобы усилить окраску, вовсе теряли пигмент и получались белыми. Удалось установить, что во всех подобных случаях в клетках подопытных организмов появлялись большие количества так называемых «малых» РНК, которые являлись копией отдельных участков тех самых генов, которые вводились в клетку, и активность которых подавлялась. Эффект «гашения» экспрессии определенных генов малыми РНК получил название **РНК — интерференции**, а молекулы, вызывающие его, называли siRNA (small interfering RiboNucleic Acids — малые интерферирующие рибонуклеиновые кислоты).

Молекулы siRNA, состоящие всего из 21—28 (у млекопитающих из 21—23) нуклеотидов, в отличие от большинства других клеточных РНК, состоящих всего из одной цепи нуклеотидов, являются двунитчатыми за счет спаривания друг с другом синтезируемых цепей с противоположных нитей по тем же законам комплементарности, которые формируют двунитчатые цепи ДНК в хромосомах. Кроме того,

по краям каждой из цепей siRNA всегда остается два неспаренных нуклеотида. Затем с молекулой siRNA связываются белки-ферменты хеликаза и нуклеаза, формируя комплекс RISC (RNA-induced silencing complex). Хеликаза раскручивает нити siRNA, в результате чего они расходятся. Одна из этих нитей, к которой прикреплен фермент нуклеаза, может теперь связаться с комплементарным (строго соответствующим ей) участком однонитчатой мРНК, позволяя нуклеазе разрезать ее. Разрезанные же участки мРНК подвергаются действию других клеточных РНКаз, которые доразрезают их на более мелкие куски. Таким образом, и происходит блокирование тех генов, участок которых соответствует одной из цепочек внутри siRNA.

Для кардинального повышения уровня экспрессии встраиваемого гена используются также способы изменения частоты встречаемости кодонов в соответствии с частотой встречаемости кодонов в геноме вида растения, которое хотят трансформировать. Кодоны могут быть изменены 2 способами.

1. Методом сайт-специфического мутагенеза (слабая модификация) изменяют те участки гена, которые могли бы быть ответственны за снижение эффективности транскрипции или трансляции в растении-хозяине.

2. Разрабатывают и синтезируют химическими методами «полностью» измененную форму гена. Такой ген содержит кодоны, чаще используемые растениями по сравнению с теми, которые «предпочитают» грамположительные бактерии. Вносят также изменения, предотвращающие образование вторичной структуры у мРНК или исключая появление сайтов полиаденилирования, характерных для растений, что могло бы снизить уровень экспрессии.

Наследование трансгенов

Доказательством трансгенности полученных после трансформации растений наряду с доказательствами с помощью молекулярных методов является наследуемость встроенного гена. Присутствие введенного гена у потомков изучают теми же методами, которыми первоначально доказывают трансгенность полученных растений: а) наличием гена в геномной ДНК трансгенного организма; б) оценивая уровень транскрипции введенного гена; в) контролируя экспрессию гена по конечному белковому продукту или тому эффекту, который этот белок вызывает. Использование разных методов для доказательства истинной трансгенности данного растения необходимо для того, чтобы исключить «псевдотрансгенные» черты, вызванные соматической (эпигенетической) изменчивостью, химерностью или неполной элиминацией агробактерий.

Чужеродные ДНК, перенесенные в растительные клетки с помощью различных методов, обычно встраиваются в ядерный геном и, как правило, наследуются в соответствии с законами Менделя. Если транс-

гены в потомстве самоопыленных трансгенных растений наследуются как единый менделевский признак, сегрегируя в отношении 3:1, то это говорит о том, что вставка гена произошла в отдельный хромосомный сайт. То есть чужеродная ДНК в высших растениях, по-видимому, локализована как любая эндогенная мутация, даже если место встраивания Т-ДНК у разных трансформированных клеток не совпадает: встройка произошла в различные участки одной и той же хромосомы или в разные хромосомы или в несколько различных локусов. В случае проведения перекрестного опыления с нетрансформированным растением наследование в таких случаях должно быть в соотношении 1:1. В некоторых случаях встраивание чужеродных генов происходит в виде кластера tandemных вставок, (что можно показать с помощью гибридизации *in situ*), тогда наследуемый ген может распределяться в потомстве самоопыленных растений с другой частотой, например, 15:1 (в случае 2-х вставок).

При изучении наследования трансгенов надо иметь в виду, что химерный ген, состоящий из нескольких генов, может сегрегировать в I поколении, давая экспрессию каждого гена по отдельности. Например, в одной из работ в потомстве трансформантов, несущих признаки мужской стерильности и устойчивости к фосфинотрицину, было получено по 50% растений рапса, имеющих по одному признаку.

Имеются сообщения также о том, что иногда выявляются трансформанты, которые не дают менделевского расщепления в потомстве. Это явление может быть объяснено потерей гена вследствие рекомбинации или встройки в локусы, необходимые для развития гамет или прорастания семян, а также образования химерных растений, содержащих трансгенные и нетрансгенные ткани.

В некоторых случаях у растений-потомков наблюдается значительное снижение экспрессии трансгена или даже полное «замолкание» его. Встраивание введенной ДНК в функционально значимые области генома может приводить к их дестабилизации и сопровождаться появлением мутаций, спектр которых очень разнообразен. Например, введение дупликаций в инвертированном виде уже в первом поколении вызывает резкое снижение стабильности экспрессии гена. Нарушения стабильности экспрессии маркерного гена отмечались у ряда самоопыленных растений во втором поколении в случае прямых дупликаций. Подобную инактивацию генной активности объясняют по-разному: либо как результат мутации, либо метилирования чужеродной ДНК в растительном геноме.

При проведении опытов по трансформации растений, необходимо принимать во внимание тот факт, что чужеродная ДНК может подвергаться различным модификациям перед встраиванием в геном хозяина. Однако и после интеграции могут происходить различные ее перестройки, обычно во время мейоза. Такие события могут ингибировать экспрессию встроенных генов. В таких случаях только перекрестное опыление тщательно отобранных трансформантов с наиболее желае-

мым генотипом и фенотипом дает потомство с предсказуемыми признаками. Надо иметь в виду, что в некоторых случаях при проведении перекрестного опыления с нетрансгенными растениями (анализирующее скрещивание) образования семян может не происходить или они могут образовываться в очень маленьком количестве.

Фенотипическая стабильность трансгенных растений

У полученных трансгенных растений кроме заданного измененного признака, зависящего от вставленного целевого гена, не должны быть изменены его свойства, зависящие от используемого для трансформации генотипа. Надо понимать, что с помощью генетической инженерии не создают совершенно новые растения, а только улучшают уже адаптированные к определенным условиям внешней среды, а также технологиям возделывания сорта и гибрида. Перед изменением растений обязательно должна быть продумана комплексная селекционно-агротехническая программа, в которой изначально определяют цели и этапы использования классических и биоинженерных методов управления наследственной изменчивостью при реализации той или иной морфофизиологической модели сорта (гибрида).

Известно, что в многофакторной системе, которыми являются биологические организмы и целые экосистемы, случайностные процессы возрастают в геометрической прогрессии и свести их к нулю просто невозможно. Можно ожидать, что получаемые в результате таких работ ГМО не будут обладать желаемыми свойствами, или же возникнут какие-то дополнительные свойства, полезность или вредность которых надо еще выяснять.

Получив трансген, в первую очередь оценивают так называемую композиционную эквивалентность с его традиционным аналогом — есть ли отличия в фенотипическом проявлении встраивания чужеродного гена. Не должны меняться ни морфология созданного ГМ-организма, ни его внутренние свойства. Не должны быть изменены также химический состав продукта, который образуется растением. Продукты, образуемые ГМ-организмом, должны быть композиционно абсолютно аналогичны традиционным (по молекулярным и фенотипическим характеристикам, уровням содержания ключевых веществ).

В некоторых случаях может наблюдаться незапланированный эффект трансгеноза в виде фенотипических и физиологобиохимических изменений растений, объясняемый **плейотропным** (т.е. совместным, дополняющим) действием трансгенов, которое заключается в модификации, репрессии или даже разрушении части генома растения-реципиента. При этом обнаружено и отрицательное действие трансгеноза на растения и их урожай. Сопутствующие отрицательные действия могут проявляться в нарушении метаболизма, увеличении содержания гликоалколоидов, негативном изменении строения клубня (в случае растений картофеля), индукции некрозов и фитотоксично-

сти, повышении содержания лигнина, растрескивании стебля, которые у некоторых культур были обусловлены генами, детерминирующими биохимические показатели урожая.

Имея в виду эти факты, необходимо все растения, которые получают методом трансформации (так же, как и, впрочем, другими методами), тщательно анализировать по всем признакам, чтобы быть уверенными, что введенный чужеродный ген ничего не нарушил, что нет никаких фенотипических и физиологобиохимических нежелательных изменений. Только после многосторонних исследований полученные трансгенные растения, обладающие новыми полезными для человека свойствами, могут быть размножены и использованы в производстве различных продуктов, особенно продуктов питания и человека и животных.

Биобезопасность генетически модифицированных организмов

Безопасность ГМО (генетически модифицированный организм) — это отсутствие нежелательного сопутствующего воздействия ГМО на человека, сельскохозяйственных животных и нецелевую биоту. Поскольку биобезопасность не может быть ни вечной, ни абсолютной, необходимо выявить, по возможности, все реальные факторы риска, связанные с потреблением и производством ГМ-продуктов.

Потенциальная опасность трансгенных растений (ТР) оценивается по медико-биологической и экологической категориям. Эти оценочные категории методологически обоснованы и изучены в неодинаковой степени. В соответствии с медикобиологическими показателями вредности, продукция ТР подвергается токсиколого-гигиенической и зоогигиенической оценкам. Экологические последствия культивирования ТР в настоящее время оценить достаточно сложно, поскольку аналогов производства таких растений в истории земледелия не было. Большинство показателей и экологических критериев, по которым принято фиксировать изменения и/или нарушения, происходящие в агроландшафте вследствие пресса ТР, характеризуются вероятностной оценкой, т.е. со значительной долей неопределенности.

При определении безопасности ТР, продуцирующих новые белки (продукты трансгена), используются те же самые методологические подходы, что и в отношении потенциально опасных химических соединений — ксенобиотических или природных. Для этого исследуются: а) прямое воздействие на здоровье (токсичность); б) тенденции вызывать аллергическую реакцию (аллергенность); в) конкретные компоненты, предположительно обладающие питательными или токсичными свойствами; г) устойчивость введенного гена; д) воздействие на питание, связанное с генетической модификацией и е) любое непредусмотренное воздействие, которое может возникнуть в результате введения гена.

Генетически модифицированные пищевые продукты оцениваются в экспериментах на животных и микроорганизмах с широким набором биотестов (иммунный ответ, аллергенность, мутагенность, эмбриотоксичность, репродуктивная токсичность, тератогенность, канцерогенность, продолжительность жизни подопытных животных). На основании этих данных разрабатываются гигиенические нормативы, уточняются регламенты применения гербицидов и других пестицидов, осуществляется государственная регистрация химических средств защиты для применения на посевах ТР.

Обязательно проводится проверка многочисленных возможных последствий широкого использования трансгенных организмов. Так, в Германии проверка на безвредность генетически измененных растений, животных и микроорганизмов продолжается от 5 до 6 лет, а в США — до 10 лет. В то же время существует несовершенство методов определения безопасности (риска) использования ГМ-растений, что связано со слабой пока научной базой экологических, медико-биологических и токсикологогигиенических оценок последствий широкого распространения трансгенных растений. В этой связи пока практически невозможно доказать как полную безопасность использования трансгенных растений, так и проверить возможные негативные последствия.

Основные проблемы, вызывающие обеспокоенность в отношении здоровья человека являются: тенденция вызывать аллергическую реакцию (аллергенность), перенос гена и ауткроссинг.

Аллергенность. В принципе не рекомендуется перенос гена из обычно аллергенных пищевых продуктов, если не будет показано, что белковый продукт перенесенного гена не является аллергеном. Хотя разработанные традиционными методиками пищевые продукты обычно не проверяются на аллергенность, была проведена оценка в отношении генетически модифицированных пищевых продуктов Продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН (ФАО) и ВОЗ. Не было выявлено аллергенного действия в отношении ГМ продуктов, поступающих в настоящее время на рынок.

Перенос гена. Перенос гена из ГМ пищевых продуктов в клетки организма или в бактерии в желудочно-кишечном тракте вызывал бы обеспокоенность, если перенесенный генетический материал отрицательно воздействовал бы на здоровье человека. Это особенно важно в случае, если необходимо осуществлять перенос генов, дающих резистентность к антибиотикам, которые используются при создании ГМО. Хотя вероятность переноса низка, на последнем заседании Комиссии экспертов ФАО/ВОЗ было рекомендовано использовать технологию без применения генов устойчивости к антибиотикам.

Ауткроссинг. Перемещение генов из генетически модифицированных растений в обычные культуры или в соответствующие виды в естественных условиях (так называемый «ауткроссинг»), а также смешение культур, полученных из обычных семян, с культурами, выращенными с использованием генетически модифицированных культур, могут иметь косвенное воздействие на безопасность пищевых продуктов и на про-

довольственную безопасность. Этот риск является реальным, как было показано, что элементы растения типа маиса, которые были одобрены лишь для применения в качестве корма для скота, появились в продуктах из маиса для потребления человеком в Соединенных Штатах Америки. Несколько стран разработали стратегии по уменьшению смешения, включая четкое разделение областей, в которых выращиваются генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры и обычные сельскохозяйственные культуры. Однако надо иметь в виду, что гибриды между культурными растениями и сорняками, особенно если они относятся к родственным видам, возможны, но они обречены или на вымирание, или на вырождение в исходную дикую форму. Половина хромосом у такого гибрида будет нести гены культурного родителя. В том числе — несколько десятков или сотен генов, кодирующих признаки, полезные для человека, но вредные для выживания растения. Иногда они оказывались полезными для человека и давали начало новым сортам культурных растений, но в природе такие гибриды вряд ли выживут.

В целом степень риска при использовании трансгенных организмов следует оценивать с учетом долговременных интересов жизнеобеспечения всего общества. Бесспорно, произвольная изменчивость высших растений ограничивается «системой саморегуляции» и в этом одна из эволюционных гарантий безопасности использования методов трансгеноза в селекции растений. Однако следует также учитывать, что ДНК-технологии представляют собой активное вмешательство человека в эволюционное развитие биосферы, последствия которого во многом пока остаются не ясными.

Таким образом, можно предположить, что при широком использовании трансгеноза принципиально изменится эволюционная ситуация: информационно закрытые системы, каковыми исторически являются культурные виды и дикие родичи растений, окажутся открытыми для прямого обмена генетической информацией практически со всеми живыми организмами Земли. Скорость и направление эволюционного процесса в биосфере могут существенно измениться под влиянием лавинообразного увеличения числа ГМО. При этом непредсказуемые сукцессии в биосфере могут происходить в результате реализации средообразующих возможностей самих трансгенных организмов. В то же время изменение информационного окружения или его составляющих при широком распространении ГМО может повлиять на структуру экзометаболитов, биогеохимические циклы, пищевые цепи, процессы биосинтеза, динамику и генетическую структуру популяций биогеоценозов и пр. Неслучайно в соответствии с *Национальной стратегией сохранения биологического разнообразия России*, принятой на Национальном форуме в 2001 г., важнейшей задачей является «предотвращение распространения генетически измененных форм живых организмов, используемых в биотехнологиях, в открытые агроэкосистемы и природные экосистемы».

Все возрастающие масштабы использования ГМ-растений требуют более тщательного рассмотрения вопроса об их биобезопасности,

особенно о связи биологического разнообразия агроэкосистем с их генетической и экологической уязвимостью. Любая сельскохозяйственная система жестко влияет на окружающую среду. Проблема выбора в том и заключается, чтобы определить, какое именно воздействие мы предпочтем. Использование генной инженерии — лишь один из факторов общего «уравнения выбора».

Одной из опасностей является возможность бесконтрольного выпуска ГМО в природу. Чтобы не допустить этого, создаются специальные механизмы, препятствующие этому. Например, в нескольких лабораториях созданы генетические механизмы, позволяющие ГМ-растениям успешно скрещиваться между собой, но делающие бесплодными семена, у которых только один из родителей был трансгенным.

Одной из опасностей появления генетически-модифицированных растений является уменьшение генетического биоразнообразия культивируемых человеком растений. Известно, что коммерческие интересы транснациональных компаний ограничивают число сортов и гибридов, реализуемых во всем мире, что неизбежно снижает генетическое разнообразие агроэкосистем. В результате генетическая база некоторых важнейших видов растений может оказаться крайне узкой, что неизбежно повысит опасность массового поражения фитоценозов вредными видами. Однако такая опасность может грозить и при использовании классических методов селекции. Непрерывное использование лучших сортов в качестве исходного селекционного материала приводит к концентрации в селекционном пуле генов, полученных из ограниченных коммерческих источников. Последние в большинстве случаев не включают представленные на уровне соответствующего вида аллели того или иного признака. Эту опасность можно преодолеть, вводя в селекционный процесс, как дикорастущие виды, так и сорта, полученные в географически отдаленных регионах, обладающие желательным для исследователя признаком. А для трансгенных растений существует необходимость получения растений новых генотипов, заменяя ими ранее созданные растения, несущие определенные признаки.

Существует также опасность (особенно при широком применении гербицидоустойчивых растений), что некоторые мутантные сорные виды растений, не чувствительные к гербицидам, будут выживать при широкомасштабном и длительном применении гербицидов с одним и тем же спектром действия (типа раундап). Тогда эти не чувствительные к гербицидам сорные виды растений могут оказаться в агроценозах доминирующими. Только за последние годы десятки видов сорных растений сравнительно быстро приобрели устойчивость к производным сульфонилмочевины. Однако аналогичные эффекты «пестицидного бумеранга» известны при длительном применении однотипных инсектицидов и фунгицидов и там, где произрастают трансгенные растения не используются. Из-за повышения пестицидоустойчивости растений приходится увеличивать дозы химикатов, что в свою очередь резко снижает возможность экологически безопасного

и рентабельного использования химических средств защиты растений и является причиной нарушения трофических связей и экологического равновесия в агробиогеоценозах.

К числу опасностей широкого использования ГМ-растений относят возможность влияния целенаправленного изменения содержания какого-либо одного белка на изменение других белков. Например, показано, что в полевых условиях устойчивая к глифосату трансгенная соя неожиданно оказалась чувствительной к действию высоких температур.

Тем не менее, существуют и прямые выгоды использования трансгенных растений, что позволило им за достаточно непродолжительное время широко распространиться по всему миру. Во-первых, предотвращается эрозия почвы, поскольку растения, устойчивые к гербицидам, допускают щадящий беспашотный метод обработки почвы, что только в 2002 г. позволило сэкономить 3,5 млрд долл, в США только на расходах по очистке рек и дренажей, обработке питьевой воды. Заметно снижается и выброс в атмосферу углекислого газа (пашня — один из главных источников парникового эффекта). За счет перехода на беспашотный метод увеличивается биоразнообразие биоты — за последний год популяции певчих птиц на полях, занятых под ГМ-сортами, выросли на 10—37%. За счет сокращения обработки полей пестицидами и отказа от вспашки снижается использование сельскохозяйственной техники (и, соответственно, расход топлива и выбросы углекислого газа в атмосферу). В США в 2002 г. так сэкономили 1,5 млн м³ дизельного топлива. Если бы в Европе площади под сахарной свеклой, хлопчатником, рапсом и кукурузой хотя бы наполовину были засеяны ГМ-сортами, это сократило бы выбросы парниковых газов на 73 тыс. т в год. Снижается химическая загрязненность воды и почвы благодаря применению более «мягких» гербицидов, экономится почвенная влага (70% мирового потребления пресной воды приходится на сельское хозяйство). Весьма впечатляют результаты, полученные в 2002 г. в США для шести основных ГМ-культур: сои, хлопчатника, кукурузы, рапса, папайи и кабачка. По сравнению с традиционными культурами на тех же площадях получено на 1,8 млрд т пищевых продуктов, кормов и волокон больше, использовано на 21 тыс. т пестицидов меньше, а доход фермеров возрос на 1,5 млрд долл. Существуют и другие экологические преимущества ГМ-растений: фиторемедиация загрязненных почв, получение биоразлагаемых пластмасс, использование их в качестве возобновляемого источника энергии и синтеза важнейших полимеров (так, недавно создана кукуруза, из крахмала которой налажено рентабельное производство 1,3-пропандиола — исходного компонента для синтеза полипропилена).

Перспективы генной инженерии

Сейчас в биотехнологических лабораториях идет активная работа над следующим поколением растительных ГМО, которые в большей степени должны быть привлекательны для конечного потребителя.

Это — растения со встроенными вакцинами и витаминами, например «Золотой рис» со встроенным провитамином А или бананы с анальгином. Эксперименты биотехнологов далеко не ограничиваются сельскохозяйственными растениями. Просто они стали первыми ГМО, которые были разрешены для массового коммерческого распространения. Сейчас уже созданы ГМ рыбы (более 20 видов), деревья, овцы, козы, свиньи и др. Пока это в основном достояние лабораторий. Однако, биотехнологические компании, которые считают усовершенствованные живые формы своими изобретениями, с энтузиазмом описывают будущее, где окружающая живая природа будет максимально удовлетворять разнообразные потребности человека. Так, деревья будут расти быстро и иметь ярко выраженные полезные качества. Например, из них будет легко делать бумагу. Генетически модифицированные кошки не будут вызывать аллергию у множества чувствительных к кошачьей шерсти людей. Фермеры будут поливать свои растения, когда те сообщат о своей жажде легким свечением на листьях. ГМ-растения можно приспособлять к экстремальным условиям, таким как засуха и холод. Использование ГМ культур позволит менее интенсивно обрабатывать поля химикатами, так как те сами могут справляться с решением проблем, ранее подвластных только химии.

Продукты питания, содержащие ГМ ингредиенты, могут стать полезными для здоровья, если в них встроить вакцины против различных болезней. К примеру, уже создан салат-латук, который вырабатывает вакцину против гепатита В. Самое распространенное сейчас первое поколение ГМО (с устойчивостью к гербицидам, насекомым и вирусам) было создано «под фермеров».

Трансгеноз и законодательство

Большинство стран (но далеко не все) достаточно жестко и скрупулезно регламентирует порядок создания, испытания и использования ГМО. Однако в условиях, когда биоинженерия и ГМ-продукция (медикаменты, продукты питания и пр.) стремительно увеличивают свою долю в мировой торговле и национальных бюджетах, они все в большей степени оказываются под протекционистской защитой тех государств, где соответствующие исследования и производство наиболее продвинуты.

Большую часть трансгенных товаров — около 63% — поставляют США, где приняты самые либеральные законы в отношении ГМО. Там нет закона о маркировке ГМ-продуктов. Зато там есть другие правила. Например, запрещается перевозить обычные продукты вместе с трансгенными. А для любителей модифицированных продуктов открыты специализированные магазины (где цена на них на порядок ниже, чем на обычные). Более того, Калифорния и Аляска объявили себя зонами, свободными от генетически-модифицированных организмов (ГМО) и генетически-модифицированных продуктов (ГМП).

Правительства многих стран мира либо отказались от производства и продажи ГМП, либо ввели жесткие правила, ограничивающие их оборот для населения. Так, министры сельскохозяйственных стран Африки (кроме ЮАР) запретили ввоз ГМП на свою территорию. В Индии активно обсуждается вопрос о запрещении использования трансгенных компонентов в продуктах. Проявил осторожность и Китай, который установил многосложную процедуру тестирования и лицензирования. Зонами, свободными от ГМО, объявляют себя многие страны Европы. Среди них — Польша, Австрия, Швейцария. А в тех европейских странах, где продажа продуктов с содержанием ГМО разрешена, маркировка обязательна, если содержание трансгенных компонентов превышает 0,9%. В Англии с апреля 2001 года вступил в силу закон, предписывающий продавать детям только здоровую пищу и запрещающий продавать им картофельные чипсы, т.к. в большинстве случаев чипсы производят из ГМ-картофеля. Во многих столовых появилась надпись: пища без ГМ-добавок.

На территории России генетически-модифицированные ингредиенты (ГМИ) чаще всего встречаются в продуктах, содержащих сою, — в 17,7% мясных полуфабрикатов, в 16,7% хлебобулочных и мучно-крупяных изделий, в 16,4% соевых продуктов. В группу риска также входят шоколад, газировка, чипсы, детские молочные смеси. Однако все ГМО в наших продуктах — импортные, так как по Федеральному Закону «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности», принятому Государственной Думой России в 1996 году, с целью предотвращения негативных последствий использования ГМ-продуктов, в России нельзя выращивать ГМ-растения в промышленных масштабах, однако разрешается ввозить, перерабатывать, использовать в продуктах питания или кормах несколько видов генетически модифицированных растений и продуктов их переработки, которые прошли соответствующую процедуру регистрации и контроля на территории РФ.

С 1 июня 2004 г. в России введены новые правила контроля и маркировки пищевой продукции, полученной из генетически модифицированных источников. Маркировать обязательно продукты, содержащие больше 0,9% ГМИ (генетически модифицированных ингредиентов).

В Федеральном Реестре РФ с 1999 года по настоящее время зарегистрировано 12 генетически модифицированных источников пищи, выпускаемых в мире в промышленных масштабах: соя, устойчивая к гербицидам — 3 линии; рис, устойчивый к гербицидам — 1 вид; кукуруза, устойчивая к гербицидам — 3 линии; кукуруза, устойчивая к вредителям — 2 линии; кукуруза, устойчивая к гербицидам и вредителям — 1 линия; картофель, устойчивый к колорадскому жуку — 2 сорта. Из них наибольшее распространение получила соя линии 40—3—2, устойчивая к глифосату (Монсанто Ко., США). Все виды генетически модифицированных растений, зарегистрированных в нашей стране, обладают только дополнительными признаками резистентно-

сти к определенным видам химикатов и вредителей, поэтому продукты переработки этих растений по своему химическому составу и функционально-технологическим свойствам ничем не отличаются от своих традиционных генетически немодифицированных аналогов. Разрешенные ГМО могут применяться в любом продукте (в том числе и в детском питании) без ограничений. Правда, если производитель добавляет в продукт ГМИ, он должен указать это на упаковке.

Вряд ли можно усомниться в том, что решение о судьбе того или иного продукта сельскохозяйственной биотехнологии — будь то коммерциализация пищевых ГМ-продуктов или использование ГМ-организмов (микроорганизмов, растений, животных) в открытых системах, где контакты с окружающей средой и людьми не ограничены специальным образом, — должно быть исключительной прерогативой государства и результатом тщательного анализа соотношения между риском и выгодой. Главная цель такой деятельности сводится к тому, чтобы допустить к использованию новую технологию и ее продукты, лишь устранив или предельно ограничив риск ее возможных негативных последствий. Ни одна технология не может быть абсолютно безопасной и имеет свой набор рисков и выгод. Эта аксиома в равной степени применима как к трансгенным растениям, полученным методами генной инженерии, так и к традиционным сельскохозяйственным культурам. Многие факты отрицательного воздействия трансгенов на биоценозы получены в лабораториях и ни разу не воспроизведены в естественных условиях. Тем не менее, их необходимо учитывать в законодательстве использования ГМО. При этом уровень и масштабы доказательств должны быть соизмеримы с потенциальным риском для окружающей среды и населения. Во всяком случае, следует признать право потребителя иметь выбор на основе исчерпывающей информации о продуктах, получаемых на основе ГМО.

Какие же виды генетически модифицированных пищевых продуктов находятся на международном рынке?

Все генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры, поступающие на международный рынок в настоящее время, были разработаны с использованием одной из трех основных характеристик: резистентность к повреждению насекомыми; резистентность к вирусным инфекциям; устойчивость в отношении определенных гербицидов. Все гены, используемые для модификации сельскохозяйственных культур, производятся из микроорганизмов (табл. 2.1).

В настоящее время не существует каких-либо специфических международных систем регулирования. Однако несколько международных организаций занимаются вопросами разработки протоколов для ГМО. Комиссия *Codex Alimentarius* (Комиссия) является совместным органом ФАО/ВОЗ, отвечающим за подборку стандартов, сводов правил практики, руководящих принципов и рекомендаций, которые составляют *Codex Alimentarius*; международного свода правил по пищевым продуктам. Комиссия разрабатывает принципы анализа генетически

модифицированных пищевых продуктов в отношении риска для здоровья человека. Предпосылка этих принципов диктует проведение дорыночной оценки, осуществляемой на индивидуальной основе, с включением оценки как прямого воздействия (от введенного гена), так и непредусмотренного воздействия (которое может возникнуть в качестве последствия введения нового гена). Принципы Свода правил не связаны с обязательным, воздействием на национальное законодательство, а касаются конкретно Соглашения по санитарии и фитосанитарии Всемирной торговой организации (Соглашение по СФС) и могут быть использованы в качестве ссылки в случае разногласий по торговым вопросам.

Таблица 2.1

Генетически модифицированные сельскохозяйственные культуры, разрешенные к употреблению в мире

Культура	Характеристика	Принявшие территории / страны
Маис	Резистенция к насекомым	Аргентина, Канада, Южная Африка, Соединенные Штаты Америки, ЕС
	Устойчивость к гербицидам	Аргентина, Канада, Соединенные Штаты Америки, ЕС
Соя	Устойчивость к гербицидам	Аргентина, Канада, Южная Африка, Соединенные Штаты Америки, ЕС (лишь в отношении обработки)
Рапс	Устойчивость к гербицидам	Канада, Соединенные Штаты Америки
Цикорий	Устойчивость к гербицидам	ЕС (лишь в целях выращивания)
Тыква	Резистентность к вирусам	Канада, Соединенные Штаты Америки
Картофель	Резистентность к насекомым, устойчивость к гербицидам	Канада, Соединенные Штаты Америки

Картахенский протокол по биобезопасности (КПБ), подписанный в 1992 г. в Рио-де-Жанейро является договором по окружающей среде и юридически обязательный для исполнения его подписавшими Сторонами, регулирует трансграничное перемещение живых модифицированных организмов (ЖМО). Генетически модифицированные пищевые продукты попадают в сферу действия Протокола лишь в том случае, если они содержат ЖМО, которые способны переносить или реплицировать генетический материал. Краеугольным камнем КПБ является требование о том, чтобы экспортеры получали согласие импортеров до первой поставки ЖМО.

Рассмотрев способы получения и применения, генетически модифицированных организмов, в частности, растений, необходимо отметить, что методы генетической инженерии значительно расширяют возмож-

ности управления наследственностью и изменчивостью сельскохозяйственных культур. Однако при этом они всегда будут оставаться лишь дополнительным, но не замещающим фактором в арсенале адаптивной системы селекции растений.

Контрольные вопросы и задания

- 1) Кем и когда были открыты нуклеиновые кислоты?
- 2) Кем и когда была расшифрована структура ДНК?
- 3) Почему 1973 год считается датой основания генетической инженерии?
- 4) Расскажите о строении нуклеиновых кислот.
- 5) В чем значение принципа комплиментарности для молекулы ДНК?
- 6) Что такое трансгеноз и трансгенные организмы?
- 7) Что такое рекомбинантная ДНК, ее значение?
- 8) Перечислите этапы создания рекомбинантной ДНК? Какие ферменты принимают участие в ее создании?
- 9) Что такое плазмидный вектор? Какими свойствами он обладает?
- 10) Назовите особенности разных типов векторных систем.
- 11) Перечислите этапы создания трансгенных растений.
- 12) Какие технологии прямого переноса генов в клетки используются для получения трансгенных растений?
- 13) Назовите особенности клонирования прокариотической и эукариотической ДНК.
- 14) В чем состоит сущность технологии синтеза кДНК? Каково значение кДНК в клонировании генов?
- 15) Что такое геномные библиотеки, в чем заключается их отличие от библиотек кДНК?
- 16) Расскажите о возможностях использования трансгенных организмов.
- 17) Какие международные документы создают нормативно-правовую базу для современной биотехнологии и биоинженерии?
- 18) Приведите данные о расширении площадей возделывания трансгенных культур в мире.
- 19) Какие вопросы рассматривает Международная конвенция о биологическом разнообразии?
- 20) Расскажите о законодательной базе России по биобезопасности.
- 21) По каким направлениям проводится экспертиза генетически модифицированных продуктов для их использования в пищевых целях?
- 22) Рассмотрите возможности и перспективы применения генетически модифицированных организмов в России и в мире?

Глава 3

ВТОРИЧНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ РАСТЕНИЙ И ИХ ОБРАЗОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Характерной особенностью клеток растений является способность к синтезу соединений так называемого вторичного метаболизма, к которым относятся алкалоиды, стероиды, терпеноиды и другие вещества. Они синтезируются, как правило, в меньших количествах, чем вещества основного (первичного) обмена и, кроме того, не участвуют в нем.

Впервые термины «первичных» и «вторичных» веществ ввел немецкий биолог Альбрехт Коссель (1891 г.). В своей лекции «О химическом составе клеток», прочитанной для Берлинского общества физиологов, он говорил: «Я предлагаю называть соединения, имеющие важность для каждой клетки, первичными, а соединения, не присутствующие в любой растительной клетке, — вторичными».

Долгое время считалось, что вторичные метаболиты отличаются от первичных метаболитов тем, что они:

- распространены в ограниченном числе видов растений;
- являются «конечными» продуктами первичного обмена;
- не имеют значения для образующей их клетки, но могут быть необходимы для целого растения.

В настоящее время установлена важная роль вторичных метаболитов в жизни растений. Они обнаружены у 20—30 тыс. видов растений, т.е. у 10—15% всей флоры Земли. Установлена структура уже около 100 000 индивидуальных веществ. Все это свидетельствует о том, что считать их синтезированными «случайно» — не правильно.

Ученые-биологи достаточно долго не уделяли должного внимания вторичным соединениям. Гораздо больше знали о них провизоры, фармацевты и криминалисты, поскольку лекарственные и ядовитые свойства растений чаще всего обусловлены этими соединениями.

Вторичные вещества придают также вкус и аромат растениям. От их присутствия зависит окраска цветков и многообразие «расцветки» окружающего нас мира. Многие из вторичных веществ используются в качестве лекарственных препаратов, вкусовых и ароматических добавок для пищевой и парфюмерной промышленности.

Основные классы вторичных соединений

Вторичные соединения имеют важное народно-хозяйственное значение, что может найти широкое применение в биотехнологическом

производстве. Но прежде чем перейти к этим вопросам, рассмотрим основные классы вторичных веществ, синтезирующихся в клетках высших растений.

Терпены (старое название — *изопреноиды*) являются одними из наиболее распространенных в растениях вторичными соединениями. Свое название они получили от немецкого слова *terpentin* (скипидар), обозначающего смесь этих веществ.

К настоящему времени известно более 30 000 соединений данной группы вторичных метаболитов. Основным их структурным элементом является пятиуглеродное соединение — *изопрен*. Общая формула всех терпенов выражается как $(C_5H_8)_n$.

Все терпены разделяются по единому структурному признаку — числу изопреновых единиц, входящих в состав их молекулы (табл. 3.1).

Таблица 3.1.

Классификация терпенов

Тип	Число изопреновых групп	Структурная формула	Пример
Гемитерпены	1	C_5H_8	Изопрен, изопентенол
Монотерпены	2	$(C_5H_8)_2$	Гераниол, нерол, мирцен
Сесквитерпены	3	$(C_5H_8)_3$	Фарнезол, абсцизовая кислота, кариофиллен
Дитерпены	4	$(C_5H_8)_4$	Геранилгераниол, фитол, гиббереллины, смоляные кислоты
Сестертерпены	5	$(C_5H_8)_5$	Офиоболин А, компоненты восков
Тритерпены	6	$(C_5H_8)_6$	Сквален, стероиды, стерины
Тетратерпены	8	$(C_5H_8)_8$	Фитоин, каротиноиды, ксантофиллы
Политерпены	Более 1500	$(C_5H_8)_n$	Каучук, гута, чикл

Среди терпенов встречаются соединения, молекула которых состоит из терпеноидной и нетерпеноидной частей. Последняя может быть представлена тетрапирролом, как это характерно для хлорофилла и цитохрома, бензохиноном, что наблюдается в структуре убихинонов, а также аденином, в случае цитокининов. Такие соединения называли *меротерпеноидами*.

Большинство терпенов имеет название, отражающее тот растительный источник, откуда они были выделены впервые. Так, например ментол впервые получили из растений мяты (*Mehta*), бетулапrenoлы — из листьев березы (*Betula*), авенастерин — из зерен овса (*Avena*).

Функции, выполняемые терпенами в клетках растений, чрезвычайно разнообразны. Так, важную физиологическую активность проявляют такие их представители, как цитокинины, гиббереллины и абсцизовая кислота. Моно- и сесквитерпенам часто приписывают аллелопатическую роль [аллелопатия — это вредное действие одного растения (донора) на другое (реципиент)]. Стероиды, локализованные в клеточных мембранах растений, по-видимому, выполняют там такую же функцию, как холестерин в мембранах животных клеток. Существует предположение, что стероиды стабилизируют мембраны и контролируют их проницаемость. Каротиноиды защищают клетки от фотодинамического повреждения и, кроме того, участвуют в поглощении света при фотосинтезе. Смешанные терпены также играют ключевую роль в обмене веществ у растений: хлорофилл, лишенный своей фитильной боковой цепи, не эффективен; пластохинон участвует в фотосинтетическом транспорте электронов, а убихинон — в митохондриальном транспорте электронов. Полипренилпирофосфаты участвуют в процессе гликозилирования при образовании клеточных стенок.

Фенольные соединения или полифенолы являются вторыми по распространенности в растительном мире представителями вторичных соединений. Эти вещества, также как и терпеноиды, обнаружены не только во всех растениях, но даже в каждой растительной клетке. В настоящее время число известных фенольных структур превышает 9000.

Фенольные соединения — это вещества, содержащие в своей молекуле бензольное ядро с одной или несколькими гидроксильными группами. Их классификация зависит от числа ароматических колец (одно или два), а также количества присоединенных к ним атомов углерода.

Фенольные соединения с одним ароматическим кольцом подразделяются на следующие классы:

— *соединения C₆-ряда*, которые в своей структуре не содержат дополнительных атомов углерода. К ним относятся *простые фенолы*, представителями которых являются фенол, в малых количествах образующийся в хвое сосны, пирокатехин (найден в листьях тополя) и флороглюцин (чешуя лука);

— *соединения C₆-C₁-ряда* имеют в своей структуре один дополнительный атом углерода. К ним относятся оксibenзойные кислоты и их производные, которые часто называют *фенольными кислотами* или *фенокислотами*. К группе соединений C₆-C₁-ряда относятся также лишайниковые кислоты, специфические фенольные соединений, синтезируемые лишайниками;

— *соединения C₆-C₂-ряда* это соответствующие альдегиды и спирты оксibenзойных кислот, в их структуре присутствуют два дополнительных атома углерода;

— *соединения C₆-C₃-ряда*, имеют три дополнительных атома углерода и составляют наиболее многочисленную и важную группу веществ часто называемых *фенилпропаноидами*. Она включает *оксикоричные кислоты* (по международной номенклатуре — гидроксикоричные),

оксикоричные (гидроксикоричные) спирты, фенилпропены, а также кумарины, изокумарины и хромоны — соединения, у которых дополнительные атомы углерода замыкаются в конденсированное лактонное кольцо; некоторые фенилпропаноиды образуют димеры, т.е. соединения типа $(C_6-C_3)_2$, и такие вещества называют *лигнанами*.

Фенольные соединения с двумя ароматическими кольцами подразделяются на:

— соединения $C_6-C_1-C_6$ -ряда имеют два ароматических кольца соединенные мостиком из одного углеродного атома. К ним относятся бензофеноны и ксантоны;

— соединения $C_6-C_2-C_6$ -ряда, в составе которых два ароматических кольца соединены двумя атомами углерода. К ним относятся *стильбены* (два кольца соединяются цепочкой из двух атомов углерода) и *антрахиноны* (два ароматических кольца соединяются двумя атомами углерода с образованием центрального конденсированного третьего кольца);

— соединения $C_6-C_3-C_6$ -ряда имеют два ароматических кольца соединенные тремя атомами углерода. Это наиболее многочисленная группа фенольных соединений, представленная прежде всего *флавоноидами*, которые в свою очередь включают целый ряд подгрупп в зависимости от степени окисления трехуглеродного кислородсодержащего (пиранового) кольца. К ним относятся *флавоны*, *антоцианы*, *флавононы*, *флавонолы* и *изофлавоноиды* и *неофлавоноиды*.

В особые группы выделяют димерные и полимерные фенольные соединения. Это *дубильные вещества* (таннины) и *лигнин*. Термин «таннины» был впервые использован для описания веществ, которые превращали сырые животные шкуры в кожу в процессе дубления (tannin). Связываясь с белками коллагена шкуры животных, таннины повышают устойчивость получаемой кожи к жаре, воде и микроорганизмам.

Наиболее распространенным полимером фенольных соединений в растениях является лигнин. В его образовании принимают участие три оксикоричных спирта: *кониферилловый*, *паракумаровый* и *синаповый*. В результате биохимических превращений они и образуют лигнин, который представляет собой сильно разветвленный полимер.

Для фенольных соединений характерно формирование огромного числа соединений за счет модификаций молекулы и образования конъюгатов с разнообразными структурами. Это может происходить за счет различного замещения в бензольных кольцах (к которым в различных положениях могут присоединяться группы $-OH$, $-OCH_3$, $-CH_3$), способности образовывать гликозиды с широким набором моно- и дисахаридов, а также наличия асимметричных атомов углерода. Фенольные соединения могут также связываться с органическими кислотами, растительными аминами, алкалоидами. Помимо этого растительные фенолы могут соединяться с изопреноидами, образуя большую группу *пренилированных фенолов*. Такие свойства фенольных соединений обеспечивают огромное разнообразие структур, характерное для растительных фенолов.

Фенольные соединения играют важную роль в самых различных физиологических процессах — фотосинтезе, дыхании, росте и защитных реакциях растительного организма. Кроме того, они выполняют механические и структурные функции (лигнин), а также являются аттрактантами для насекомых-опылителей и животных — распространителей семян. Многие представители фенольных соединений обуславливают вкусовые качества растений. Особенно часто это отмечается для флавоноидов. Например, флавонон *нарингенин* придает горький вкус кожуре грейпфрута, тогда как другой флавонон *гесперидин*, обнаруженный в кожуре апельсина и мандарина, такие свойства не проявляет. Во многих плодах (яблоки, груши, вишня, айва, персики, абрикосы) и ягодах (ежевика, земляника, брусника, смородина, малина, виноград) содержатся катехины, также относящиеся к соединениям флавоноидной природы. Наибольшее их содержание было отмечено в молодых побегах чайного растения (до 30% на сухой вес). Катехины играют важную роль в производстве какао, виноделии и особенно в чайной промышленности. Это связано с тем, что продукты окисления катехинов обладают характерной окраской и приятным слабоявляющим вкусом. Кроме того, они проявляют Р-витаминную активность. Часто в растениях встречается рамногликозид кверцетина — *рутин* широко используемый в медицине как капилляроукрепляющее средство.

У 200 природных флавоноидных веществ выявлено 40 видов биологического действия. В основном оно связано с их антиоксидантным и мембраностабилизирующим действием, а также влиянием на ферментные системы. Вследствие такой разнообразной активности флавоноидсодержащие растения служат сырьем для производства препаратов желчегонного, противоязвенного, капилляроукрепляющего, гипотензивного действия. Флавоноиды используются как антимуtagens, противоопухолевые и антиаллергические препараты. Так, препарат ревенон, получаемый из коры приморской сосны, виноградных зерен и куркумы, обладает антиоксидантной активностью в 50 раз превышающей таковую токоферола. Разработанный на основе экстракта виноградных косточек, французский препарат эндотелон используется для лечения онкологических заболеваний.

Алкалоиды представляют собой большую группу азотсодержащих вторичных веществ, найденных у 20% видов сосудистых растений.

Термин «алкалоид» был использован в 1819 г. немецким фармакологом Майсснером. Чтобы особая группа азотсодержащих веществ со щелочными свойствами не была классифицирована как щелочи (*alkali*), он предложил назвать ее алкалоидами. Название происходит от арабского *alkali* — щелочь и греческого *eidos* — подобный.

Алкалоиды содержат азот, чаще всего в составе гетероциклического кольца. В настоящее время известно около 10 000 индивидуальных веществ.

В случае алкалоидов достаточно удачно совпали эмпирическая и химическая классификация. Согласно химической классификации,

алкалоиды — это соединения, содержащие один или несколько атомов азота в молекуле, что и придает им щелочные свойства. Обычно их разделяют на две подгруппы: *протоалкалоиды*, которые содержат азот не в гетероцикле, и *истинные алкалоиды*, содержащие азот в гетероцикле. В распределение алкалоидов на подгруппы внесла коррективы биохимическая классификация. Гликоалкалоиды, а также ряд других алкалоидов (например, алкалоиды аконита) по типу синтеза и по структуре фактически являются изопреноидами. Поэтому было решено выделить их в особую группу — *изопреноидных псевдоалкалоидов*.

Таким образом, по «модифицированной» химической классификации сейчас принято разделять алкалоиды на три подгруппы: *протоалкалоиды* (азот не в гетероцикле); *истинные алкалоиды* (азот в составе гетероцикла); *псевдоалкалоиды* (синтез не из аминокислот). Каждая подгруппа разделяется в свою очередь на 3—10 классов.

Наиболее широко алкалоиды распространены среди покрытосеменных растений. Особенно богаты ими семейства маковых, пасленовых, бобовых, кутровых, мареновых, лютиковых. Во мхах, папоротниках и голосеменных алкалоиды встречаются относительно редко. Разные органы и ткани растения могут содержать разные алкалоиды. Обычно их концентрация невелика и составляет десятые и сотые доли процента. При содержании алкалоидов около 1—3% растение считается богатым алкалоидами (алкалоидоносным). Только немногие растения, например культивируемые формы хинного дерева, могут накапливать до 15—20% алкалоидов.

Алкалоиды могут оказывать токсическое действие на человека. Однако их малые дозы используют в качестве эффективных фармакологических препаратов (морфин, кодеин, эфедрин, атропин). Некоторые алкалоиды (никотин, кофеин, кокаин) применяют как стимуляторы или седативные средства.

Цианогенные гликозиды и глюкозинолаты также являются азотсодержащими веществами. Их иногда называют *прототоксинами*, или *фитоантисипинами*. Они принимают непосредственное участие в защите растений от травоядных животных. При гидролизе цианогенных гликозидов специфичной гликозидазой выделяется синильная кислота.

Цианогенные гликозиды широко распространены в растительном царстве и часто встречаются у представителей бобовых, розоцветных и некоторых злаков. Их много также в клубнях маниоки *Manihot esculenta*, содержащих большое количество крахмала. Это важный пищевой продукт в ряде тропических стран. Клубни и мука маниоки — обычная пища для аборигенов, которые научились в процессе приготовления избавляться от токсичных соединений.

Вторая важная группа растительных прототоксинов — *глюкозинолаты* — впервые была выявлена у растений семейства крестоцветных *Cruciferae*. В растении глюкозинолаты так же, как и цианогенные гликозиды, пространственно отделены от гидролизующих их фермен-

тов. При повреждении растительных тканей происходит смешивание глюкозинолатов с соответствующими ферментами и превращение их в летучие токсичные вещества с горчичным запахом — *изотиоцианаты* и *нитрилы*. Образующиеся вещества функционируют как токсины и репелленты для травоядных животных. Большинство исследований, посвященных глюкозинолатам, выполнено на рапсе *Brassica napus*, который является важным источником для получения пищевого растительного масла в Северной Америке и Европе. Одна из основных задач селекционеров при этом состоит в получении семян рапса с резко сниженным содержанием глюкозинолатов.

Таким образом, в растениях синтезируются различные соединения вторичного метаболизма. При этом разные их группы находятся в растении в динамическом состоянии, а содержание меняется от органа к органу в ходе онтогенеза. Поэтому, с одной стороны, при проведении скрининга желательно собрать как можно больше образцов разных частей растений на разных фазах развития, а с другой — при интерпретации полученных данных необходимо сравнивать данные о содержании изучаемого соединения в сходных частях растений, отобранных на одной и той же фазе развития. Таким образом, данные о динамике содержания вторичных метаболитов представляют непосредственный интерес при проведении хемотаксономических исследований.

Поскольку многие из вторичных метаболитов обладают высокой биологической активностью, то они могут найти широкое практическое применение, что и привлекло внимание ученых-биотехнологов. И в этом плане перспективным источником получения вторичных веществ могут быть каллусные и суспензионные культуры высших растений.

Культуры *in vitro* — продуценты вторичных соединений

Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей в условиях *in vitro*, позволяют использовать их для практического применения. Особый интерес представляет способность изолированных клеток, тканей и органов синтезировать вещества вторичного метаболизма, которые широко используются в медицине, защите растений, ветеринарии, кормопроизводстве, пищевой промышленности, парфюмерии и др.

Такой интерес исследователей к этому направлению работ неслучаен, так как клеточная биотехнология для получения физиологически активных веществ имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием традиционного растительного сырья:

- 1) получение биомассы клеток не зависит от сезона, климатических и почвенных условий;
- 2) возможность оптимизировать условия культивирования суспензии клеток, позволяющих синтезировать в необходимом количестве нужные вещества;

3) автоматизация процесса.

Использование клеточных культур растений важно и в тех случаях, когда:

- невозможно выращивание растения в природе;
- имеются трудности в его сборе;
- содержание вторичных соединений в культурах *in vitro* высокое или высокая его цена на мировом рынке;
- хороший рост клеточных культур растений на сравнительно простых по составу питательных средах;
- вторичное соединение (или соединения) выделяются клетками в питательную среду;
- возможно получение высокопродуктивных растительных культур.

Основным условием для этих работ является тот факт, что культуры *in vitro*, так же как и интактные растения, синтезируют вторичные метаболиты.

Первые данные, касающиеся синтеза вторичных соединений в клеточных культурах растений появились в литературе в 1940 г., когда Дж. Боннер сообщил об образовании каучука клетками гваялы. Первыми лекарственными растениями, исследованными в культуре ткани, были барвинок розовый и белена черная. Исследования Телле и Готре доказали способность культуры ткани белены к синтезу алкалоидов. Позднее появились и другие сообщения о получении культур тканей различных лекарственных растений, способных синтезировать многие уникальные соединения вторичного метаболизма. Это культура ткани табака, накапливающая большие количества никотина (0,7%), диоскореи — 1,6% диосгенина и другие.

В отделе биологии клетки и биотехнологии Института физиологии растений РАН (Москва) собрана большая коллекция, используемых в промышленности клеточных культур растений, синтезирующих вторичные метаболиты. Это культуры женьшеня дальневосточного (источник алкалоида диосгенина), диоскореи дельтовидной (источник стероидных гликозидов), раувольфии змеиной (продуцент антиаритмического алкалоида аймалина), стевии (источник заменителя сахара — стевиозида) и др. В последние годы большое внимание в мире уделяется культивированию клеток тиса ягодного, синтезирующего уникальное вещество терпеноидной природы — таксол, которое является противораковым препаратом.

Использование культур *in vitro* для получения вторичных соединений связано с их высокой продуктивностью. Экспериментально доказано, что прирост клеточной биомассы в условиях *in vitro* и *in vivo* может проходить с разной скоростью. Например, за год прирост корня женьшеня в тайге составляет 1 г, на плантации — 3 г, а при выращивании клеток корневого происхождения на агаре (*in vitro*) можно получать 0,4 г сухой массы на литр среды в день. Биомасса клеток женьшеня в суспензии при выращивании в 50—литровом ферментере увеличивается до 2 г в литре среды за сутки, что в 1000 раз больше, чем при выращивании

на плантации. Учитывая высокую стоимость женьшеня, (килограмм плантационного корня стоит 100—150 долл. США; цена дикорастущего корня может доходить до нескольких тысяч долларов США), с экономической точки зрения биотехнологический способ получения биомассы культуры клеток женьшеня весьма перспективен.

Вещества вторичного синтеза, как правило, получают из суспензионной культуры, которую выращивают в биореакторах или ферментерах. И в этом случае, важной характеристикой клеток популяции является ее стабильность в отношении синтеза метаболитов. Она может сохраняться в течение всего времени существования популяции, постепенно снижаться за счет медленного увеличения числа клеток со сниженным синтезом метаболитов или быть нестабильной — в случае быстрой потери способности клеток синтезировать вторичные метаболиты.

Технология выращивания культур клеток в биореакторах является масштабным процессом. Специалисты немецкой фирмы DIVERSA (ныне — FYTON) осуществили выращивание ряда культур в биореакторах объемом до 75 000 л. В России на Омутминском биохимическом заводе в биореакторах объемом до 2,5 м³ в промышленном масштабе получили биомассу женьшеня, В ТОО «Тэмбр» (г. Ярославль) осуществлено проточное культивирование клеток женьшеня в промышленных биореакторах объемом 7,5 м³. В Институте физиологии растений (Москва) оптимизированы режимы культивирования целого ряда различных культур клеток высших растений в биореакторах объемом 630 л: женьшеня настоящего, полисциаса и других аралиевых, диоскореи дельтовидной, маральего корня и др.

Российские ученые разработали технологию, в прямом смысле слова жизненно важную для десятков тысяч пациентов. Она в принципе позволяет получать практически любое требуемое количество паклитаксела — основы одного из самых эффективных, но и самых дорогих препаратов для лечения некоторых видов онкологических заболеваний, в том числе рака легких, яичников и молочной железы. Субстанция, полученная по новой технологии, по структуре ничем не отличается от обычной, но стоит будет, по мнению авторов, существенно дешевле. Дело в том, что высокая цена паклитаксела — это не прихоть фармацевтов, а следствие огромных затрат на его производство. В природе он есть только в коре очень редкого и очень медленно растущего дерева — тихоокеанского тиса. Чтобы выделить количество, которое необходимо для лечения только одного пациента, нужно собрать кору с 10—12 взрослых деревьев. Понятно, что такое лекарство дешевым просто не может быть. Разумеется, обнаружив удивительные свойства паклигаксела, ученые не перестают искать «обходные пути» — способы более дешевого его получения. Были разработаны и методы химического синтеза, и способ получения полупродукта из хвои тиса с последующей его переработкой в паклитаксель. Но, увы — оказалось, что синтетический аналог существенно дороже вещества, выделенного из природного сырья.

Метод, который предлагают использовать специалисты ОАО «БИО-ХИММАШ», правильнее отнести к области биотехнологии. Это ценное лекарство ученые научились выделять из природного сырья. Но не из деревьев, а из культуры клеток тиса, выращенных в ферментере и способных эффективнее прочих вырабатывать искомую субстанцию.

Продуктивность клеточных культур высших растений в отношении синтеза вторичных веществ зависит также от состава питательной среды, используемой для их выращивания.

Углеводы являются обязательными компонентами питательных сред. Клеточные культуры могут расти на различных углеводах (испытано более 30 различных соединений), но в большинстве случаев их лучший рост отмечается при добавлении в среду двух сахаров — глюкозы или сахарозы. В то же время высокий уровень синтеза свойствен культурам, растущим на сахарозе, а на средах с глюкозой синтез часто сильно ослаблен. Причины этого явления неясны. Повышенные концентрации сахарозы (5%) в среде эффективны для роста культуры диоскореи, а пониженные концентрации (1,5%) — для продуктивности диосгенина.

Минеральный состав сред также оказывает большое влияние на синтез вторичных соединений, при этом наиболее важно содержание фосфора, калия и различных форм азота. Высокие концентрации фосфора в большинстве случаев приводят к улучшению роста культуры и ослаблению синтеза вторичных метаболитов. Это отмечалось для синтеза никотина в культуре клеток табака, антоцианов — в культивируемых клетках моркови, катехинов — в каллусах чая. Накопление вторичных веществ в культурах *in vitro* обычно начинается после полного использования фосфора, входящего в состав питательной среды.

Имеются данные о том, что повышение концентрации фосфора в среде увеличивало содержание алкалоидов в культуре барвинка розового и антрахинонов в культуре клеток *Galium sp.*

Показано, что как для роста, так и для синтеза вторичных соединений необходимы минеральные формы азота. При этом органические формы (пептон, дрожжевой экстракт и др.) тормозят и рост, и синтез. Очень важно соотношение аммонийного и нитратного азота. Можно проследить определенную тенденцию — повышение доли нитратного азота способствует увеличению синтеза вторичных веществ, в частности диосгенина в культуре клеток диоскореи.

Фитогормоны — это компоненты среды привлекающие наибольшее внимание исследователей. Однако влияние гормонов на синтез вторичных соединений в культуре клеток неоднозначно и может изменяться в зависимости от класса вторичных соединений, физиологического состояния культуры, условий культивирования и др.

Наиболее интенсивно изучались ауксины и цитокинины, так как они, как правило, являются необходимыми компонентами сред. Имеется большое число примеров, когда ауксины стимулировали синтез вторичных соединений, а когда — подавляли. Ауксины стимулировали синтез антоцианов в культурах моркови и тополя, антрахинонов

в *Cassia fistula* и *Cassia torra*, сапогенинов в тригонелле; уменьшали и исключали синтез антрахионов и шиконина в воробейнике, скополамина — в гиосциамусе, хлорогеновой кислоты — в табаке.

Достаточно часто влияние ауксинов на синтез вторичных метаболитов зависит от природы ауксина. Так, синтез никотина в табаке стимулируется НУК и ИУК, но тормозится 2,4-Д; синтез антоцианов и нафтахинонов в клетках культуры *Plumbago zeylanica*, наоборот, стимулируется повышенными концентрациями 2,4-Д и тормозится ИУК и НУК. В целом 2,4-Д чаще, чем ИУК и НУК, отрицательно влияет на синтез вторичных соединений.

Результатов по влиянию цитокининов на синтез вторичных соединений существенно меньше, что не позволяет уловить какие-либо закономерности. Например, бензиламинопурин стимулировал синтез стероидных сапогенинов в культуре паслена, а кинетин также стимулировал синтез алкалоидов в клетках скополии, но полностью ингибировал синтез никотина в культуре клеток табака. Результаты по другим классам фитогормонов весьма фрагментарны и противоречивы.

Влиянию предшественников синтеза вторичных метаболитов на продуктивность клеточных культур посвящено большое число работ. В большинстве случаев, добавление их к питательной среде для роста клеток не приводит к существенному увеличению продуктивности. Так, добавление в среду культивирования диоскореи холестерина (концентрация 100 мг/л) вызывало в лучшем случае включение в диосгенин менее 1% внесенного стерина. Добавление в культуру барвинка розового триптамина также привело лишь к незначительному увеличению выхода алкалоидов. По всей видимости, для синтеза вторичных соединений в культуре определяющим фактором концентрация предшественников не является.

Все это свидетельствует о том, что, используя различные комбинации питательных сред, можно повысить продуктивность клеточных культур высших растений и их эффективность в отношении синтеза вторичных веществ.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие соединения относятся к первичным и вторичным метаболитам?
2. Расскажите о терпенах, их структуре и функциях.
3. Перечислите основные классы фенольных соединений.
4. Какие соединения являются алкалоидами?
5. Перечислите основные группы алкалоидов.
6. Расскажите о цианогенных гликозидах.
7. Какие преимущества при получении вторичных метаболитов имеют клеточные культуры по сравнению с растениями? Перечислите их.
8. Какие компоненты питательных сред способствуют повышению образования вторичных метаболитов в клеточных культурах растений?
9. Что известно о действии предшественников на синтез вторичных метаболитов?

Глава 4

КРИОСОХРАНЕНИЕ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ К КЛЕТОЧНЫМ КУЛЬТУРАМ РАСТЕНИЙ

Термин «криосохранение» (cryopreservation), т.е. хранение объектов при очень низкой температуре (обычно при температуре жидкого азота -196°C), употребляется для обозначения сложного многоэтапного процесса. Его целью является неограниченно долгое хранение живых клеток, тканей и органов в состоянии анабиоза. Основным признаком криосохранения является обратимое ингибирование процессов жизнедеятельности. Только в состоянии глубокого анабиоза, когда полностью останавливаются обменные, биохимические реакции и отсутствует жидкая фаза, создаются условия для длительного хранения биологической системы с последующим полным возвратом ее к исходному состоянию в условиях нормотермии.

Единственно надежным средством для решения этой задачи является глубокий холод (-140°C и ниже), обеспечиваемый с помощью жидкого азота (-196°C).

В настоящее время известны два метода криосохранения: программное (медленное) и сверхбыстрое замораживание. Программное замораживание изучалось уже давно, поэтому оно довольно широко применяется при сохранении животных и растительных клеток. Сверхбыстрое замораживание вошло в практику сравнительно недавно, однако, считается, что за этим методом будущее.

Важнейший этап процесса криосохранения — замораживание. На этом этапе возникают трудности, так как существуют две группы объектов, подвергаемых криосохранению.

Первая группа — это ткани, содержание воды в которых минимально (пыльца, ортодоксальные семена). Для таких объектов этот процесс достаточно прост. Их можно прямо погружать в жидкий азот и оттаивать впоследствии на воздухе в обычных условиях.

Вторая группа — это большинство растительных тканей. Для них характерны большие размеры клеток, прочная целлюлозная стенка и наличие центральной вакуоли. Причем именно степень вакуолизации клетки (оводненность) играет основную роль в устойчивости к действию низких температур. У таких объектов прием простого замораживания мало эффективен, так как не происходит сохранение всех исходных свойств и жизнеспособности.

При проведении работ по криосохранению клеток растений, особенно культивируемых в условиях *in vitro*, необходимо отбирать мелкие клетки с маленькой вакуолью и пониженным содержанием воды. Для этого необходимо разрабатывать в каждом отдельном случае условия замораживания и последующего их оттаивания. Это связано с тем, что одним из повреждающих факторов при замораживании является лед. Он возникает сначала в растворе вокруг клеток. Другим повреждающим фактором является дегидратация клеток, вызываемая формированием кристаллов этого внеклеточного льда. Поэтому необходимо с наименьшей потерей жизнеспособности миновать при замораживании-оттаивании зону между температурой защитного раствора и -40°C (в редких случаях до -70°C). Именно в этой температурной зоне проявляется действие обоих повреждающих факторов замораживания, каждый из которых опасен потому, что способен вызвать деструкцию внешней клеточной мембраны — плазмалеммы, и, следовательно, гибель клеток.

При проведении криосохранения живых организмов стоит несколько задач.

Первая задача криосохранения — предотвратить образование кристаллов льда внутри клеток. В случае клеток растений она решается труднее, чем для других объектов, вследствие обилия в них свободной воды. Эту трудность можно преодолеть за счет снижения скорости охлаждения или предварительным обезвоживанием клеток. Известно, что чем больше воды в клетке, тем меньше должна быть скорость замораживания. С другой стороны, предварительное обезвоживание клеток может вызвать их повреждения, связанные с дегидратацией.

Вторая задача криосохранения — ослабить стрессовые воздействия, вызванные неизбежной дегидратацией. Для этого необходим оптимальный состав смеси протекторов и оптимальная скорость замораживания. Желательна также оптимизация всей программы процесса криосохранения.

Правильный подбор условий, обеспечивающих высокую выживаемость клеток при оттаивании и рекультивации, был осуществлен при проведении планомерных фундаментальных и прикладных исследований по выяснению механизмов криоповреждений и криозащиты биологических систем разных уровней организации.

Рассмотрим эти основные механизмы.

1. **Предотвращение образования внутриклеточного льда.** В большинстве случаев клетка погибает при образовании льда в протопласте, поскольку для ее структур безопасны лишь кристаллы льда размером не более 0,1 мкм.

При быстром понижении температуры ($20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) в протопласте образуются очень мелкие кристаллы льда, которые являются центрами кристаллизации. Они быстро растут, присоединяя молекулы воды из протопласта. Образующиеся большие кристаллы льда способны механически повредить клетки, в основном мембраны и клеточные структуры.

При медленном замораживании (в парах жидкого азота или в специальных программных замораживателях) лед образуется, в первую очередь, в межклетниках. Известно, что менее концентрированные растворы, находящиеся в них, замерзают быстрее. По мере охлаждения, возникшие в апопласте, кристаллы льда растут за счет воды. Лед формирует градиент водного потенциала, направленный из клеток в межклетники. Это постепенно приводит к дегидратации клеток и, как следствие, к денатурации белков, нарушению функционирования мембран, увеличению концентрации ионов до токсических величин, нарушению синтеза нормальных клеточных белков.

Образование внеклеточного льда и связанный с этим отток воды из клеток стимулируются специальными веществами, которые клетки выделяют в апопласт. Такие соединения называются нуклеаторами, а сам процесс — нуклеацией. Эти вещества исполняют роль центров кристаллизации воды (затравок), тем самым повышая порог зародышеобразования льда. Благодаря нуклеаторам, лед в межклетниках образуется при более высокой температуре, чем те температуры, которые требуются для замерзания внутриклеточной среды.

Таким образом, постепенная дегидратация протопласта является одним из необходимых условий выживания клеток при замораживании.

2. *Биологические антифризы.* В клетках некоторых растений синтезируются высокомолекулярные соединения, тормозящие процессы нуклеации и роста кристаллов льда. Эти соединения получили название биологических антифризов. Антифризы препятствуют внеклеточному образованию льда, особенно в тех органах и тканях, чьи клетки должны сохранить максимальное количество воды и находиться в переохлажденном состоянии (почки и меристемы). Известны антифризы белковой, гликопротеиновой и полисахаридной природы.

Таким образом, возможно с помощью антифризов осуществляется блокада роста кристаллов льда.

3. *Накопление сахаров и других совместимых осмолитов.* Снижение содержания воды в клетках при образовании внеклеточного льда и сопутствующее дегидратации увеличение концентрации ионов в цитоплазме вызывают различного рода нарушения в структуре и функциях биополимеров, в частности происходит денатурация белков и подавляется их ферментативная активность, изменяется структура липидного бислоя мембран и нарушается их целостность. Деструктивные изменения в мембранах в свою очередь приводят к нарушению внутриклеточной компартментации веществ.

Регуляция осмотического давления в клетках при холодовой дегидратации осуществляется преимущественно за счет биосинтеза низкомолекулярных органических соединений, которые получили название осмолитов. Они хорошо растворимы в воде, нетоксичны, не вызывают изменений в метаболизме, отчего и получили второе название совместимых веществ. Это могут быть моно- и олигосахариды, многоатомные спирты, аминокислоты, бетаины, амины и белки.

Наряду с осморегуляцией, эти вещества выполняют еще одну очень важную при дегидратации функцию. Она может быть определена как защитная (протекторная) по отношению к биополимерам цитоплазмы. Подчеркивая двойную роль осмолитов, их часто называют криопротекторами и (греч. *kryos* — холод, лат. *protector* — покровитель, защитник).

Наиболее известны такие криопротекторы, как диметилсульфоксид (ДМСО), различные сахара, глицерин, этиленгликоль, пролин. Все они делятся на две группы — проникающие и непроникающие в клетки, хотя это разделение достаточно условно.

Так, глицерин может проникать в клетку при комнатной температуре, или выступать как непроникающее соединение, если его добавлять при 0°C.

Криопротекторы, синтезируясь в клетках при пониженных температурах, могут предотвратить или резко замедлить рост кристаллов льда. Чем выше концентрация раствора, тем ниже точка его замерзания. При накоплении, например, растворимых сахаров в клетке, во-первых, понижается водный потенциал цитоплазмы, снижается точка ее замерзания, что препятствует образованию внутриклеточного льда. Во-вторых, сахара повышают осмотическую концентрацию клеточного сока, способствуя увеличению водоудерживающей силы клеток и, тем самым, защищая их от обезвоживания при образовании внеклеточного льда. В-третьих, сахара защищают белки от денатурации, наступающей вследствие сближения макромолекул при дегидратации, а также повышения концентрации токсичных веществ.

Таким образом, гидрофильные белки, моно- и олигосахариды, обладающие криопротекторным эффектом, способны связывать значительные количества воды. Связанная таким образом вода уже не замерзает и не транспортируется. Считается, что белки и углеводы, обладающие криопротекторным эффектом, способны стабилизировать другие белки и клеточные мембраны при дегидратации клеток.

4. *Изменение состава мембранных липидов и текучести мембран.* Дегидратация клеток оказывает непосредственное действие на структурное состояние липидов мембран. Мембраны в норме связывают до 30—50% воды клетки. Взаимодействуя с заряженными и полярными группами белков и фосфолипидов, вода стабилизирует структуру мембран.

Основной причиной повреждающего действия низких температур на клетки является нарушение функционирования клеточных мембран из-за их затвердевания, связанного с фазовыми переходами, поскольку при достаточно низких температурах липидные бислои ведут себя, как твердые тела. При температуре выше фазового перехода структура бислоя сохраняется, при этом жирные кислоты «плаваются», в результате чего вращение и скручивание молекул происходит легче, чем при низких температурах.

Различная реакция на низкие температуры определяется в первую очередь различиями в составе жирных кислот, входящих в состав мем-

бренных фосфолипидов. Когда в фосфолипидах велико содержание насыщенных жирных кислот (таких как пальмитиновая и стеариновая), для таких мембран характерны более высокие температуры фазового перехода. При этом они становятся менее текучими, что нарушает функционирование многих белков — каналов, переносчиков, рецепторов, ферментов и т.п. Выявлено, что увеличение количества ненасыщенных жирных кислот (таких как линоленовая и линолевая) в составе мембран приводит к снижению температуры фазового перехода мембранных липидов и, как результат, увеличивается текучесть таких мембран.

Сильная дегидратация может стать причиной нарушения связи между липидами и белками мембран. При внеклеточном образовании льда в мембранах появляются участки, не содержащие белков.

Таким образом, главной мишенью криповреждений клеток растений является плазмалемма. Рост толерантности к замораживанию связан с изменениями ее характеристик, в том числе состава липидов и их ненасыщенности.

5. *Абсцизовая кислота*. Важная роль в адаптации клеток растений к низким температурам принадлежит фитогормону АБК (абсцизовая кислота). Было обнаружено, что АБК накапливается в растениях при различных неблагоприятных воздействиях (водном дефиците, повышенной концентрации солей, пониженной температуре и т.д.). Поскольку АБК играет важную роль в адаптации растений к стрессам, это соединение получило название гормона стресса.

На многих растениях из разных систематических групп показано увеличение внутриклеточной концентрации АБК при пониженных температурах, причем у разных видов степень увеличения была различна.

Дегидратация сопровождается значительным повышением концентрации гормона в растительных тканях и синтезом в них новых белков. Активность многих генов и белков, которые экспрессируются при низкой температуре или водном дефиците, может быть индуцирована обработкой АБК.

Таким образом, накопление АБК в ткани при пониженной температуре приводит к экспрессии ряда генов и появлению криопротекторных белков.

6. *Окислительный стресс*. При низких температурах наблюдается интенсивное образование АФК (активных форм кислорода) в хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и апопласте. При продолжительном холодовом воздействии на клетки уровень АФК повышается во многих компартментах, в клетке накапливается перекись и развивается окислительный стресс.

Важный фактор устойчивости клеток к низкотемпературному воздействию — функционирование мощной антиоксидантной системы. В эту противоокислительную систему входят высокомолекулярные антиоксиданты — ферменты, такие как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, пероксидаза, глутатион-редуктаза, а также низкомолекулярные — аскорбат, токоферол, глутатион, фенольные соединения.

При низкотемпературном стрессе активность антиоксидантных ферментов значительно возрастает, увеличивается и содержание низкомолекулярных антиоксидантов. Все это способствует снижению повреждения клеток при действии низких температур.

Важным моментом при криосохранении являются **способы подготовки к глубокому замораживанию**. Известно, что устойчивость клеток к замораживанию зависит от их исходного морфофункционального состояния, которое определяется особенностями культивирования, фазой роста и т.д. Так клетки в стационарной фазе обладают наиболее высокой устойчивостью. Можно подвергать замораживанию клетки и в логарифмической фазе роста, тогда для них необходимо подобрать оптимальную скорость охлаждения, иногда возникает необходимость в применении криопротекторов. При проведении работ по криосохранению необходимо, прежде всего, учитывать специфику растительных клеток; отбирать мелкие клетки, с маленькой вакуолью и пониженным содержанием воды.

Технологически процесс криоконсервации многоэтапен. Первый этап — стадия культивирования перед криоконсервированием. От состава среды культивирования в ряде случаев зависит криоустойчивость организмов. Изменение соотношения углерода и азота в среде, введение в среду культивирования жирных кислот, солей кальция либо других компонентов меняет криочувствительность организмов, выращенных в этих условиях. В связи с этим было предложено предварительное культивирование клеток растений в определенных условиях.

Отмечено, положительное влияние на криоустойчивость как краткой инкубации клеток при пониженной температуре, так и закаливания — естественной подготовки морозоустойчивых клеток. Закаливание суспензий клеток проводят, постепенно снижая температуру культивирования и одновременно увеличивая концентрацию сахарозы в среде, затем добавляют и разные криопротекторы. Однако способность к закаливанию генетически детерминирована.

Другой физиологический подход подготовки к криосохранению основан на снижении водного потенциала среды за счет добавления в нее осмотически активных веществ — криопротекторов. Среди всех известных криопротекторов выделяются такие легко проникающие в клетки вещества, как диметилсульфоксид (ДМСО, 5—10%), глицерин (10—20%), а также непроникающие высокомолекулярные — поливинилпирролидон (ПВП), декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 6000.

Криопротекторами могут также служить сахароза, трегалоза и смеси этих растворов. Кроме того, предварительное культивирование с маннитом и сорбитом (в концентрации 2—6%) способствовало уменьшению растяжения клеток. Положительный эффект данной подготовки к криосохранению связан со снижением оводненности клеток.

Следующий способ подготовки связан с физиологической ролью некоторых эндогенных аминокислот при различных стрессах, обу-

словленных водным дефицитом. В первую очередь, это пролин, чье значение для связывания воды в клетках растений широко известно. Для этих целей применяют также аланин, аспарагин, серин, глицин, а также γ -аминомасляную кислоту.

Как известно, образование стрессовых белков, обуславливающих устойчивость к низким температурам, регулируется фитогормоном АБК. В результате воздействия экзогенной АБК возможно увеличение морозоустойчивости и формирование защитных механизмов у растительных объектов, что является существенным для целей криоконсервирования.

При наблюдении за клетками под криомикроскопом четко видно образование внутриклеточного льда, находящееся в прямой зависимости от степени переохлаждения, от скорости замораживания, от наличия или отсутствия центров инициации кристаллизации раствора, окружающего клетки.

Большое значение при криосохранении имеет правильно подобранный режим замораживания. Так при криосохранении клеток, тканей растений и микроорганизмов целесообразно применять программное замораживание с инициацией кристаллизации и скоростью охлаждения на первом этапе замораживания $0,25\text{—}1,0^\circ\text{C}/\text{мин}$ (до -40°C). На втором этапе увеличивать скорость до $9\text{—}10^\circ\text{C}/\text{мин}$ и около -60°C быстро погружать в жидкий азот.

Эту работу проводят на специальном оборудовании, обеспечивающем программное замораживание. Такие приборы выпускает специальное конструкторское технологическое бюро с опытным производством при Институте проблем криобиологии и криомедицины (г. Харьков).

Этап удаления криопротекторов и рекультивирование требует особых предосторожностей, так как выжившие клетки перенесли сильнейший стресс и частично повреждены. Для сохранения таких клеток необходимо свести к минимуму все воздействия, которые могут дополнительно повредить клетки и плазмалемму. Однако криопротекторы должны быть удалены. Был предложен физиологичный, щадящий способ для интенсификации процесса рекультивирования. Этот способ основан на диффузии криопротекторов из клеток в жидкую среду после высева суспензии клеток на фильтры, расположенные на поверхности раствора. Такая система позволяет менять раствор, не тревожа клетки, чтобы избежать дополнительного стресса, и интенсифицировать рекультивирование.

Для определения жизнеспособности клеток после оттаивания применяют наиболее простой, быстрый и вполне удовлетворительный способ — окраска витальным красителем ($0,1\%$ феносафранином или $0,25\%$ раствором синьки Эванса), в результате которой мертвые клетки окрашиваются, а живые нет. Окончательным критерием жизнеспособности клеток, безусловно, служит четкое возобновление роста и деления клеток при рекультивации на искусственных питательных средах после оттаивания.

Таким образом, если к моменту глубокого замораживания клеточные штаммы сохраняли способность к регенерации, то и после криосохранения также имеется возможность регенерировать эти растения независимо от сроков хранения в жидком азоте, т.к. восстанавливать рост клеточных культур можно спустя годы, а эмбриогенные и морфогенетические потенции в результате криосохранения не изменяются. Конечно, если режим хранения не был нарушен, т.е. температура никогда не превышала -140°C , а все этапы криоконсервирования были достаточно оптимизированы. Следовательно, криосохранение является фактически консервацией в состоянии анабиоза (криобиоза), когда все процессы жизнедеятельности прекращены, но при правильном оттаивании и рекультивировании их можно возобновить и «оживить» биологические объекты.

Однако криосохранение требует дальнейшей работы по подбору условий к обеспечению выживания клеток. При этом следует учитывать морфофизиологические и генетические особенности клеток, способность их к закаливанию, степень проницаемости клеточных мембран; правильно подобрать смесь криопротекторов, скорость снижения температуры при замораживании и, соответственно, условия оттаивания.

Таким образом, технология, связанная с криосохранением растительных объектов, развивается и постоянно совершенствуется. Несомненно, что она имеет свое будущее, поскольку уже сегодня криобанки, основанные на методе криосохранения, могут значительно облегчить работу селекционеров, предоставив им возможность широко использовать пул генов сортов, в том числе старой селекции и диких видов, а также исчезающих видов растений.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие способы сохранения живых объектов известны? Расскажите о них.
2. Какие технологические подходы используют для снижения экономических затрат при сохранении генофонда растений?
3. Дайте определение термина «криосохранение».
4. В чем сущность понятия «криоконсервация»? Каково его биологическое значение?
5. Перечислите методы, используемые при криосохранении объектов.
6. Почему замораживание является важнейшим этапом процесса криосохранения? Расскажите о нем.
7. Какие задачи стоят при проведении криосохранения живых организмов?
8. В чем сложность замораживания растительных клеток?
9. Сравните влияние на клетки внеклеточного и внутриклеточного льда, образующегося при замораживании объектов?
10. Как предотвратить образование внутриклеточного льда?
11. Расскажите о биологических антифризах.
12. Какие изменения в метаболизме живых организмов происходят при криосохранении?
13. Что такое криопротекторы?

14. Какова функциональная роль криопротекторов при подготовке живых объектов к криосохранению? В чем заключаются особенности их применения?
15. Сравните технологии быстрого и медленного замораживания и перспективы их применения.
16. Какие изменения происходят в мембранах клеток при низких температурах?
17. Какой фитогормон играет важную роль при адаптации клеток к низким температурам и в чем его значение?
18. Перечислите этапы технологического процесса криоконсервации и расскажите о них.

ЛАБОРАТОРНЫЙ ПРАКТИКУМ



ОСНОВЫ ПРОВЕДЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РАБОТ

Водоросли, грибы, микроорганизмы, культуры клеток и тканей животных и растений, а также другие биологические объекты находят все более широкое применение в биотехнологии для решения многих вопросов, а также для получения ценных для народного хозяйства продуктов. Для этого требуются определенные методологические подходы, оборудование и условия, зависящие от поставленных задач.

Главными направлениями развития биотехнологии, которая является не только наукой, но и отраслью производства, будут следующие:

- молекулярная биология и генетическая инженерия;
- микробиология и микробиологическая промышленность;
- культура клеток и тканей *in vitro*.

Рассмотрим основные принципы, которые необходимо учитывать при проведении биотехнологических работ.

1. Помещения для проведения биотехнологических работ

Основой планирования помещения для работы с культурой клеток, тканей и органов является специализированный блок, состоящий из моечной комнаты, помещения для стерилизации сред, инструментов и материалов, комнаты для приготовления питательных сред, асептического и термостатированного помещений, лабораторных комнат, и комнат для культивирования.

Для удобства проведения дезинфекции полы и стены в помещениях лучше покрыть кафелем, а потолок побелить.

Моечная комната должна быть свободной по площади, иметь моечные машины или мойки из кислотоустойчивого материала, поскольку при мытье посуды могут применяться крепкие кислоты и щелочи, холодную и горячую воду. Необходимо разместить в ней дистилляторы и бидистилляторы, а также бутылки для хранения этой воды. Для обработки посуды кислотами желательно иметь отдельный отсек, эмалированные кюветы и сосуды. В моечной комнате устанавливают стеллажи для сушки посуды, а также сушильные шкафы с режимом работы для сушки посуды — до 100—130°C, для инструментов — до 170°C. Необходимо также иметь емкости для хранения моющих средств и вытяжные шкафы, где размещаются эксикаторы для хромпика (98% H_2SO_4 + K_2CrO_7), используемого в некоторых случаях для мытья посуды.

Комната для приготовления питательных сред оборудуется лабораторными столами, шкафами для хранения чистой посуды и реактивов, холодильниками для хранения питательных сред. В случае отсутствия весовой комнаты в ней можно установить аналитические и торсионные весы для взвешивания минеральных солей, углеводов, агара и других компонентов питательных сред. Желательно иметь иономер для определения pH питательных сред, магнитные мешалки, плитки и набор различной посуды (колбы, стаканы, мерные цилиндры, мензурки, пробирки и др.). Химические реактивы, используемые для приготовления питательных растворов, должны иметь надлежащую степень чистоты (ХЧ, Ч, ЧДА).

Помещение для стерилизации сред, инструментов и материалов оборудуется автоклавами (режим работы — давление 1—2 атмосферы и температура 120°C), сушильными шкафами для стерилизации сухим жаром, аппаратами для дистилляции и бидистилляции воды, столами для размещения стерилизуемых сред и материалов, шкафами для их хранения. Данное помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и иметь канализационный слив для отвода конденсата из автоклава.

Стерильное помещение (бокс, операционная комната) для изоляции и пересадки культур наиболее важное в специализированном блоке. Его следует располагать дальше от источников заражения, нагревательных устройств и мест с усиленным движением. Асептическое помещение не должно иметь окон и газовой проводки и, по возможности, быть большим (около 15 м²). Можно предусмотреть создание нескольких операционных комнат для выполнения различных работ и закладки одновременно нескольких опытов.

В последнее время широкое распространение получают ламинарные боксы (камеры ламинарного потока стерильного воздуха), которые производятся в ряде стран, в том числе и России. В зависимости от объема выполняемых работ в помещении их устанавливают от одного до пяти.

В стерильном боксе не должно быть лишних предметов во избежание заражения изолируемых тканей. Желательно использовать рабочие столы, покрытые гладким, легко стерилизующимся материалом. Пол, потолок, стены и другие поверхности должны быть покрыты материалами, на которые мало садится пыль, и их можно легко мыть и дезинфицировать. В бокс должен поступать стерильный кондиционированный воздух. Для этой цели используют специальные очистительные фильтры. Стерильность воздуха достигается также с помощью бактерицидных ламп.

В термостатированном помещении (культуральная) с кондиционированным воздухом, строго регулируемой температурой (для большинства культур 25—27°C) и относительной влажностью воздуха (70%) на стеллажах и полках размещают изолированные культуры. В этой же комнате можно поместить различные установки для накопительного культивирования клеточных суспензий.

Отдельные помещения необходимы для крупномасштабных работ с клеточными суспензиями, выращиваемыми в различных режимах глубинного культивирования.

Культуральные комнаты могут иметь световое отделение, имеющее источники освещения со спектром близким к спектру дневного света (от 3 до 10 kLx), а также искусственное освещение с регулируемой интенсивностью и спектральным составом света. Необходимо иметь и темновое отделение. Для культивирования эксплантов в некоторых случаях используют термостаты или хладотермостаты, способные с высокой точностью поддерживать задаваемые режимы температуры и влажности воздуха.

Банк клеточных культур — комната, где в условиях глубокого замораживания хранят ценные половые и соматические клеточные линии, меристемы, эмбриониды. Для этой цели используют различные аппараты программного замораживания.

Недопустимо поступление в операционную и культуральную комнаты различных летучих веществ (фенол, формалин).

Должна быть комната для обработки и хранения данных экспериментальной работы.

2. Посуда, инструменты и материалы

Для биотехнологических работ необходимо иметь определенный набор посуды, разнообразие и количество которой зависят от поставленных задач и масштабов проводимых исследований. Это должна быть посуда для приготовления питательных сред, для хранения этих сред и бидистиллированной воды, посуда для пересадки и для выращивания, а также должны быть инструменты для изолирования и посадки тканей на среды.

Среди посуды для выращивания особое внимание надо уделить пробиркам для выращивания клеточных суспензий на роллере и культуральным сосудам для специальных целей (изучение питания корней отдельными компонентами, для накопительного и проточного культивирования клеточных суспензий). Эта посуда должна быть оснащена боковым тубусом для стерильного забора проб.

В последние годы все большее распространение приобретает использование автоматических пипеток с регулируемым объемом. Это позволяет значительно ускорить процесс приготовления питательных сред.

Для биотехнологических работ необходимо иметь вату и марлю. Вату используют для приготовления пробок, ватных тампонов для пипеток и стеклянных трубок, а также для стерилизации рабочих столов и ламинар-боксов. Марлю — для оборачивания ватных пробок, фильтрации сред, изготовления косынок, мешочков, повязок. Изготовление ватных пробок вручную — процесс трудоемкий и длительный. Для этих целей лучше использовать аппарат для изготовления ватных пробок, который имеет устройство, регулирующее высоту и диаметр пробок. Это значительно облегчает и ускоряет процесс их изготовления.

Для предохранения сред от высыхания колбы закрывают сверху целлофаном, алюминиевой фольгой или полиэтиленовой пленкой, закрепляя их резиновыми кольцами. Алюминиевую фольгу применяют также для изготовления колпачков на культуральные сосуды.

При стерилизации посуды в автоклаве ее помещают в плотную оберточную бумагу и обвязывают толстыми нитками или шпагатом. Оберточную бумагу используют также для изготовления листов, между которыми помещают стерильные инструменты для охлаждения. Нейлоновая ткань различной плотности, металлические сита с разным размером отверстий необходимы для фильтрования клеточных суспензий. Для предохранения от высыхания высеянные на агаризованные среды клеточные суспензии используют лейкопластырь или липкую ленту. Пробирки с культивируемыми тканями помещают в штативы разных типов и размеров.

Качество и мойка посуды. Посуда для работы с культурой ткани изготавливается из жаростойкого и кислотоустойчивого боросиликатного стекла типа (типа «Пирекс») и характеризуется высокой устойчивостью к повышенным температурам и механическим повреждениям. Вся посуда, предназначенная для приготовления, хранения питательных сред и выращивания растительного материала, подвергается тщательной мойке, особенно в тех случаях, когда ткань будет контактировать со стеклом (при выращивании суспензионных культур и культур корней).

Посуда моется в растворах детергентов (можно использовать и стиральный порошок), далее промывается 8—10 раз проточной водой и помещается на 4—6 часов в хромпик (смесь серной кислоты с бихроматом калия). После этого еще раз промыть посуду теплой водой (10 раз), затем дважды дистиллированной и бидистиллированной водой. Недостаточно отмытая от кислот и щелочей посуда может быть причиной плохого или неравномерного роста биологических объектов.

Обработку пробирок, чашек Петри, небольших культуральных сосудов можно проводить в эмалированных или полиэтиленовых кюветах, ведрах с кислотоустойчивыми ручками, а пипеток — в широких толстостенных стеклянных цилиндрах. Внутренние поверхности колб и бутылей больших размеров, в том числе и резервуаров для хранения дистиллированной и бидистиллированной воды, несколько раз смачивают хромпиком и через 20—30 мин промывают так же, как и остальную посуду. Пипетки необходимо мыть в приборе для мытья пипеток теплой проточной водой в течение часа.

Если после приготовления сред, пересадки и изъятия тканей посуда не может быть вымыта сразу, ее необходимо замочить в теплой воде во избежание засыхания на стенках частиц агара.

После мытья посуду высушивают в сушильном шкафу при 100—130°C, закрывают ватными пробками или целлофановыми колпачками и хранят в контейнерах или шкафах, защищенных от попадания пыли. Если длительное время чистую посуду не используют, то перед употреблением ее следует ополоснуть бидистиллированной водой.

3. Соблюдение стерильности в биотехнологии

Для многих биологических объектов, особенно для клеток растений и животных, основным условием их успешного культивирования является стерильность питательной среды, посуды, материалов, инструментов, посадочного материала, помещения для изоляции и пересадки и т.д.

Стерилизация может быть достигнута следующими методами: *влажным жаром* (автоклавирование, дробная стерилизация — тиндализация, кипячение, пастеризация); *сухим жаром* (нагревание с помощью горячего воздуха в специальных шкафах при температуре 120—180°C, обжигание); с помощью *различных химических веществ*, *фильтрацией*, *центрифугированием*, *облучением ультрафиолетовыми лучами*.

Стерилизации должна подвергаться и операционная комната (бокс), в которой производят посадку и изоляцию культур, одежда и руки работающего персонала, посуда, все необходимые инструменты и материалы, питательные среды, объекты культивирования.

Помещения для работы и их стерилизация. Предпосадочная стерилизация операционной комнаты или бокса является обязательным процессом, в результате которого должны быть устранены источники возможной инфекции тканевых и клеточных культур (бактерии, споры, грибы). Она состоит из двух этапов. В первую очередь помещение очищают от грязи и пыли. Грязь удаляют тщательным отмыванием водой с мылом рабочей поверхности столов, стен, пола, всевозможных углов. Вторым этапом обработки является стерилизация ультрафиолетовым облучением, которое губительно действует на вегетирующие формы микроорганизмов. В качестве источника облучения используют бактерицидные ультрафиолетовые лампы, излучателем в которых служит электрическая дуга, возникающая в парах ртути низкого давления.

Для стерилизации операционной комнаты площадью 9—12 м² и высотой до 3 м можно применить ртутно-кварцевую лампу типа ПРК-7, мощностью 1000 Вт. Лампа должна размещаться так, чтобы равномерно облучать все части помещения. Вследствие вредного действия на организм человека ультрафиолетовых лучей и образующегося озона, стерилизацию облучением проводят накануне работы (вечером) на протяжении 1,5—2 ч. Для стерилизации помещений меньшего размера или боксов в верхней их части и над рабочей поверхностью укрепляют бактерицидные аргонно-ртутные лампы типа БУВ-15 или БУВ-30, которые включают за несколько часов до работы. Эти лампы имеют мощность 15 и 30 Вт.

Пыль в воздухе представляет большую опасность и может приводить к заражению культур. Кроме того, в пыльных помещениях снижается эффективность действия ультрафиолетовых лучей. Для удаления пыли и спор микроорганизмов помещение периодически обрабатывают водяным паром или применяют этиленгликоль. Выпаривание растворов пропилена или этиленгликоля можно проводить в фарфоровой чашке на электрической плите. Из зарубежных препаратов заслуживает внимания «Аэрогерм», производимый в Германии. В его состав входят:

триэтиленгликоль — 20%, спирт — 12%, оксипропионовая кислота — 3% и дистиллированная вода — до 100 г смеси. Доза этого препарата — 0,3—0,5 г на 1 м³ объема помещения.

Для лучшего удержания частиц пыли рекомендуется покрывать поверхность столов вазелиновым маслом. Когда такая процедура нежелательна, ее можно заменить обработкой 70%-ным спиртом с 0,1% HgCl₂. Для предохранения тканевых культур от грибковых инфекций периодически проводят дезинфекцию операционной комнаты смесью паров формальдегида и воды или распылением раствора формальдегида. В тамбуре перед операционной комнатой желательно положить коврик для ног, смоченный дезинфицирующим раствором (хлорамин). Для поддержания стерилизующего эффекта облучения необходима хорошая герметизация операционной комнаты, где необходимо строго соблюдать правила работы.

При тщательном проведении стерилизации посуды, аппаратов, питательных сред, посадочных тканей и бокса источником инфицирования культур может быть только работающий персонал. Заражение, происходящее в этом случае, может возникнуть от использования нестерильных инструментов во время работы, выдыхаемого воздуха, пыли, соприкосновения объекта посадки с нестерильными предметами или руками. Непосредственно перед работой обязательна дезинфекция рук, тщательное мытье их мылом и щеткой под струей теплой воды.

Ламинар-боксы и их стерилизация. Перед началом работы все поверхности ламинара обрабатываются 96% спиртом. Простерилизованные инструменты, материалы, растительный материал помещают на стол ламинара и включают УФ-излучение. Через 20 минут выключают УФ-лампы и включают биофильтры. Для работы в ламинар-боксе надевают стерильный халат и шапочку, руки обрабатывают 96% спиртом. Пинцеты, скальпели и препаровальные иглы помещают в стакан с 96% спиртом. Перед каждой манипуляцией инструменты обжигают над пламенем спиртовки.

Стерилизация посуды и материалов. Вся посуда перед стерилизацией должна быть тщательно вымыта и высушена. Не рекомендуется помещать влажную посуду в горячий шкаф, так как это может быть причиной ее повреждения. Культуральные сосуды (колбы, пробирки, чашки Петри, флаконы и т.п.) перед заполнением их питательными средами предварительно стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу, размещая на решетчатых металлических подставках. Продолжительность стерилизации: при 150° С — 2,5 ч при 160° — 2 ч, при 170° — 1 ч. Следует иметь в виду, что для минимального времени, необходимого для стерилизации, требуется вносить поправку на время, необходимое для нагрева загруженных в шкаф предметов до заданной температуры. Если стерилизации сухим жаром подвергается посуда, завернутая в бумагу или имеющая ватные тампоны, то температура шкафа не должна превышать 160°С, так как при 170°С бумага и вата желтеют и разрушаются.

Поскольку влажный жар более эффективно убивает микроорганизмы и их споры, чем сухой, то стерилизацию посуды (стаканов с крышками или стеклянными пластинками, чашки Петри, пипетки, колбы с дистиллированной водой) и материалов (вата, марля, ватные пробки, бумага, халаты, шапочки), которые будут использоваться при посадке тканей, проводят под давлением, автоклавируя их при 2 атм (133°C) в течение 25—30 мин. Некоторые предметы требуют более длительной стерилизации.

Стерилизацию под давлением удобно проводить в горизонтальном электрическом автоклаве с регулировкой давления типа ГК-ЮО-2. Посуду (стаканы с крышками, чашки Петри) тщательно заворачивают в фольгу или в чистую оберточную бумагу (по одному стакану с крышкой, по одной или по несколько штук чашек Петри). Чашки Петри, кроме того, удобно стерилизовать в стерильных металлических тонкостенных контейнерах. Их перед стерилизацией следует помещать в открытом виде в сушильный шкаф на 2—3 ч для удаления различных летучих материалов.

Аппараты (части аппаратов для культивирования суспензии, фильтры и тому подобное) перед стерилизацией также заворачивают в бумагу и, если необходимо, перевязывают шпагатом. Выходные отверстия стеклянных трубок закрывают ватными тампонами.

При автоклавировании градуированных пипеток верхнюю их часть закрывают ватной прокладкой (приблизительно на 2 см) и каждую из них отдельно заворачивают в папиросную бумагу. Пастеровские пипетки, также заправленные ватными тампонами, удобно стерилизовать в стеклянном пенале, закрытом крышкой (для этого можно использовать толстостенные стеклянные цилиндры на 0,5—1,0 л, закрыв их пробкой из ваты). Для предупреждения поломки кончиков пипеток на дно пенала следует положить вату.

Вату, марлю, пробки, халаты, шапочки, марлевые мешочки автоклавируют в металлических биксах разных размеров, открыв боковые шторки. Листы бумаги, которые используют для закладки инструментов, помещают в чехол из такой же плотной оберточной бумаги. Стерилизуемые объекты не следует плотно загружать в автоклав для лучшего прохождения пара во все прослойки между ними и равномерного нагревания.

Перед стерилизацией необходимо обязательно проверить уровень воды в нагревательной камере автоклава. Если требуется проверить правильность показаний манометра, то в автоклав между стерилизуемыми предметами закладывают запаянные ампулы с веществами, имеющими постоянную точку плавления, к которым добавляют немного анилинового красителя (фуксин, метиленовая синька). К таким веществам относятся: бензонафтол (точка плавления 110°), антипирин (112°), резорцин чистый (118°), сера (119°), бензойная кислота (120°). После окончания автоклавирования сверяют плавление определенного соединения с показаниями манометра.

Стерилизация инструментов. Предварительную стерилизацию инструментов производят нагреванием их сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при 140°C, либо кипячением в воде. При втором способе стерилизации режущие части инструментов заворачивают в марлю или вату, чтобы уберечь их от ударов, и опускают в кипящую воду, куда добавляют буру или 1%-ный бикарбонат натрия. Кипячением удобно стерилизовать шприцы, ножницы, пробочные сверла. Шприцы надо погружать в холодную воду. Не допускается стерилизовать металлические инструменты автоклавированием, так как под действием пара они ржавеют и тупятся.

Простерилизованные указанными способами инструменты переносят в бокс, где они еще дополнительно стерилизуются ультрафиолетовыми лучами при стерилизации комнаты.

В боксе непосредственно перед работой и в процессе посадки инструменты еще раз стерилизуют, помещая в фарфоровый стакан с 96°-ным этиловым спиртом и обжигая каждый из них в пламени спиртовки. Обжигать можно ланцеты, пинцеты, петли. После стерилизации обжиганием каждый инструмент помещают между листами предварительно простерилизованной плотной оберточной бумаги, сложенными в пачку. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным употреблением его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь. Очень тонкие инструменты (иглы, фрагменты лезвий) могут терять свои свойства при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт или в стерильную воду.

Стерилизация растительного материала. Поверхностные покровы всех органов растений обычно загрязнены спорами различных микроорганизмов и грибов, поэтому перед стерилизацией их тщательно отмывают проточной водой, иногда с моющими средствами и очищают от излишних тканей. С корнеплодов и корней снимают кожуру, с побегов — кору, с почек — кроющие чешуйки.

Растительные экспланты стерилизуют растворами веществ, содержащими активный хлор (хлорамином, гипохлоритом Ca и Na, сулемой) или бром (бромной водой), перекисью водорода, спиртом, нитратом серебра, диацидом, антибиотиками.

Этиловый спирт часто применяют для предварительной стерилизации, протирая им поверхность материала или погружая материал на несколько секунд в абсолютный спирт. Иногда такой стерилизации достаточно. Ее используют при работе с плодами, семенами, побегами, завязями.

Гипохлорит кальция (хлорная известь) используется в виде 5—7% раствора для обработки почек, завязей, цветков, семян, побегов в течение 5—8 минут.

Гипохлорит натрия используется в виде 0,5—5% раствора для обработки любых эксплантов в течение 1—20 мин. Это вещество является клеточным ядом, поэтому время стерилизации и концентрацию подбирают экспериментально. Например: для изолированных зародышей

используют 2—3% раствор в течение 10—15 мин, а для сухих семян 3—5% раствор в течение 1 ч. Остатки гипохлорита натрия сначала удаляют 0,01 н HCl, а затем 8 раз промывают автоклавированной дистиллированной водой.

Хлорамин применяют в концентрации 1—6%. Пыльники и молодые зародыши обрабатывают в течение 1—3 мин, сухие семена — 30—60 мин, затем промывают стерильной дистиллированной водой 2—3 раза.

Сулема — токсичное вещество и требует особой тщательности, как при хранении, так и при подборе концентрации для отдельных объектов. Для стерилизации зародышей используют 0,1% раствор в течение 1—3 мин, для корней и клубнеплодов — до 10—20 мин.

Растворы, содержащие активный хлор используются 1 раз и готовят их непосредственно перед работой.

Диацид используется в 0,2% растворе для стерилизации корнеплодов, семян, кусочков, тканей, верхушечных меристем, изолированных зародышей, пыльников. Диацид готовят, растворяя отдельно 330 мг этанолмеркурхлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (330 мл), затем их смешивают и доводят объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента твин-80 и хранят в плотно закрытой колбе в темноте.

Антибиотики применяют для стерилизации растительного материала, инфицированного бактериями (ткани корончатогалловых опухолей). Наиболее часто применяют стрептомицин и тетрамицин 10—80 мг/л, ампициллин 200—400 мг/л, левомецитин, каномидин и другие.

Техника стерилизации. Один из заранее простерилизованных трех-четырех сосудов с крышками заполняют стерилизующим раствором, остальные стерильной водой. Очищенный и промытый в дистиллированной воде растительный материал помещают (если необходимо) на несколько секунд в этиловый спирт, а затем в стерилизующий раствор и отмечают время начала стерилизации. Не рекомендуется использовать для посадки клубне- и корнеплоды, которые плавают на поверхности раствора. Концы отрезков стеблей, черешков, листьев, цветочных и верхушечных почек парафинируют во избежание попадания в проводящие сосуды стерилизующего вещества, которое может вызвать повреждение ткани. Если эта процедура не выполняется, то перед вычленением ткани концы стебля или черешка удаляют скальпелем. Мелкие объекты (семена, плоды, почки) удобно стерилизовать и промывать в марлевых мешочках, затянутых сверху ниткой, которые пинцетом переносят из одного сосуда в другой. По истечении времени стерилизации растительный материал стерильным пинцетом переносят в сосуды со стерильной водой, выдерживая в каждом из них по 10—15 мин. Простерилизованные и промытые объекты, помещенные в стерильные чашки Петри или Коха, готовы для вычленения фрагментов тканей и посадки их на питательные среды.

4. Культивирование клеток растений *in vitro*

Как и в случае клеток животных, состав питательных сред для выращивания биологических объектов растительного происхождения чрезвычайно разнообразен. Их основой является смесь минеральных солей (макро- и микроэлементов). Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора — в виде фосфатов; серы — в виде сульфатов; а также растворимых солей K^+ , Na^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} . Железо используется в виде хелатов $[Fe_2SO_4]$ или $Fe_2SO_4 + ЭДТА$ (этилендиаминтетрауксусная кислота) или ее натриевая соль $Na-ЭДТА$ (трилон Б)] — наиболее доступная форма для усвоения, в частности растительными тканями.

Азот, фосфор, сера входят в состав органических соединений: белков, жиров, нуклеиновых кислот. Железо, цинк, марганец, молибден, кобальт в сочетании с порфиринами образуют макромолекулы пигментов фотосинтеза (хлорофилла), окислительновосстановительных ферментов (каталазы, пероксидазы, полифенолоксидазы). Следовательно, все эти соединения выполняют в клетках и тканях структурную функцию. В то же время ионы K^+ , Na^+ , Ca^{+2} , Cl^- , H^+ необходимы для регуляции pH среды и поддержания физиологических градиентов клеток (тургора, осмотического давления, полярности).

В качестве источника углерода для биологических макромолекул, а также при культивировании гетеротрофных тканей (калусов и суспензий) в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 20—60 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза), моносахариды (гексозы: глюкоза и фруктоза, пентозы: ксилоза и др.). Полисахариды в питательных средах практически не используются. Только некоторые типы тканей (опухолевые), содержащие гидролитические ферменты, выращивают на средах с крахмалом, рафинозой, целлобиозой.

Для стимуляции биохимических реакций в клетке используют биологические катализаторы — витамины группы В (B_1 , B_6 , B_{12}), С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит. Тиамин (B_1) входит в состав пируватдекарбоксилазы, участвует в превращениях углеводов. Тиаминпирофосфат входит в состав ферментов окислительного декарбоксилирования кетокислот (пировиноградной и кетоглутаровой), является коферментом транскетолазы. Пиридоксин (B_6) в виде фосфорнокислого эфира входит в состав ферментов декарбоксилирования и переаминирования аминокислот. Никотиновая кислота (РР) в виде амида входит в состав дегидрогеназ НАД и НАДФ, катализирующих донорно-акцепторную цепь H^+ (отнятие H от молекул органических веществ).

Для управления процессами формообразования в культуре тканей необходимы биологические регуляторы роста и развития — фитогормоны. Эти вещества влияют на дифференциацию и дедифференциацию клеток и тканей; инициируют гистогенез, деление и растяжение клеток: участвуют в процессах старения и созревания; стимулируют, либо ингибируют рост и развитие клеточных культур; обуславливают формирование пола.

Обязательными компонентами питательных сред являются ауксины, вызывающие дифференцировку клеток экспланта, и цитокинины, индуцирующие клеточные деления. При изменении соотношения между этими фитогормонами или при добавлении других фитогормонов могут быть вызваны разные типы морфогенеза.

Природный ауксин в растениях представлен в основном в виде β -индолил-3-уксусной кислоты (гетероауксином) — ИУК. Наиболее выраженный его эффект проявляется в стимуляции роста. Ауксин играет важную роль в процессах регенерации при размножении каллусных клеток; в процессе образования придаточных и боковых корней, луковиц, а также при заложении вегетативных почек.

Для практических целей в сельском хозяйстве часто применяют синтетические аналоги ИУК. Молекулы синтетических ауксинов имеют разную структуру, они содержат ароматическое или гетероциклическое кольцо, боковая часть которого представлена остатком алифатической кислоты. Это — индолил-3-масляная кислота (ИМК); α -нафтил-1-уксусная кислота (НУК); 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д); фенилуксусная кислота (ФУК); фенилмасляная (ФМК).

Кислоту 2,4-Д применяют для индукции каллуса у злаков, бобовых, томатов; для роста суспензионных культур; в сочетании с другими фитогормонами для формирования у протопластов клеточной стенки. ИУК, ИМК, НУК, ФУК и ФМК применяют в качестве индукторов образования корней, а в сочетании с цитокининами эти фитогормоны могут быть использованы для развития проростков при культивировании изолированных зародышей.

В качестве источников цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин 6-бензиламинопурин, зеатин, которые представляют собой N-замещенные производные аденина. Действие цитокининов проявляется прежде всего в ускорении клеточных делений, что опосредуется усилением синтеза ДНК и РНК и белков. Благодаря этому замедляется старение клеток и повышается их устойчивость к неблагоприятным факторам среды. Цитокинины в состав сред включают для стимуляции клеточного деления в каллусных и суспензионных культурах, в культурах протопластов, при регенерации проростков из соматических эмбриоидов или стеблевых почек.

При культивировании протопластов в состав культурных сред добавляют абсцизовую кислоту.

Гиббереллины оказывают множественные действия: стимулируют рост в фазе растяжения и деления клеток (например, камбия), вызывают рост плодов. Важное свойство гиббереллинов — вызывать вытягивание стебля у розеточных растений или у растений с укороченным стеблем, т.е. устранять физиологическую и генетическую карликовость. Гиббереллины относят к условно половым гормонам; например, у тыквенных они способствуют образованию мужских цветков. Для гиббереллинов доказано их непосредственное действие на биосинтез ферментов, например, α -амилазы и других гидролаз в прорастающих

семенах злаков; эти ферменты расщепляют крахмал до простых сахаров, которые усваиваются развивающимся зародышем.

Для практических целей наиболее часто используют гибберелловую кислоту, которая производится промышленностью. Обработка семян и клубней приводит к снятию покоя и стимулирует быстрое их прорастание.

Действие гибберелловой кислоты на озимые злаки заменяет яровизацию, необходимую для таких растений. В составе культуральных сред используют гибберелловую кислоту для поддержания роста суспензионных культур, а также для индукции побегообразования.

В качестве биологических добавок для индукции первичного каллуса можно использовать растительные экстракты (10—15% от общего объема среды): кокосовое молоко (жидкий эндосперм кокосового ореха), вытяжки из незрелых зерновок кукурузы (лучше в период молочной спелости), которые содержат цитокинины — кинетин и зеатин (6-ти замещенные аминопурины) и NN-дифенилмочевину.

При культивировании объектов применяют жидкие и агаризованные (твердые) среды.

Жидкие среды используются для культивирования суспензий, каллусов, изолированных органов и тканей, растений-регенерантов. При этом для поддержания эксплантов в пробирки со средой помещают специальные мостики-поддержки из фильтровальной бумаги или синтетических пористых материалов.

Агаризованные среды готовят на основе агар-агара — полисахарида, входящего в состав морских водорослей, который образует с водой гель при pH 5,6—6,0. Иногда в качестве уплотнителя и заменителя агар-агара используют полиакриламидные гели (биогели) P10 и P200.

Для искусственных питательных сред растворы макро- и микросолей готовят заранее. Это так называемые маточные (концентрированные) растворы. Их хранят в специальных условиях: макро- и микросоли в холодильнике в сосудах с притертыми пробками при 0 — +4°C; витамины, фитогормоны, ферменты, растительные экстракты — при -20°C в небольших по 5—10 мл в сосудах с пробками (пенициллиновые флаконы).

Маточные растворы микросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 10—40 раз, микросолей — в 100—1000 раз, витаминов — в 1000 раз.

Растворы фитогормонов желательно готовить непосредственно перед работой со средами. Для приготовления маточного раствора макро- и микросолей каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, затем сливают и доводят до нужного объема. В охлажденную смесь микросолей последним добавляют раствор солей молибдена, а в макро-соли — раствор солей магния (для предотвращения выпадения осадка).

Маточные растворы хлористого кальция и хелата железа (сернокислое железо + ЭДТА либо Na ЭДТА — трилон Б) готовят и хранят отдельно от других солей.

Концентрированные растворы витаминов готовят следующим образом: 10-кратные навески растворяют в 10 мл дистиллированной воды каждый витамин отдельно.

Фитогормоны — это вещества, которые плохо растворяются в воде. Поэтому предварительно 100 мг вещества растворяют в небольших количествах (0,5—2,0 мл) спирта (ауксины, гиббереллины), 0,5—1 н HCl или KOH (цитокинины), затем подогревают до полного растворения (кроме абсцизовой кислоты и кинетина) и доводят до 100 мл объема (1 мл содержит 1 мг вещества).

К настоящему времени разработано множество питательных сред, состав некоторых из них приведен ниже.

**Питательная среда Чапека для культивирования
фитопатогенных грибов**

Компоненты питательной среды, г/л	
NaNO ₃	2,0
KH ₂ PO ₄	1,0
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,5
KCl	0,5
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,01
Сахароза	30
Агар-агар	17

**Состав питательных сред для культивирования
изолированных тканей и клеток растений**

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л		
	Среда Мурасиге-Скуга (МС)	Среда Гамборга (В5)	Среда Уайта
Na ₂ SO ₄	—	—	200
Ca(NO ₃) ₂	—	—	200
NH ₄ NO	1650	2500	—
KNO ₃	1900		80
KCl	—	—	65
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	150	—
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	250	360
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	130	—
KH ₂ PO ₄	170	—	16,5
Na ₂ ЭДТА	373	37,3	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,95	27,95	27,95
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	—	150	—

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л		
	Среда Мурасиге-Скуга (МС)	Среда Гамборга (В5)	Среда Уайта
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	1,5
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22,3	10,0	4,5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6	2,0	1,5
KI	0,83	0,75	0,75
Fe ₂ (SO ₄) ₃	—	—	2,5
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25	0,25	0,0025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025	0,025	0,02
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025	0,025	—
Глицин	2,0	—	3,0
Мезоинозит	100	100	10
Никотиновая кислота	0,5	1,0	0,5
Пиридоксин — HCl	0,5	1,0	0,1
Тиамин — HCl	1,0	10,0	0,1
Сахароза	30 000	30 000	20 000

5. Факторы, влияющие на продуктивность культур *in vitro*

На рост и развитие биологических систем большое влияние оказывают физические факторы — свет, температура, аэрация, влажность. Рассмотрим эти вопросы на примере клеточных культур высших растений.

Свет. Большинство каллусных тканей не нуждается в свете, так как не имеет хлоропластов и питается гетеротрофно. Исключение составляют некоторые зеленые каллусные ткани, например каллусная ткань мандрагоры. В некоторых случаях каллусные ткани, неспособные к автотрофному питанию, все же выращивают на непрерывном освещении, что является необходимым условием дальнейшего успешного морфогенеза, например у люцерны. Детерминированные к морфогенезу ткани переносят на свет и далее культивируют при освещенности 1000—4000 лк. Культивирование изолированных меристем и их микроразмножение также происходит на свету.

Освещенность климатической камеры или световой комнаты должна составлять в зависимости от культуры 3000—10 000 лк. Необходимо учитывать также фотопериод, который необходим для данного культивируемого объекта.

В качестве источника света используют люминесцентные лампы. Для большинства растений оптимум освещенности составляет примерно 1000 люкс.

Температура оказывает значительное влияние на рост культур в условиях *in vitro*. Для большинства культивируемых тканей температурный оптимум составляет 22—25°C. Для культур тканей тропических растений он может достигать 29—30°C. В случае индукции морфогенеза температуру понижают до 18—20°C.

Аэрация. Условия аэрации имеют важное значение для успешного выращивания клеток тканей и органов. Особенно важно снабжение воздухом культивируемых клеток в больших объемах ферментеров. При выращивании клеток в малых объемах (в колбах) нормальная аэрация достигается при постоянном перемешивании суспензии.

Осмотическое давление в клетке имеет большое значение в нативных условиях. При этом на соответствующих этапах роста и развития отдельные клетки, ткани характеризуются определенным градиентом осмотического давления. Это условие и требование сохраняется и при культивировании тканей и органов. Однако при этом надо учитывать, за счет каких веществ поддерживается осмотическое давление, так как оно в основном поддерживается за счет элементов питания и других соединений.

Влажность. Оптимальная влажность в помещении, где растут культуры, должны составлять 60—70%. Более сухой воздух способствует усыханию питательной среды в пробирках и колбах, если они закрыты ватными пробками, изменению концентрации, входящих в ее состав компонентов и нарушению условий культивирования. Для повышения влажности в комнате можно использовать поддоны с водой.

Газовая фаза в нативных условиях роста клетки ткани значительно отличается от газовой фазы в условиях *in vitro*. Известно, что от его состава (т.е. от соотношения — кислород, азот, углекислота) зависит как интенсивность клеточного деления (скорость роста), так и процессы дифференциации и формообразования в культурах *in vitro*. Однако оптимальные условия газового режима в культуре клеток и тканей еще требуют изучения и, к сожалению, не всегда известны.

Наилучшие световой и температурный режимы, а также режим оптимальной влажности можно создать с помощью климатических камер, где все эти параметры искусственно задаются.

ОСНОВНЫЕ ПРАВИЛА ТЕХНИКИ БЕЗОПАСНОСТИ

Техника безопасности при проведении биотехнологических работах

Для проведения работ необходимо соблюдать общие правила техники безопасности, выполнение которых обязательно для каждого работающего в лаборатории независимо от характера эксперимента.

1. Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, тишину и порядок. Посторонним лицам запрещено посещать сотрудников во время эксперимента.

2. К выполнению каждой работы могут приступать только сотрудники и студенты, ознакомившиеся с техникой безопасности данной работы, о чем фиксируется в специальном журнале.

3. Рабочее место следует держать в чистоте. Нельзя загромождать его посудой, бумагой и ненужным материалом.

4. При нагревании жидкостей и твердых тел в пробирках, либо в колбах нельзя направлять отверстие сосуда на себя или на соседей.

5. **Категорически запрещено** пробовать какие-либо вещества на вкус.

6. Запрещается при взвешивании насыпать химические вещества непосредственно на чашку весов.

7. Всю посуду после работы с минеральными кислотами, щелочами и ядовитыми веществами сразу же тщательно моют.

8. При обращении со стеклянной химической посудой и приборами необходимо соблюдать меры предосторожности. Стеклянную посуду следует держать осторожно, не сжимая ее сильно пальцами. При мойке посуды ершами или стеклянной палочкой надо быть очень осторожным, так как ими легко пробить дно или стенки стеклянной посуды, что может привести к порезам.

9. Сотрудники лаборатории и студенты проводят исследования в белом халате, для избежания порчи одежды химическими реактивами и для соблюдения стерильности во время работы в ламинар-боксе.

10. Выливать в раковины остатки стерилизующих веществ (особенно сулему и диацид), отработанные питательные среды **строго запрещено**.

11. Работать в ламинар-боксе при включенной ультрафиолетовой лампе **строго запрещено**.

12. При работе с транс иллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или маской.

13. Спиртовую горелку содержать в чистоте, заправлять спиртом вдали от открытых источников огня, не допускать сильного нагревания резервуара, не оставлять зажженную спиртовку без надзора.

14. Нагревание растворов и питательных сред необходимо проводить в стеклянной посуде на асбестовой сетке; нагревание на открытом огне допускается только при использовании специальной посуды, например, колбы Кельдаля.

15. Запас спирта и других летучих жидкостей в лаборатории должен быть небольшим, необходимым для текущей повседневной работы. Хранить его необходимо в изолированном отделении шкафа, удаленном от источников огня и снабженном плотно закрывающейся дверцей, покрытой войлоком или асбестом и обитой поверху кровельным железом.

16. Основной запас эфира хранят в холодной комнате и лишь необходимое для работы количество — в лаборатории в местах, которые удалены от источника огня.

17. При попадании кислоты (хромпика) на кожу немедленно ее смыть водой и обработать участки тела мыльным раствором. Быстро в течение 30 сек или 1 мин подойти к раковине и промыть одежду водой.

18. Если щелочь попала на руки или другие открытые части тела немедленно смыть ее с кожи водой, остатки необходимо нейтрализовать небольшим количеством буфера для нейтрализации.

19. Лаборатория должна быть оснащена медицинской аптечкой для оказания первой помощи пострадавшему.

20. Работать с автоклавом и дистиллятором следует только по инструкции.

21. При возникновении пожара нужно немедленно выключить газ, отключить электроприборы, засыпать песком или накрыть одеялом очаг пожара. Большое пламя тушат с помощью огнетушителя.

22. Если на ком-либо загорится одежда, пострадавшего следует облить водой или немедленно повалить на пол и накрыть одеялом. Одеяло не снимают, пока не погаснет пламя.

23. О сильном пожаре необходимо **немедленно** сообщить дежурному пожарной охраны.

24. По окончании работы — проверить выключены ли электричество, вода в лаборатории, а свое рабочее место привести в порядок.

Лабораторная работа № 1.

Получение каллусной ткани из листьев табака

Каллус — это группа клеток, возникающая при травмах и защищающая место поранения (раневая паренхима). В ней накапливаются питательные вещества для регенерации анатомических структур или утраченного органа. На питательных средах с большим содержанием ауксинов (2,4-Д) клетки экспланта дедифференцируются. Клетки утрачивают прежние функции и морфологию. Особенности дедифференциации клеток экспланта зависят от генетики экспланта. Причем, чем менее дифференцирована клетка, тем легче получить каллус. Дедифференциация специализированных клеток начинается с обогащения их элементами цитоплазмы: микротрубочками, мембранами ЭПС и комплекса Гольджи, рибосомами, исчезают хлоро- и хромопласты, продукты их деятельности; может образоваться много ядер или увеличиться число хромосом; укрупняются вакуоли. Каллус, выращиваемый поверхностным способом, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющую строго определенную структуру. Клетки каллуса либо бесцветны, либо имеют желтоватый опенок. В зависимости от происхождения и условий культивирования различают каллусы: рыхлые, с сильно оводненными, легко отделяющимися друг от друга клетками; средней плотности, с зонами меристематической активности; плотные, с зонами редуцированного камбия и сосудов.

В биотехнологии чаще всего используют те виды растений, которые и в обычных условиях легко укореняются, регенерируют, образуют каллус. Клетки табака легко дедифференцируются и переходят к делению, образуя быстрорастущую каллусную ткань. Поэтому большинство методов получения и культивирования каллуса разработано для табака. Каллусы можно получить практически из любой части растения. Для культивирования каллусов из листьев табака используют среду Мурасиге — Скуга (МС) с добавлением ауксинов (2,4-Д).

Цель работы: освоить метод приготовления питательной среды для получения каллусной культуры табака.

Оборудование и материалы: 6% раствор хлорамина, колбы со стерильной дистиллированной водой, чашки Петри со стерильной питательной средой МС для индукций каллусогенеза.

Объект исследования: растения табака.

Таблица 1

Приготовление маточных растворов для среды Мурасиге — Скуга (МС)

№ п.п.	Компонент среды	Количество вещества
Маточный раствор макросолей (г на 1 л маточного раствора)		
1	KNO ₃	38
2	NH ₄ NO ₃	33
3	KH ₂ PO ₄	3,4
4	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7,4.
	или MgSO ₄ безводный	3,6
5	CaCl ₂ · 2H ₂ O	8,8
	или CaCl ₂ безводный	6,65
Маточный раствор микросолей (мг на 100 мл маточного раствора)		
6	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	25
7	CuSO ₄ · 5H ₂ O	2,5
8	H ₃ BO ₃	620
9	MnSO ₄ · 5H ₂ O	2410
	или MnSO ₄ · 4H ₂ O	2230
10	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	860
11	KJ	83
12	CoCl ₂ · 6H ₂ O	2,5
13	FeSO ₄	557
	Na ₂ ЭДТА	745

Таблица 2

Среда Мурасиге — Скуга (МС) для клеточных и тканевых культур

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хеллат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-HCl	0,1 мг/л
Пиридоксин-HCl	0,5 мг/л
Никотиновая кислота	0,5 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
Глицин	2 мг/л
Сахароза	30 г/л
pH 5,6—5,8	

Ход работы: приготовить среды МС с добавлением 1.0 мг/л 2,4 — Д + + 0,2 мг/л БАП и 1.0 мг/л ИУК + 0,2 мг/л БАП. Листья табака поместить в дезинфицирующий раствор на 5 мин, затем промыть стерильной дистиллированной водой 3 раза. Стерильным скальпелем вырезать сегменты у основания листа ближе к центральной жилке длиной 1,5—2 см, шириной 1 см. Для лучшего каллусообразования делают насечки по всей поверхности сегмента. Поместить экспланты на питательные среды (перед каждой манипуляцией инструменты обрабатывать спиртом и обжигать на пламени спиртовки). Чашки Петри с эксплантами перенести в термостат для индукций каллусогенеза при температуре 25°C.

Задание: результаты опыта рассмотреть через 2—4 недели, зарисовать, сравнить каллус, полученный на среде с ИУК и с 2,4-Д. Сделать выводы.

Лабораторная работа № 2.

Получение каллусов из незрелых зародышей и узлов кущения пшеницы

Каллусы из различных органов пшеницы на искусственных питательных средах впервые были получены в 1968 году. Их можно использовать для изучения солеустойчивости, устойчивости к температурному стрессу, получения суспензий и протопластов. Для индукции каллусогенеза обычно используют стерильные пробирочные растения, выращенные из зародышей на средах без гормонов. Растения для получения каллусов можно вырастить в теплице. Для этого набухшие семена помещают на 5 недель в холодную камеру на яровизацию при 2°С, проростки высаживают в вегетационные сосуды и выращивают до достижения молочной спелости. Незрелые зародыши выделяют и переносят на питательные среды.

Цель работы: получить каллусы из незрелых зародышей и узлов кущения пшеницы.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс, пробирки с питательной средой МС, препаровальные иглы, пинцеты, скальпели, стерильная бумага, 6% раствор хлорамина, стерильная дистиллированная вода, спиртовки, флаконы с 96% спиртом.

Объект исследования: растения пшеницы в стадии молочной спелости, пробирочные растения пшеницы.

Ход работы: для получения каллусной ткани незрелые зародыши пшеницы изолировать на 12-е сутки от начала цветения. Поместить их в дезинфицирующий раствор на 5 минут. Промыть 3 раза стерильной дистиллированной водой, а затем поместить в стерильные чашки Петри. Препаровальной иглой вычленить зародыши и перенести в пробирки с питательными средами. Пробирки с зародышами закрыть пробками и поставить в штатив. Культивируют в светлой культуральной комнате при 25°С.

Пробирочные растения пшеницы выложить на стерильные бумажные матрасики и разрезать на небольшие части по 5—10 мм, выделить междоузлия с участками листового влагалища. Перенести экспланты в пробирки на питательные среды МС + 2,4-Д в концентрации 4 мг/л. Культивируют в светлой культуральной комнате при 25°С.

Задание: рассмотреть каллусные клетки под микроскопом и зарисовать через 2—4 недели, сделать выводы о морфологии каллусов.

Лабораторная работа № 3.

Получение каллусов из корешков фасоли

Каллусы можно получать из разных частей растения, в том числе из кончиков корней. Образование каллуса происходит в области первичных и вторичных меристем. Процесс каллусообразования зависит от размера экспланта. Оптимальная величина экспланта 5—10 мм³ и масса 20—100 мг. Многие ткани имеют физиологическую полярность. Поэтому каллус лучше образуется на той стороне экспланта, которая ближе к апикальным меристемам корня. Кончики корней легко образуют каллус, если они помещены на среду горизонтально, тогда как сегменты стебля лучше формируют каллус, если их поместить вертикально. Для культивирования на питательных средах лучше использовать стерильные корешки, полученные при проращивании семян в стерильных условиях.

Цель работы: получить каллус из корешков фасоли.

Оборудование и материалы: 6% раствор хлорамина, пинцеты, скальпели, препаровальные иглы, чашки Петри с питательными средами для индукции каллусогенеза, стерильные чашки Петри, флаконы со спиртом и стерильной дистиллированной водой.

Объект исследования: семена фасоли.

Ход работы: семена фасоли поместить в чашки Петри (по 15 штук в чашку), залить раствором хлорамина до полного погружения семян в жидкость и оставить на 20 мин. Промыть семена стерильной дистиллированной водой 3 раза. Стерильные семена залить стерильной водой и оставить для набухания на 24 ч.

Семена с разрушенной кожурой удалить, а жизнеспособные семена простерилизовать повторно 6% хлорамином 20 мин. Промыть семена стерильной дистиллированной водой 3 раза. Семена перенести в стерильные чашки Петри (по 5 штук в чашку). Стерильным пинцетом придерживать семя, а стерильным скальпелем надрезать оболочку. Стерильным скальпелем и препаровальной иглой изолировать корешки (2—3 мм) и перенести в чашки Петри со стерильной дистиллированной водой (по 15 штук в чашку).

Корешки стерильной препаровальной иглой поместить на поверхность агаризованной среды и слегка вдавить в агар для обеспечения хорошего контакта со средой (среда МС + 20 г/л сахара + 100 мг/л мезоинозит + 2 мг/л 2,4Д + 0,2 мг/л кинетина). Культивируют в светлой культуральной комнате при 25°C или в термостате.

Задание: через 3 недели рассматривают и зарисовывают сформировавшийся каллус.

Лабораторная работа № 4.

Субкультивирование каллусов

В цикле выращивания каллусные клетки после ряда делений проходят обычный онтогенез: растут растяжением, дифференцируются и деградируют. Рост каллуса можно отразить S-образной кривой роста. Ростовой цикл начинается с посадки экспланта на среду (начало культивирования), а завершается в момент прекращения митозов (стационарная фаза). В лаг-фазе (латентной фазе) клетки не делятся, не увеличиваются в размере, имеют низкую метаболическую активность. В экспоненциальной фазе (фазе логарифмического роста) клетки активно делятся митозом. В ранней экспоненте увеличивается количество митохондрий (синтезируется АТФ), рибосом, всех видов РНК, синтезируются белки, активизируется метаболизм, интенсивно поглощается кислород. Поздняя экспонента, характеризуется снижением удельной скорости роста, замедлением клеточного деления, увеличением среднего размера клеток за счет растяжения. В стационарной фазе (фаза плато) размер клеток продолжает увеличиваться, а их деление прекращается. В поздней стационарной фазе (фаза деградации) за счет истощения среды клетки стареют и отмирают. Продолжительность ростового цикла каллусных клеток 21—28 дней. В процессе культивирования каллус пассируют (пересаживают на свежую питательную среду) каждые 4—6 недель в зависимости от интенсивности роста. Масса транспланта (фрагмента ткани, который пассируют на свежую питательную среду) составляет 60—100 мг на 20—40 мл среды.

Цель работы: исследовать характер роста каллуса картофеля.

Оборудование и материалы: пробирки с питательной средой для культивирования каллусов, пинцеты, препаровальные иглы, флакон с 96% спиртом, ламинар-бокс, спиртовка.

Объект исследования: каллусная культура клеток картофеля.

Ход работы: в асептических условиях извлечь каллусы из пробирок и поместить на стерильную поверхность. Стерильной препаровальной иглой выделить зоны меристематической активности (белые мелкие клетки). Транспланты величиной 2—3 мм поместить на поверхность питательной среды (среда МС + 30 г/л сахара + 1 мг/л НУК + + 0.8 мг/л БАП). Культивируют в светлой культуральной комнате при 25°C или в термостате.

Обычно цикл выращивания составляет 4 недели. За это время для построения кривой роста каллус взвешивают 4 раза, через каждые 7 дней.

Задание: по результатам взвешиваний через 1, 2, 3 и 4 недели построить кривую роста каллуса. Кроме снятия ростовых показателей отмечать цвет и консистенцию каллусной ткани. Результаты культивирования зарисовать через 2—4 недели. Рассчитать интенсивность роста каллусной ткани в % по формуле

$$\text{ИР} = (m_2 - m_1) : m \cdot 100\%,$$

где ИР — интенсивность роста; m_1 — масса каллусной ткани в начале пассажа; m_2 — масса каллусной ткани в конце пассажа.

Лабораторная работа № 5.

Получение и культивирование суспензии

Суспензионные культуры — это одиночные клетки, мелкие, средние и крупные агрегаты (группы клеток), выращиваемые в жидкой питательной среде при постоянной аэрации (доступ кислорода) в асептических условиях. Суспензии получают из каллусов. Для инициации суспензионной культуры необходимо 2—3 г свежей рыхлой массы каллусных клеток на 60—100 мл жидкой питательной среды. Первичную суспензию культивируют в колбах с жидкой питательной средой на круговых качалках со скоростью 100—120 об./мин. Кривая роста суспензии имеет S-образную форму и включает: лаг-фазу, экспоненциальную фазу, стационарную фазу и фазу деградации. Форма ростовых кривых отличается продолжительностью фаз. Это зависит от генетики популяции, количества инокулюма и состава питательной среды. Скорость нарастания биомассы колеблется от 15 до 70 суток. Суспензии используют для получения различных химических веществ: органических кислот, ферментов, алкалоидов, красителей, белков, аминокислот. Их применяют в фармакологии, парфюмерии, пищевой и химической промышленности, сельском хозяйстве. Суспензионные культуры имеют большое значение для генетики и особенно молекулярной биологии: из суспензионных клеток получают протопласты, необходимые для соматической гибридизации, генетической инженерии, а также для изучения метаболизма клеток.

Цель работы: получить суспензионную культуру картофеля и изучить влияние различных гормонов на ее рост.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс, колбы с питательной средой для инициаций суспензии (среда МС + 3 мг/л 2,4-Д), круговые качалки, магнитные мешалки, стерильные инструменты, флакон с 96% спиртом.

Объект исследования: пробирки с рыхлыми каллусами картофеля.

Ход работы: Приготовить среды следующего состава: 1. МС + 3 мг/л 2,4-Д; 2. МС + 1 мг/л ИУК; 3. МС + 3 мг/л 2,4-Д + 0,2 мг/л БАП; 4. МС без гормонов.

В асептических условиях извлечь каллус из пробирки и поместить в колбу с питательной средой, из расчета 2—3 г на 100 мл среды. Колбы с суспензией поместить на круговые качалки при 100—120 об./мин и оставить на 3—4 недели (для первого пассажа).

Пассирование суспензионной культуры осуществляют следующим образом каждые 2 недели. Суспензии дают отстояться 1—2 мин и пере-

ливают 5—10 мл суспензии в колбу со свежей средой. Обычно используют разведение 1:10, т.е. в колбу на 500 мл помещают 5 мл исходной суспензии и 45 мл свежей среды. Пересадив суспензию, ставят колбы на качалку до следующей пересадки.

Задание: результаты культивирования суспензии зарисовать и сделать выводы о влиянии различных по составу сред на образование суспензионной культуры.

Лабораторная работа № 6.

Определение плотности суспензионной культуры и оценка ее ростовой активности

По плотности суспензии можно не только охарактеризовать состояние клеточной популяции, но и определить время субкультивирования (отбора инокулянта и пересадки на свежую питательную среду). В большинстве случаев суспензию для субкультивирования отбирают в конце экспоненциальной фазы (через 14—16 дней после начала культивирования). При построении кривой роста показатели снимают через день. Плотность суспензии за 2—3 недели культивирования возрастает в среднем в 20 раз. Клетки суспензий удобнее всего подсчитывать в специальных счетных камерах Фукса-Розенталя или Горяева. Объем выборки должен составлять не менее 1000 клеток. Подсчет клеток затрудняется, если в суспензии преобладает фракция агрегатов. В таких случаях к 1 объему культуры добавляют 2 объема 8% оксида хрома и нагревают до 70°C в течение 2—15 мин. После охлаждения культуру встряхивают, чтобы распались агрегаты. Для разрушения агрегатов в суспензию добавляют пектиназу — 0,25% объема.

Плотность суспензии можно определить и по соотношению объема биомассы к общему объему суспензии. Измеряют средний объем клетки и получают число клеток в 1 мл суспензии.

Цель работы: научиться определению плотности суспензионной культуры для изучения характера ее роста.

Оборудование и материалы: микроскоп, центрифуга, стерильная пипетка, предметное стекло, покровное стекло, камера для подсчета Фукса-Розенталя или Горяева, фильтровальная бумага.

Объект исследования: суспензионная культура.

Ход работы: колбу с суспензией встряхнуть и отобрать пипеткой несколько мл. 1 мл суспензии смешать с 2 мл 8% оксида хрома и поставить на 15 мин в термостат при температуре 70°C. Смесь пропустить 3 раза через шприц с толстой иглой (пипетировать). Камеру Фукса-Розенталя или Горяева заполнить суспензией.

Для этого притереть покровное стекло до появления колец Ньютона. Подсчитать количество клеток под микроскопом. Подсчет клеток осуществляется в 5 больших квадратах (в четырех по диагонали и в одном в любом верхнем или нижнем углу сетки). Плотность суспензии, т.е. число клеток в мл рассчитать по формуле:

$$X = M \cdot N \cdot 1000 : 3,2$$

где X — число клеток в мл, M — среднее число клеток в камере, N — разведение, $3,2$ — постоянная величина.

Задание: показатели снимать через день в процессе всего культивирования. По ним построить кривую роста суспензии, используя суспензионную культуру из предыдущей работы.

Лабораторная работа № 7.

Определение степени агрегированности и жизнеспособности суспензии

В зависимости от целей исследования условия культивирования и состав питательной среды подбирают так, чтобы в суспензии преобладала определенная фракция клеток. Обычно в суспензии различают 4 основные фракции: одиночные клетки, мелкие агрегаты, средние агрегаты, крупные агрегаты. Агрегаты не должны содержать более 10—12 клеток. Степень агрегированности определяют, подсчитывая клетки в нескольких полях зрения на временных препаратах под малым увеличением микроскопа (не менее 1000 клеток).

При работе с суспензиями необходимо учитывать и ее жизнеспособность. О жизнеспособности клеток можно судить по движению цитоплазмы, по степени проницаемости клеточной стенки для красителей, по активности ферментов. Прижизненные красители, такие как метиленовый синий, не убивают клетки и не проникают через мембраны живых клеток в цитоплазму. Суспензия считается жизнеспособной, если более 70% клеток не окрашиваются в синий цвет; агрегат жизнеспособен, если более 50% его клеток не окрасились.

Цель работы: определить степень агрегированности и жизнеспособность суспензионной культуры.

Оборудование и материалы: микроскоп, 0,1% раствор метиленового синего, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, дистиллированная вода, марлевые салфетки, пипетки.

Ход работы: приготовить препарат суспензии: встряхнуть суспензию в колбе, пипеткой отобрать небольшое количество суспензии, поместить каплю суспензии на предметное стекло, добавить каплю красителя, накрыть покровным стеклом, излишки жидкости убрать фильтровальной бумагой. Поместить препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива и подсчитать клетки и агрегаты в 3-х полях зрения (просмотреть не менее трех препаратов).

Задание: результаты записать в виде таблицы. Один препарат зарисовать, описать морфологию клеток суспензии (форму, величину, окраску). Сделать вывод о степени агрегированности суспензий (какие фракции преобладают, %) и жизнеспособности суспензии (неокрашенных клеток, %).

Лабораторная работа № 8.

Высев суспензионной культуры на твердую агаризованную среду

Культивирование отдельных (одиночных) клеток позволяет получать микроколонии и исследовать генетическую и физиологическую стабильность или изменчивость этого материала. Одиночные клетки используются в клеточной селекции мутантных, гибридных и трансформированных линий. В эти клетки можно ввести новые гены, в то же время — это хорошая модель для изучения ее онтогенеза и физиологии. Источником отдельных (одиночных) клеток являются клеточные суспензии, растущие на жидкой питательной среде. Для получения микроколоний каллусной ткани используется метод плейтинга — смешивание суспензии клеток с агаризованной питательной средой в равных пропорциях.

Цель работы: получить микроколонии каллусной ткани из суспензии клеток.

Оборудование и материалы: стерильные чашки Петри, стерильный цилиндр, чашки Петри с агаризованной средой, инструменты: пинцеты, препарировальные иглы, спиртовка, 96% спирт.

Объект исследования: суспензионная культура.

Ход работы: клеточную суспензию перелить в стерильный цилиндр и оставить на 5 мин. Пипеткой отобрать 5 мл верхней фракции суспензии (в верхнем слое суспензии преобладает фракция одиночных клеток) и смешать с 5 мл агаризированной (1,4% агара) среды для культивирования каллуса. Работу проводить в стерильной посуде: мерном цилиндре, стакане. Полученную смесь разлить в стерильные чашки Петри слоем до 1 см. Чашки Петри закрыть крышками и герметизировать парафилмом. Рассчитать количество высеянных клеток. Количество колоний подсчитать через 3—6 недель.

Задание: результаты зарисовать, подсчитать количество выросших колоний в каждой чашке Петри.

Определить эффективность посева, для этого:

$$\text{ЭВ} = \frac{\text{Количество образовавшихся колоний}}{\text{Количество высеянных клеток} \cdot 100\%},$$

где ЭВ — эффективность посева.

Лабораторная работа № 9.

Индукция органогенеза в каллусной ткани картофеля

Фитогормоны — это биологические регуляторы роста и развития растений, осуществляющие взаимодействие клеток, тканей и органов, стимулирующие и ингибирующие морфогенетические и физиологические процессы в растительных организмах. Фитогормоны влияют на деление и рост клеток растяжением, состояние покоя, созревание, старение, формирование пола, устойчивость к стрессу, тропизмы, транспирацию; обеспечивают функциональную целостность растительного организма, закономерную последовательность фаз индивидуального развития.

Ауксины в культуре тканей вызывают рост клеток растяжением и их деление, а в сочетании с цитокининами — органогенез. В биотехнологии применяют как природные ауксины (ИУК), так и синтетические — ИМК (индолил-3-масляная кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), НУК (нафтилуксусная кислота).

Цитокинины в сочетании с ауксинами индуцируют митозы, пролиферацию клеток, почек и побегов. К природным цитокининам относятся: зеатин, кинетин (6-фурфуриламинопурин); к синтетическим — БАП (6-бензиламинопурин). Следовательно, изменяя соотношение гормонов в питательных средах, можно в какой-то степени изменять и генетические программы клеток и тканей. Эти процессы известны как дифференциация клеток и тканей, дедифференциация и редифференциация.

В 1955 г. Скуг и Миллер предложили гипотезу гормональной регуляции в культуре клеток и тканей, которая сейчас известна, как правило Скуга-Миллера: если концентрация ауксинов и цитокининов в питательной среде относительно равны или концентрация ауксинов незначительно превосходит концентрацию цитокининов, то образуется каллус; если концентрация ауксинов значительно превосходит концентрацию цитокининов, то формируются корни; если концентрация ауксинов значительно меньше концентрации цитокининов, то образуются почки, побеги.

Таким образом, для индукции органогенеза каллусы пересаживают на среду с высоким содержанием цитокининов, а для укоренения образовавшихся побегов используют среду с повышенным содержанием ауксинов.

Индукция морфогенеза и регенерация растений — сложный многостадийный процесс. У каллусной культуры картофеля можно выделить несколько стадий:

- индукцию зеленых меристематических зон;
- появление почек *de novo*;
- формирование микропобегов с последующим их укоренением.

Цель работы: провести индукцию органогенеза в каллусной ткани картофеля.

Оборудование и материалы: колбы на 50 мл со стерильном питательной средой (МС без гормонов), колбы со средами для органогенеза и ризогенеза, флаконы с 96% спиртом, стерильные пинцеты, препаровальные иглы, спиртовка, ламинар-бокс.

Объект исследования: пробирки с каллусами табака.

Ход работы: стерильным пинцетом переложить каллусы на стерильную поверхность, разделить на кусочки 5х5 мм и поместить в колбы с питательными средами: МС без гормонов и МС + 2 мг/л 6-БАП + + 1 мг/л НУК. Колбы перенести в культуральную комнату с температурой 25°C, влажностью воздуха 70% и интенсивностью освещения 3 кЛк.

Через 1 неделю отметить появление структурированных очагов, через 3—5 недель — меристематических зон ярко-зеленого цвета. Еще через 1—2 недели отметить появление апексов.

При дальнейшем культивировании апексы превращаются в микропобеги.

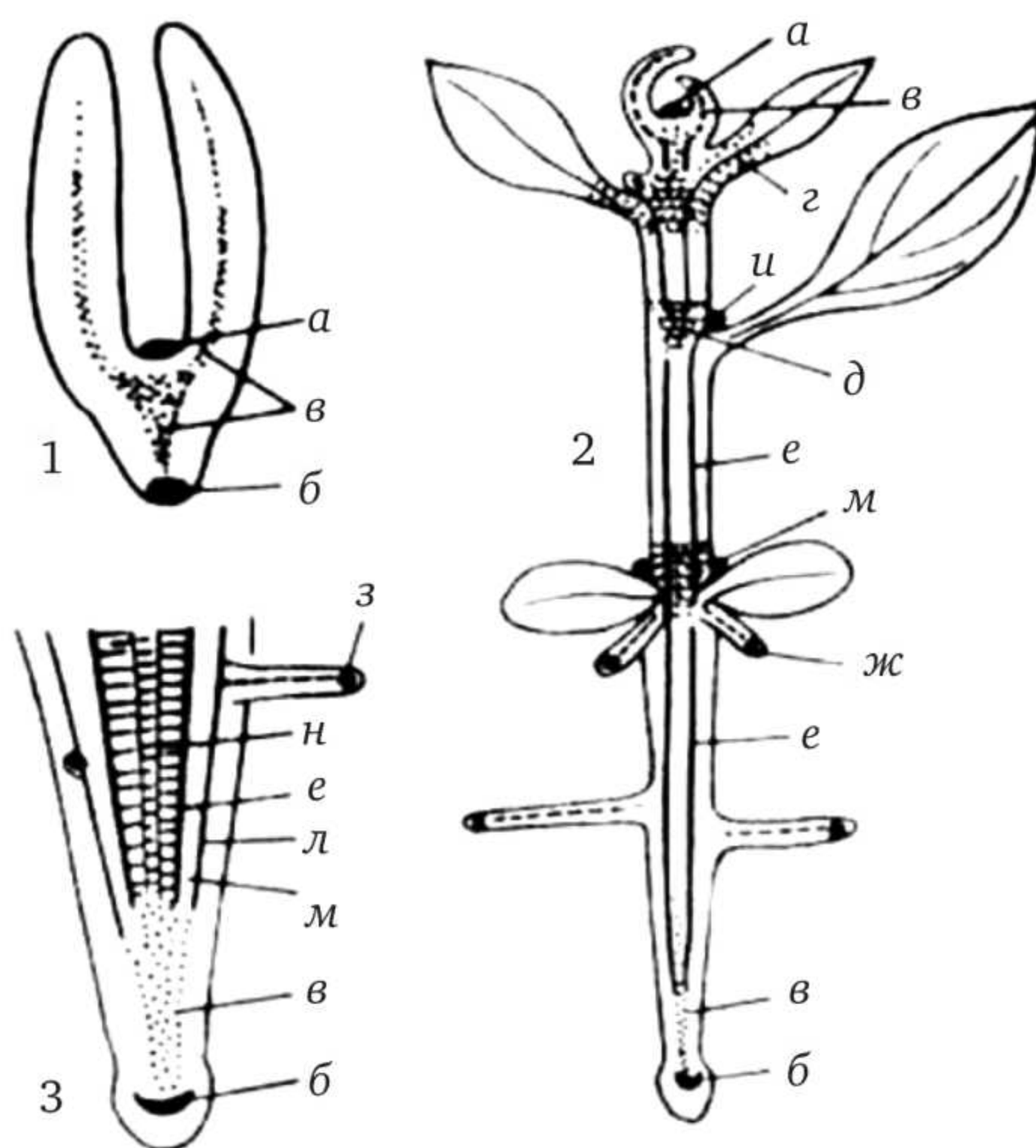
На одном экспланте может дифференцироваться до нескольких десятков побегов. Когда они достигнут высоты 10 мм, отделить их от каллусной ткани в стерильных условиях. Перенести побеги на среды для индукции корнеобразования: МС без гормонов и МС + 2 мг/л ИМК + 1мг/л ГК, и поместить на 20 дней в темноту. Через 7—14 дней отметить появление корней.

Задание: записать количество апексов, появившихся на каждом каллусе. Результаты эксперимента зарисовать через 2, 4, 6 и 8 недель. Сделать выводы о влиянии различных гормонов на органогенез каллусной ткани.

Лабораторная работа № 10.

Изолирование и культивирование апикальных меристем картофеля

В культуре тканей можно размножать растения и получать оздоровленный (безвирусный) посадочный материал. Для оздоровления растений используют культуру апикальных меристем. Активно делящиеся клетки конуса нарастания, расположенного на вершукке побега, не содержат вирусов. Обычно на питательные среды высаживают небольшую часть меристемы до 0,5 мм. Чем меньше величина меристемы, тем больше вероятность получения безвирусных растений. Биотехнология позволяет получать безвирусный оздоровленный посадочный материал практически всех сельскохозяйственных культур.



Меристематические ткани:

1 — в зародыше семени, 2 — в проростке растения, 3 — в кончике корня;
 а — верхушечная меристема побега, б — верхушечная меристема корня,
 в — прокамбий, г — интеркалярная меристема листа, д — интеркалярная меристема побега, е — камбий, ж — верхушечная меристема придаточного корня, з — верхушечная меристема бокового корня, и — верхушечная меристема пазушной почки, к — ксилема, л — перицикл, м — флоэма

Наиболее полно разработана технология получения безвирусного картофеля. В культуре тканей используются апексы верхушечных и боковых почек. Клубни картофеля хранят при 4—6°C, затем проращивают при 20—22°C.

Цель работы: получить апикальные меристемы картофеля и пронаблюдать за развитием из них побега.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс, бинокулярный микроскоп, флаконы со стерилизующими растворами (0,2% диацид или 70% спирт), чашки Петри, стерильная дистиллированная вода, стерильные инструменты: пинцеты, препаровальные иглы, скальпели, спиртовка, пробирки со средой.

Объект исследования: проростки картофеля.

Таблица 3

Модифицированная питательная среда Мурасиге — Скуга для культивирования апикальных меристем картофеля

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хеллат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-HCl	1 мг/л
Пиридоксин-HCl	1 мг/л
Витамин B ₁₂	0,015 мг/л
Никотиновая кислота	2 мг/л
Фолиевая кислота	0,5 мг/л
Мезоинозит	100 мг/л
Гидролизат казеина	1 г/л
Аденин	40 мг/л
Пантотенат Ca	10 мг/л
Рибофлавин	0,5 мг/л
Биотин	1 мг/л
Активированный уголь	10 г/л
ГК	2 мг/л
Кинетин	0,5 мг/л
Сахароза	20 г/л
Глюкоза	20 г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5,7—5,8	

Ход работы: поверхность ламинара, штативы, пробирки, микроскоп обработать ультрафиолетом и 96% спиртом. Руки протереть спиртом. Препаровальные иглы, пинцеты, скальпели поместить в 96% спирт и перед каждой манипуляцией обжигать на пламени спиртовки.

Проростки (2 см) отделить от клубней и поместить в чашки Петри со стерилизующими растворами: в диацид на 3—5 мин, в спирт на 1—2 мин. Проростки промыть 3 раза стерильной дистиллированной водой и перенести в стерильные чашки Петри. Тонкой препаровальной иглой у проростков удалить все листья, последовательно обнажая верхушечные и боковые меристемы с примордиями. Меристему с 1—2 примордиями отделить от проростков, при этом величина экспланта должна быть не более 100—250 мкм. Экспланты перенести в пробирку на поверхность питательной среды. Пробирки закрыть пробками, поместить в штатив и перенести в культуральную комнату. В культуральной комнате поддерживают температуру 25°C, влажность воздуха 70%, освещенность 5 клк и фотопериод 16 ч.

В среднем от посадки меристемы на среду до формирования проростков с 5—6 листочками проходит 30—45 дней, в некоторых случаях от 2 до 8 месяцев. Среда по мере истощения обновляют, и проростки периодически пересаживают на новые среды в стерильных условиях.

Задание: через 2, 3, 4 недели проводят наблюдение за развитием из меристемы побега, результаты зарисовать и сделать выводы.

Лабораторная работа № 11.
Клональное микроразмножение картофеля путем
черенкования побегов

Микроклональное размножение пробирочных растений осуществляют с помощью черенкования. Такое размножение основано на подавлении апикального доминирования и активации пазушных меристем при удалении верхушки побега. Из пазушных почек на питательных средах образуются побеги.

Растения, сформировавшие 5—6 листочков, в стерильных условиях извлекают из пробирок и делят на сегменты (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Черенки высаживают на глубину междоузлия в питательные среды либо без гормонов, либо с добавлением ауксинов. Черенки культивируют в тех же условиях, что и меристемы. Рост стебля и корней начинается на 3—4 день после посадки на питательную среду, а полностью растения формируются через 12—15 дней. Каждое последующее черенкование проводят через 24—28 дней. Из одного растения можно получить 5—8 черенков, а через 2—3 месяца — 3—5 тыс. черенков.

Если почки или черенки высадить на питательные среды с высоким содержанием цитокининов, то образуется конгломерат почек и побегов. Полученные побеги легко отделяются друг от друга, их можно либо укоренить, либо использовать для дальнейшего микрочеренкования.

Цель работы: провести микроразмножение картофеля путем микрочеренкования побегов.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс, пробирки с проростками, пробирки с питательной средой МС, скальпели, препаровальные иглы, спиртовка, флакон с 96% спиртом.

Объект исследования: стерильные проростки картофеля в пробирках.

Таблица 4

Модифицированная питательная среда Мурасиге — Скуга для микроразмножения картофеля черенкованием побегов

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хеллат	5 мл/л
CaCl ₂	50 мл/л

Компоненты питательной среды	
Тиамин-НСl	1 мг/л
Пиридоксин-НСl	1 мг/л
Никотиновая кислота	2 мг/л
Аденин	40 мг/л
Кинетин	0,5 мг/л
Гибберелловая кислота	2 мг/л
Пантотенат Са	10 мг/л
Активированный уголь	10 г/л
Сахароза	30 г/л
Агар-агар	7 г/л
рН 5,8	

Ход работы: подготовить ламинар-бокс и инструменты к работе. В ламинаре извлечь стерильные проростки картофеля из пробирок. Побеги разрезать на сегменты (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Часть стебля над листом должна быть в 2—3 раза меньше, чем часть ниже листа. Микрочеренки помещают в питательную среду на глубину междоузлия. Пробирку закрыть пробкой, поместить в штатив и перенести в культуральную комнату. Необходимо соблюдать стерильность.

Задание: пробирку с черенком зарисовать. Через 1, 2, 3 недели проводят наблюдение за развитием побега и зарисовывают этапы развития растения из черенка.

Лабораторная работа № 12.

Получение микроклубней картофеля *in vitro*

В практике биотехнологии на искусственных питательных средах с определенным набором биологически активных веществ можно укоренить побеги, а также индуцировать образование микроклубней. Для этого обычно используют среды с высоким содержанием минеральных солей (Мурасиге-Скуга), углеводов (сахарозы до 8% от объема среды), цитокининов, абсцизовой кислоты, хлорхолинхлорида.

В течение первых 10—12 суток после черенкования растения выращивают на обычном фотопериоде (16—17-часовой) с интенсивностью освещения 3—5 кЛк, при температуре 25°С днем и 19—20°С ночью. Последующее культивирование проводят на 12-часовом фотопериоде при той же степени освещенности и температуре.

В некоторых случаях, после выращивания в условиях длинного дня пробирки переносят в холодильник с температурой 10°С. Образование микроклубней происходит через 1—1,5 месяца. Микроклубни хранят в холодильнике при температуре +5°С и влажности воздуха до 95%. Их закладывают в стерильные пробирки без среды по 10 штук в каждую и закрывают пробками (срок хранения до 6 месяцев). Таким образом, создаются условия, соответствующие периоду покоя картофеля, что способствует лучшей всхожести и жизнеспособности растений. Весь период от микрочеренкования до получения микроклубней составляет 60—65 дней.

Цель работы: изучить процесс клубнеобразования у проростков картофеля.

Оборудование и материалы: ламинар-бокс, пробирки с питательной средой для получения микроклубней, флаконы с 96% спиртом для стерилизации инструментов, скальпели, пинцеты, препаровальные иглы, спиртовка, вата, стерильные чашки Петри.

Объект исследования: стерильные проростки картофеля с 5—6 сформированными листьями в пробирках.

Таблица 5

**Модифицированная питательная среда Мурасиге — Скуга
для клубнеобразования у картофеля**

Компоненты питательной среды	
Маточный раствор макросолей	50 мл/л
Маточный раствор микросолей	1 мл/л
Fe-хеллат	5 мл/л

Компоненты питательной среды	
CaCl ₂	50 мл/л
Тиамин-HCl	1 мг/л
Пиридоксин-HCl	0,5 мг/л
Никотиновая кислота	0,5 мг/л
Аскорбиновая кислота	1 мг/л
Кинетин	0,5 мг/л
Сахароза	5 0 г/л
Агар-агар	7 г/л
pH 5,8—6,0	

Ход работы: в стерильных условиях, стерильными инструментами извлечь проростки с хорошо сформированными корнями из пробирок и перенести на питательные среды для индукции клубнеобразования. Пробирки с пересаженными в них растениями закрыть и перенести в культуральную комнату. В ходе опыта соблюдать световой и температурный режим режим.

Задание: провести наблюдение процесса клубнеобразования через 4, 6, 8 недель после начала культивирования. Результаты зарисовать, сделать выводы на основании теории гормональной регуляции. Заложить микроклубни на хранение.

Лабораторная работа № 13.

Получение безвирусного посадочного материала методом термотерапии в сочетании с культивированием апикальных меристем

В случае заражения посадочного материала вирусами применяют термотерапию (использование сухого горячего воздуха). В случаях заражения растений мозаичными, веретеновидными, нитевидными, палочковидными вирусами термическая обработка малоэффективна. В связи с этим дополнительно используют метод апикальных меристем. Для этого после термообработки апикальную меристему растений картофеля срезают и помещают в пробирки на питательные среды. Термообработку обычно проводят осенью и зимой. Весной из растений вычленяют пазушные почки от 0,3 до 1 мм и высаживают на питательные среды (МС без гормонов, pH 5,7).

Цель работы: изучить влияние высокой температуры на развитие апикальных меристем картофеля.

Оборудование и материалы: кюветы с песком, флаконы с водой, ламинар-бокс, бинокулярный микроскоп МБС-9 или МБС-10, стерильные скальпели, препаровальные иглы, флаконы с 96% спиртом, хлорамином, спиртовки, пробирки с питательными средами.

Объект исследования: клубни картофеля.

Ход работы: здоровые клубни картофеля тщательно промыть проточной водой. Клубни обработать дезинфицирующим раствором (спирт, хлорамин), промыть стерильной дистиллированной водой. Вырезать глазки с частью паренхимы (1,5 × 1,5 см) и поместить в кюветы для проращивания и термотерапии.

Глазки разместить в кюветах со стерильным песком и проращивать 1—2 недели при температуре 28—30°C, 4 недели при температуре 37—38°C и влажности воздуха 70—80%. Дважды в день песок увлажнять, через 7—10 дней провести подкормку раствором Кнопа и микроэлементов по прописи Мурасиге-Скуга: 5 мл маточного раствора на 1 л раствора Кнопа.

Проростки, прошедшие термотерапию, поместить в 6% раствор хлорамина на 5 мин, промыть стерильной дистиллированной водой. В ламинар-боксе под микроскопом вычленить апикальные меристемы и поместить их в пробирки с питательными средами. Весь растительный материал перенести в культуральную комнату с нормальными условиями.

Клубни жаровыносливых сортов можно сразу выращивать при температуре 37—38°C и влажности воздуха 70%. Режим тепловой обработки для каждого сорта подбирают экспериментально.

Задание: результаты зарисовать через 2, 4, 6 и 8 недель, сделать выводы о влиянии высокой температуры на зараженный посадочный материал.

Лабораторная работа № 14.

Выделение изолированных протопластов

Изолированный протопласт представляет собой содержимое растительной клетки, окруженное плазмалеммой. Целлюлозная стенка у него отсутствует.

Изолированные протопласты — одни из наиболее ценных объектов в биотехнологии. При их слиянии происходит образование гибридных клеток. В изолированные протопласты достаточно легко вводить генетическую информацию из органелл и клеток других растений, прокариотических организмов и из клеток животных, что имеет важное значение, как в теоретическом, так и практическом отношении.

Цель работы: получить изолированные протопласты механическим методом.

Оборудование и материалы: пробирки, пипетки на 10 мл, штативы для пробирок, лезвия, препаровальные иглы, стеклянные палочки, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, 1 М раствор сахарозы, дистиллированная вода.

Объект исследования: кусочки растительных тканей (окрашенная эпидерма чешуи лука, листьев бегонии или традесканции).

Ход работы: приготовить в пробирках растворы сахарозы в концентрациях 0,3; 0,35; 0,4; 0,45; 0,5; 0,55 0,6; 0,7 М. Опустить в пробирки с растворами кусочки растительных тканей (окрашенная эпидерма чешуи лука, листьев бегонии или традесканции), что приводит к плазмолизу, позволяющему видеть протопласт в целой клетке. Через 10—15 мин извлечь растительную ткань из пробирок и положить на предметные стекла в каплю соответствующего раствора. Придерживая стеклянной палочкой, разрезать ее на тонкие полоски, оставляя неразрезанным общий конец. Осторожно провести препаровальной иглой по ткани, выдавливая в раствор содержимое разрушенных клеток. Убрать ткань, каплю раствора накрыть покровным стеклом, рассмотреть препарат в микроскоп с целью обнаружения изолированных протопластов.

Задание: отметить раствор, в котором обнаружены изолированные протопласты и зарисовать их. Сделать выводы.

Примечание: механический метод извлечения изолированных протопластов дает очень небольшой выход целых протопластов. Он требует большой аккуратности и высокой точности исполнения. Растворы сахарозы разной концентрации позволяют выбрать один раствор, водный потенциал которого будет близок к водному потенциалу клеток растительной ткани. В этом растворе с наибольшей вероятностью будут сохраняться целые протопласты.

Литература

1. Алберте Б., Брей Д., Дж. Льюис Молекулярная биология клетки: В 3-х тт. — М.: Мир, 1994. — 245 с., 256 с., 280 с.
2. Атанасов А. В. Биотехнология в растениеводстве. — Новосибирск: ИЦ и Г СО РАН, 1993. — 240 с.
3. Батыгина Т. Б. Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей. — 1999. — URL: <http://www.anrb.ru/inbio/cyto/1/htm>
4. Биотехнология растений: культура клеток. — М.: Агропромиздат, 1989. — 280 с.
5. Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. — М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. — 160 с.
6. Бутенко Р. Г. Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. — М.: Наука, 1975. — 51 с.
7. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение: пер. с англ. — М.: Мир, 2002. — 589 с.
8. Егорова Т. А., Клунова С. М., Живухина Е. А. Основы биотехнологии. — М.: Академия, 2003. — 208 с.
9. Загорская Н. А., Шамина З. Б., Бутенко Р. Г. Изучение растений-регенерантов, полученных в культуре тканей табака // Генетика. — 1971. — Т. 7. — С. 23—36.
10. Круглова Н. Н. Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. — Уфа: Гилем, 2001. — 175 с.
11. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. — СПб.: Издательство СПб. ун-та, 2003. — 228 с.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: пер. с англ. — М.: Мир, 1984. — 480 с.
13. Муромцев Г. С. Основы сельскохозяйственной биотехнологии. — М.: Агропромиздат, 1990. — 384 с.
14. Рис Э., Стернберг М. От клеток к атомам. — М.: Мир, 1988. — 152 с.
15. Сидоров В. А. Биотехнология растений. Клеточная селекция. — Киев: Наукова думка, 1990. — 280 с.
16. Фролова Л. В. Особенности популяций культивируемых клеток. В сб. Культура клеток растений. — М.: Наука, 1981. — С. 5—16.
17. Шамина З. Б. Создание школы по биологии культивируемых клеток растений и биотехнологии в СССР // Физиология растений. — 2005. — Т. 52. — № 1. — С. 157—160.

18. Сингер М., Берг П. Гены и геномы. В 2 т. — М.: Мир, 1998. — 287 с., 289 с.

19. Эллиот В., Эллиот Д. Биохимия и молекулярная биология. — М.: НИИБМХ РАМН, 2000. — 245 с.

Новые издания по дисциплине «Биотехнология растений» и смежным дисциплинам

1. Алферова Г. А. Генетика: учебник для академического бакалавриата. — 3-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
2. Алферова Г. А., Ткачева Г. А., Прилипко Н. И. Генетика. Практикум: учеб. пособие для академического бакалавриата. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
3. Биотехнология. В 2 ч.: учебник и практикум для академического бакалавриата / под общ. ред. Н. В. Загоскиной, Л. В. Назаренко. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
4. Жохова Е. В., Скляревская Н. В. Ботаника: учеб. пособие для вузов. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
5. Жохова Е. В., Скляревская Н. В. Ботаника: учеб. пособие для СПО. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
6. Кузнецов В. В., Дмитриева Г. А. Физиология растений. В 2 т.: учебник для академического бакалавриата. — 4-е изд., перераб. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
7. Левитин М. М. Сельскохозяйственная фитопатология + доп. материалы в ЭБС: учеб. пособие для СПО. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
8. Мойзес О. Е., Кузьменко Е. А. Информатика. Углубленный курс: учеб. пособие для прикладного бакалавриата. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
9. Осипова Л. А. Генетика. В 2 ч.: учеб. пособие для СПО. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
10. Осипова Л. А. Генетика. В 2 ч.: учеб. пособие для вузов. — 2-е изд., испр. и доп. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
11. Тимирязев К. А. Жизнь растения / под ред. Л. М. Берцинской. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
12. Тимирязев К. А. Исторический метод в биологии / под ред. Л. М. Берцинской. — М.: Издательство Юрайт, 2017.
13. Фаминцын А. С. Обмен веществ и превращение энергии в растениях. В 2 ч. — М.: Издательство Юрайт, 2017.

Словарь терминов

In vitro — выращивание растительных объектов «в стекле» (пробирке, колбе, биореакторе) на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

Адвентивные почки — почки, возникшие из тканей и клеток растения, обычно их не образующих.

Анеуплоид — клетка или организм с числом хромосом, не кратным n .

Апекс — верхушечная часть стебля или корня.

Апикальное доминирование — явление подавления роста боковых почек побега в присутствии терминальной почки.

Ауксины — фитогормоны (ИУК, НУК, 2,4-Д), активизирующие рост стеблей и корней, стимулирующие образование корней у проростков.

Гаплоид — клетка или организм, характеризующиеся набором хромосом, представляющим собой половину полного набора, свойственного виду (символ n).

Геммогенез — образование почек, вид органогенеза.

Гетерогибридома — межвидовая гибридома. Линия гибридных клеток, полученных слиянием клеток мышинной миеломы с лимфоцитами животных другого вида.

Гетеротроф — организм, который требует в качестве источника энергии и углерода сложные молекулы, такие, как глюкоза.

Гиббереллины — фитогормоны (ГК и др.), активизирующие рост стеблей, вызывающие прорастание семян.

Гибридома — клеточный гибрид, получаемый слиянием нормальной клетки (например, иммунного лимфоцита) с опухолевой. Обладает способностью к синтезу специфического белка, напр., антитела (свойство нормальной клетки), и к неограниченному росту (свойство опухолевой клетки). Синтезируемые гибридомой моноклональные антитела применяют во многих областях биологии и медицины. Ведутся работы по получению гибридом, продуцирующих другие белки — факторы свертывания крови, гормоны и т.п.

Гистогенез — образование в каллусе различных тканей: элементов сосудистой системы, млечников, волокон, трихом.

Дедифференциация — переход специализированных клеток в пролиферации и неорганизованному каллусному росту.

Диплоид — ядро, клетки, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленным числом, характерным для данного вида (символ $2n$).

Дифференциация — комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

Дифференцировка — состояние специализации клеток, отличающее их от других.

Доминант — ген, проявляющийся как признак при условии, когда гомологичные наборы имеют разные гены.

Жизнеспособность — доля живых клеток в культуре *in vitro*.

Инокулюм — часть клеточной суспензии, используемая для переноса на свежую питательную среду.

Каллус — ткань, возникшая *in vivo* или *in vitro* путем неорганизованной пролиферации клеток растений и эксплантов.

Кариотип — набор хромосом, характерный для данного вида.

Кластер клеток — группа ранее разобщенных клеток, объединившихся в результате взаимной адгезии.

Клеточная инженерия — создание клеток нового типа на основе их гибридизации, реконструкции и культивирования. В узком смысле слова под этим термином понимают гибридизацию протопластов или животных клеток, в широком — различные манипуляции с ними, направленные на решение научных и практических задач. Является одним из основных методов биотехнологии.

Клеточная селекция in vitro — метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.

Клон — (от греч. klon — ветвь, отпрыск), популяция клеток или организмов, происшедших от общего предка путем бесполого размножения, клеточная культура, возникшая из одной клетки.

Клональное микроразмножение (микрклональное размножение) — получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному (метод вегетативного размножения растений в культуре *in vitro*).

Культура «привыкших» тканей — выращивание тканей, возникших путем редифференциации или мутации клеток нормальных каллусных тканей, и способных расти на питательных средах без гормонов.

Культура зиготических зародышей in vitro — асептическое выращивание на искусственной питательной среде незрелых или зрелых изолированных зародышей.

Культура изолированных протопластов — выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризованной среде, содержащей в качестве дополнительного компонента осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации. При регенерации стенок изолированные протопласты превращаются в культуру клеток.

Культура каллусных тканей — выращивание в длительной пересадочной культуре каллусов, возникших путем дедифференцировки и пролиферации клеток, тканей и органов растения.

Культура меристем in vitro — асептическое выращивание на искусственной питательной среде изолированного апекса или пазушной

почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями.

Культура органов in vitro — асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных органов животных и растений (корней, стеблевых апексов, незрелых частей цветка, незрелых плодов).

Культура суспензионная или культура клеток in vitro — асептическое выращивание отдельных клеток или их небольших групп во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде.

Культура тканей in vitro — выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений и животных.

Линия — размножающиеся половым путем родственные организмы, которые происходят, как правило, от одного предка или одной пары общих предков и воспроизводят в ряду поколений одни и те же наследственно устойчивые (обычно имеется в виду — полезные) признаки. Скрещивание линий дает хотя генетически обедненные, но высокопродуктивные гибриды в растениеводстве и животноводстве.

Меристема — образовательная ткань с мелкими, активно делящимися клетками.

Митотический индекс — доля клеток, делящихся в данный момент времени.

Моль — молекулярная масса соединения, выраженная в граммах.

Моляльный (m) раствор — раствор, в котором 1 моль вещества растворен в 1000 г воды.

Молярный (M) раствор — раствор, в котором 1 моль вещества растворен в 1000 мл раствора.

Моноплоид — ядро, клетка, организм, характеризующиеся основным числом хромосом в полиплоидной серии (символ X).

Морфогенез в культуре in vitro — совокупность процессов дифференцировки клеток с образованием специализированных органов и тканей, процесс формообразования, т.е. заложения, роста и развития клеток (цитогенез), тканей (гистогенез) и органов (органогенез) в культуре клеток и тканей *in vitro*.

Мутация — изменения в генетическом материале клеток путем перестройки ДНК ядер и органелл, изменений в структуре хромосом или уровне пloidности организма.

Омнипотентность ядер — сохранение ядрами соматических клеток растений всех потенций ядра зиготы, т.е. сохранение всей генетической информации.

Органогенез — дифференциация каллусных клеток в целые органы.

Пассируемый каллус — каллус, постоянно поддерживаемый в культуре *in vitro*.

Первичный каллус — ткань, образующаяся на питательной среде из клеток экспланта.

Питательные среды — жидкие или твердые смеси веществ, на которых выращивают микроорганизмы, клетки, поддерживают жизнедеятельность тканей (органов) в лабораторных или промышленных условиях. Содержат соединения, служащие источниками углерода, азота, фосфора, витаминов и других компонентов, необходимых для жизнедеятельности.

Плюрипотентность — свойство стволовых клеток дифференцироваться во все типы клеток эмбриона, внезародышевых тканей и взрослого организма.

Полиплоид — клетка или организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символ $3n$, $4n$ и т.д.).

Пролиферация — новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

Протопласт — растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного или механического разрушения.

Псевдодиплоид — ядро, клетки, организм, характеризующиеся диплоидным числом хромосом, отличающиеся от зигот данного вида по кариотипу.

Растения-регенеранты — растения, полученные (регенерированные) из культивируемых клеток.

Регенерация — восстановление целостного организма из клетки, ткани, органа.

Редифференциация — переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

Рецессив — ген или генетически обусловленный признак, проявляющийся в диплоидной клетке или организме при условии, когда оба набора хромосом несут данные гены.

Ризогенез — процесс заложения, роста и развития корней.

Ростовой цикл — рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризующийся сигмоидальной (S-образной) кривой. Фазы ростового цикла: латентная (лаг-фаза), экспоненциальная (лог-фаза, фаза логарифмического роста), замедления роста, стационарная, дегенерации.

Селективная среда — среда, содержащая какой-либо фактор, ингибирующий рост или понижающий жизнеспособность клеток.

Слияние изолированных протопластов — формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

Соматональные варианты (соматоклоны) — растения-регенеранты, отличающиеся от исходных форм.

Соматональные вариации — изменения, возникающие при культивировании клеток *in vitro* и проявляющиеся у растений-регенерантов.

Соматическая (парасексуальная) гибридизация — способ создания гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений путем генетической рекомбинации хромосом и генов ядра и органелл вне сексуального цикла, например путем слияния изолированных протопластов.

Соматический гибрид — растение, полученное путем гибридизации изолированных протопластов.

Соматический эмбриогенез — образование в каллусной или суспензионной культуре эмбриоидов.

Субкультивирование — процесс переноса транспланта или инокулюма в культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Субпротопласт — изолированный протопласт, потерявший часть цитоплазмы, сохранивший ядро.

Тотипотентность — свойство изолированных клеток полностью реализовать свой потенциал развития с образованием нового организма.

Трансплант — часть каллусной ткани, используемая для переноса на свежую среду.

Фибронектин — поверхностный гликопротеин фибробластов и других клеток, обеспечивающий их взаимную адгезию.

Фидерные, филлерные клетки — питающие клетки, используемые в культурах *in vitro* для кондиционирования среды и обеспечения метаболитами и ростовыми факторами других нуждающихся в этом клеток.

Фитогормоны — (гормоны растений) — биологически активные соединения, образующиеся в растениях в малых количествах, вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект.

Флоральный морфогенез — формирование цветковой меристемы, вид органогенеза.

Цибрид — растение, полученное при слиянии изолированного протопласта с цитопластом, протопластом с инактивированным ядром или с энуклеированным протопластом.

Цикл выращивания (ростовой цикл) — период от помещения клеточного инокулюма или каллусного транспланта на свежую питательную среду до последующего субкультивирования.

Цикл клеточной селекции — один цикл выращивания на селективной среде.

Цитокинины — фитогормоны (кинетин, транс- и цис-зеатин, 6-БАП), активизирующие развитие меристем, стимулирующие образование почек, задержку старения листьев.

Цитопласт — клетка, из которой удалено ядро; ограниченный мембраной участок цитоплазмы, возникший при фрагментации изолированного протопласта.

Чистая линия — генотипически однородное потомство, получаемое от одной самоопыляющейся (растения) или самооплодотворяющейся (животные) особи с помощью отбора и дальнейшего самоопыления или самооплодотворения. Представляет собой группу организмов гомозиготных по большинству генов. Изучение наследования признаков в чистой линии — важный метод экспериментальной генетики.

Штамм — культура, возникшая после первого субкультивирования, и состоящая из многих клеточных линий, возникших из клеток первичного каллуса.

Эксплант — фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

Экспоненциальный рост — лавинообразное увеличение количества чего-то (с возрастающим ускорением, экспоненциальная функция: $y = e^x$). Характерен для процесса размножения, особенно не ограниченного никакими рамками. Обычно характеризуется периодом удвоения. Например, микроорганизмы, делящиеся каждые 2 ч, увеличиваются в числе: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 и т.д. с двухчасовым периодом удвоения.

Эмбриодогенез — процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) неполовым путем в культуре тканей и клеток *in vitro*.

Эмбриоиды — зародышеподобные структуры, способные развиваться во взрослое растение.

Эмбриокультура — культивирование *in vitro* изолированных зиготических зародышей с целью получения растения.

Эпигенетические вариации — фенотипическое выражение дифференциальной активности генов. От мутаций и соматоклональных вариаций отличаются тем, что не сохраняются в цикле клетка-растение-клетка.

Эуплоид — клетка или организм с числом хромосом, кратным n .

Наши книги можно приобрести:

Учебным заведениям и библиотекам:
в отделе по работе с вузами
тел.: (495) 744-00-12, e-mail: vuz@urait.ru

Частным лицам:
список магазинов смотрите на сайте urait.ru
в разделе «Частным лицам»

Магазинам и корпоративным клиентам:
в отделе продаж
тел.: (495) 744-00-12, e-mail: sales@urait.ru

Отзывы об издании присылайте в редакцию
e-mail: red@urait.ru

**Новые издания и дополнительные материалы доступны
в электронной библиотечной системе «Юрайт»
biblio-online.ru**

Учебное издание

**Назаренко Людмила Владимировна,
Долгих Юлия Ивановна,
Загоскина Наталья Викторовна,
Ралдутина Галина Николаевна**

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Учебник и практикум для бакалавриата и магистратуры

Формат 70×100¹/₁₆.
Гарнитура «Charter». Печать цифровая.
Усл. печ. л. 12,49.

ООО «Издательство Юрайт»
111123, г. Москва, ул. Плеханова, д. 4а.
Тел.: (495) 744-00-12. E-mail: izdat@urait.ru, www.urait.ru