

ВЫСШЕЕ

ОБРАЗОВАНИЕ

Е. А. Калашникова

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Учебник и практикум
2-е издание

УМО ВО
РЕКОМЕНДУЕТ

 **юрайт**
ИЗДАТЕЛЬСТВО

Е. А. Калашникова

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

УЧЕБНИК И ПРАКТИКУМ ДЛЯ ВУЗОВ

2-е издание

*Рекомендовано Учебно-методическим отделом высшего образования
в качестве учебника и практикума для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по естественнонаучным направлениям*

**Книга доступна на образовательной платформе «Юрайт» urait.ru,
а также в мобильном приложении «Юрайт.Библиотека»**

Москва ■ Юрайт ■ 2020

УДК 576(075.8)

ББК 28.4я73

K17

Автор:

Калашникова Елена Анатольевна — доктор биологических наук, профессор кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства факультета агрономии и биотехнологии Российского государственного аграрного университета — Московской сельскохозяйственной академии имени К. А. Тимирязева.

Рецензенты:

Аладина О. Н. — доктор сельскохозяйственных наук, профессор, научный консультант диссертационного совета Российского государственного аграрного университета — Московской сельскохозяйственной академии имени К. А. Тимирязева;

Зайцева С. М. — кандидат биологических наук, доцент кафедры кормления и кормопроизводства факультета зоотехнологий и агробизнеса Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина.

Калашникова, Е. А.

K17 Клеточная инженерия растений : учебник и практикум для вузов / Е. А. Калашникова. — 2-е изд. — Москва : Издательство Юрайт, 2020. — 333 с. — (Бакалавр и магистр. Академический курс). — Текст : непосредственный.

ISBN 978-5-534-11790-5

В учебнике рассматриваются вопросы развития биотехнологии и ее фундаментальной основы — клеточной и тканевой биотехнологии в растениеводстве. Подробно описаны биология культивируемой клетки, калусная ткань, сохранение единообразия растений *in vitro*, основные и вспомогательные методы культуры изолированных клеток и тканей в селекции растений, организация лаборатории для проведения работ по клеточной инженерии растений.

Каждый раздел содержит контрольные вопросы и задания, ситуационные задачи, лабораторный практикум.

Соответствует актуальным требованиям Федерального государственного стандарта высшего образования.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по естественно-научным направлениям.

УДК 576(075.8)

ББК 28.4я73

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в какой бы то ни было форме без письменного разрешения владельцев авторских прав.

© Калашникова Е. А., 2012

© Калашникова Е. А., 2019,

с изменениями

© ООО «Издательство Юрайт», 2020

ISBN 978-5-534-11790-5

Оглавление

Предисловие	9
-------------------	---

Раздел I БИОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРУЕМОЙ КЛЕТКИ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Глава 1. Биология культивируемой клетки	15
Контрольные вопросы и задания	21
Глава 2. Клеточная инженерия растений, основные направления исследований	22
2.1. Сущность и задачи клеточной инженерии растений	22
2.2. Направления исследований клеточной биотехнологии растений	24
Контрольные вопросы и задания	27
Глава 3. Техника введения и культивирования изолированных клеток и тканей растений в условиях <i>in vitro</i>	28
3.1. Методы исследований	28
3.2. Объекты исследований	34
Контрольные вопросы и задания	35
Глава 4. История развития биотехнологии и клеточной инженерии растений	36
4.1. Основные этапы развития биотехнологии	36
4.2. История развития клеточной инженерии растений	39
Контрольные вопросы и задания	42
Ситуационные задачи	43
Лабораторный практикум	46

Раздел II КАЛЛУСНАЯ ТКАНЬ — ОСНОВНОЙ ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 5. Способы получения и культивирования калусной ткани. Практическое ее применение	55
5.1. Способы получения калусной ткани	56
5.2. Культивирование калусной ткани в условиях <i>in vitro</i>	59
5.3. Особенности калусных клеток	60
5.4. Генетика калусных клеток	62

5.5. Гормоннезависимые растительные ткани	63
Контрольные вопросы и задания	67
Глава 6. Морфогенез каллусной ткани	68
Контрольные вопросы и задания	75
Глава 7. Факторы, влияющие на морфогенез каллусной ткани....	76
7.1. Физиологические, гормональные и физические факторы.....	77
7.2. Управление функциональной активностью растительной клетки когерентным светом.....	78
Контрольные вопросы и задания	87
Глава 8. Культура клеточных суспензий	88
8.1. Получение и культивирование суспензионной культуры	88
8.2. Культура одиночных клеток.....	91
Контрольные вопросы и задания	94
Глава 9. Соматическая изменчивость каллусной ткани	96
9.1. Естественное генетическое разнообразие клеток растений	97
9.2. Эпигенетическая изменчивость	99
9.3. Практическое использование и перспективы применения соматической изменчивости	103
Контрольные вопросы и задания	105
Глава 10. Каллусная ткань — источник веществ вторичного метаболизма.....	106
10.1. Общая характеристика вторичных метаболитов	107
10.2. Клеточная биотехнология и получение веществ вторичного метаболизма	109
10.3. Основные способы культивирования штаммов-продуцентов в биореакторе (ферментерах)	113
10.4. Ферментеры для получения веществ вторичного метаболизма....	117
10.5. Растения — продуценты биологически активных веществ	119
Контрольные вопросы и задания	126
Ситуационные задачи	127
Лабораторный практикум	128

Раздел III

СОХРАНЕНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ *IN VITRO*

Глава 11. Этапы и методы клонального микроразмножения....	135
11.1. Этапы клонального микроразмножения растений.....	138
11.2. Методы клонального микроразмножения растений	139
Контрольные вопросы и задания	147
Глава 12. Техника культивирования первичных эксплантов на разных этапах клонального микроразмножения.....	148
Контрольные вопросы и задания	157

Глава 13. Факторы, влияющие на клональное микроразмножение растений	158
13.1. Генетические и физиологические факторы.....	158
13.2. Факторы гормональной и негормональной природы.....	163
13.3. Физические факторы.....	166
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	168
Глава 14. Клональное микроразмножение декоративных, плодово-ягодных и хвойных растений	169
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	182
Глава 15. Оздоровление посадочного материала от вирусов. Методы тестирования. Оптимизация условий клонального микроразмножения	183
15.1. Вирусы, их структура, механизм инфицирования. Классификация вирусов	183
15.2. Оздоровление посадочного материала от вирусов	186
15.3. Оптимизация условий клонального микроразмножения растений.....	194
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	200
Ситуационные задачи	201
Лабораторный практикум	203

Раздел IV

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Глава 16. Преодоление прогамной и постгамной несовместимости растений	211
16.1. Оплодотворение в культуре <i>in vitro</i>	211
16.2. Культура изолированных зародышей	212
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	215
Глава 17. Кριοконсервация растений	216
<i>Контрольные вопросы</i>	219
Глава 18. Получение гаплоидных растений <i>in vitro</i> и использование их в селекции	220
18.1. Значение гаплоидии в селекции растений	220
18.2. Методы создания гаплоидных растений	225
18.3. Факторы, влияющие на получение гаплоидных растений <i>in vitro</i>	230
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	246
Ситуационные задачи	247
Лабораторный практикум	248

Раздел V

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

Глава 19. Гибридизация соматических клеток.....	255
<i>Контрольные вопросы.....</i>	<i>261</i>
Глава 20. Клеточная и тканевая селекция растений на устойчивость к абиотическим факторам	262
20.1. Исходный объект для селекции <i>in vitro</i>	263
20.2. Получение растений-регенерантов <i>in vitro</i> , устойчивых к абиотическим факторам окружающей среды	265
20.3. Особенности мутагенеза и селекции мутантов в условиях <i>in vitro</i>	273
<i>Контрольные вопросы и задания.....</i>	<i>274</i>
Глава 21. Клеточная и тканевая селекция растений на устойчивость к биотическим факторам	276
21.1. Использование патогенов в клеточной селекции растений на устойчивость к болезням.....	277
21.2. Использование патотоксинов в клеточной селекции растений на устойчивость к болезням.....	279
21.3. Использование культурального фильтрата патогена в клеточной селекции растений на устойчивость к болезням....	284
21.4. Участие фитогормонов в клеточной селекции растений на устойчивость к экзометаболитам патогенных грибов.....	290
21.5. Участие фенольных соединений в адаптации клеточных культур <i>in vitro</i> к действию экзометаболитов патогенных грибов	296
<i>Контрольные вопросы и задания.....</i>	<i>302</i>
Глава 22. Достижения клеточной биотехнологии в растениеводстве	303
<i>Контрольные вопросы и задания.....</i>	<i>309</i>
Ситуационные задачи	310
Лабораторный практикум	311

Раздел VI

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРИИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ ПО КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

Глава 23. Моделирование технологий клонального микроразмножения растений. Принципы создания биотехнологической лаборатории	319
23.1. Архитектурно-хозяйственная структура лаборатории	319
23.2. Расходные материалы, необходимые для проведения работ по клеточной инженерии растений.....	322

23.3. Экономические и производственные расчеты, необходимые при организации лаборатории по клеточной инженерии растений	323
<i>Контрольные вопросы и задания</i>	325
Деловая игра «Судебное дело»	326
Кейс-задачи	327
Библиографический список	328
Глоссарий	329

Предисловие

Биотехнология — одна из наиболее быстро развивающихся областей промышленности и наиболее перспективная в силу ее экономичности и экологичности. В расширительном толковании биотехнология — это все технологические процессы, в которых принимают участие живые клетки растений, животных, микроорганизмов и человека.

Лидерами биотехнологии сегодня являются США и Япония. Учеными этих стран накоплен многолетний опыт применения биотехнологических методов и технологий для сельского хозяйства, пищевой, фармацевтической, химической промышленности и других областей народного хозяйства. Прочное положение в производстве ферментных препаратов, аминокислот, белка, лекарств занимают страны Западной Европы (Германия, Франция, Великобритания), а также Россия. Они характеризуются мощным потенциалом новой техники и технологии, интенсивными фундаментальными и прикладными исследованиями в различных областях биотехнологии. Эти технологии базируются на использовании каталитического потенциала различных биологических агентов и систем: микроорганизмов, вирусов, растительных и животных клеток и тканей, а также внеклеточных веществ и компонентов клеток.

Японский профессор К. Сакагучи, характеризуя перспективы и роль биотехнологии в человеческом обществе, говорил: «...ищите все, что пожелаете, у микроорганизмов, и они не подведут вас... Изучение и применение в промышленности культур клеток млекопитающих и растений, иммобилизация не только одноклеточных, но и клеток многоклеточных организмов, развитие энзимологии, генетической инженерии, вмешательство в сложный и недостаточно изученный наследственный аппарат растений и животных все больше расширяют области применения существующих направлений биотехнологии и создадут принципиально новые направления»¹.

Научной основой биотехнологии являются принципы биохимии и микробиологии, клеточной и молекулярной биологии, генетики и селекции. Успехи, достигнутые в молекулярной биологии и генетике, создали предпосылки для управления процессами жизне-

¹ Волова Т. Г. Биотехнология. Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской академии наук, 1999.

деятельности клеток и целого организма, что стало импульсом к развитию биотехнологии как науки на стыке разных дисциплин. Биотехнология — это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения¹.

Значение исследований по биотехнологии в агрономической науке резко возрастает в настоящее время, когда на одно из первых мест поставлена задача возрождения сельскохозяйственного производства России за счет повышения урожайности и качества растениеводческой продукции с помощью новых технологий. Биотехнологические и биоинженерные методы все шире используются в агрономии, в селекции при выведении новых сортов и гибридов, при оценке трансгенных растений.

Одним из перспективных разделов биотехнологии является *клеточная и тканевая инженерия растений*, направленная на размножение, сохранение и увеличение генетического разнообразия растений путем культивирования живых клеток растений на искусственных питательных средах в стерильных (*in vitro*), контролируемых условиях. Клеточная инженерия основана на использовании принципиально нового объекта — изолированных клеток, тканей и органов эукариотических организмов, а также на таком уникальном свойстве растительной клетки, как тотипотентность. Умение выделять и культивировать первичные экспланты, а также получать из них каллусную и суспензионную культуры, растения-регенеранты, вещества вторичного метаболизма, новые формы растений, обладающие устойчивостью к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды, открывает большие возможности в решении глобальных теоретических и практических задач агропромышленного комплекса.

Исходя из этого к специалистам в различных областях предъявляются высокие требования по знанию основ биотехнологии, в частности клеточной инженерии растений. Данная книга призвана создать у обучающихся определенный уровень компетентности по направлениям 19.03.01 «Биотехнология» и 19.04.01 «Биотехнология».

Цель книги — формирование у будущих специалистов теоретических знаний и практических навыков по применению современных методов клеточной и тканевой биотехнологии в растениеводстве и агропромышленном комплексе. Она направлена на ознакомление студентов с современным оборудованием и принципами их работы при использовании различных методов биотехнологии для произ-

¹ Шевелуха В. С. [и др.]. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник. М. : Высшая школа, 2008.

водства продукции растениеводства, обладающей повышенной продуктивностью, устойчивостью к стрессовым факторам среды и экономической эффективностью.

В результате изучения книги студенты должны:

знать

- историю развития биотехнологии в России и мире;
- основные принципы работы в стерильных условиях и приготовления питательных сред;
- технику получения дедифференцированных клеток;
- основные типы морфогенеза дифференцированных и дедифференцированных клеток;
- клональное микроразмножение растений;
- технику культивирования на разных этапах клонального микроразмножения растений;
- технологию выращивания дедифференцированных клеток в ферментерах;
- методы преодоления прогамной и постгамной несовместимости растений;
- современное оборудование и принцип его работы в клеточной биотехнологии;
- технические требования, предъявляемые к сырью, материалам, готовой биотехнологической и сельскохозяйственной продукции;
- принципы создания лаборатории биотехнологии для проведения исследований по клеточной инженерии растений;

уметь

- различать дифференцированные, дедифференцированные и опухолевые клетки;
- рассчитывать и составлять питательные среды для культивирования изолированных растительных эксплантов;
- подбирать условия культивирования изолированных клеток, тканей и органов растений в условиях *in vitro*;
- производить обработку данных с применением методов математического анализа;
- производить новый модифицированный объект;

владеть

- технологиями производства веществ вторичного синтеза в условиях *in vitro*;
- методологией регенерации растений из дедифференцированных клеток;
- технологиями получения гаплоидных растений;
- способами культивирования изолированных зародышей с целью преодоления постгамной несовместимости растений;
- технологиями оплодотворения в условиях *in vitro* с целью преодоления прогамной несовместимости растений;

- навыками производства сельскохозяйственной продукции, обладающей повышенной продуктивностью, устойчивостью к стрессовым факторам среды.

Книга предназначена для магистров, аспирантов и преподавателей, агрономических и биологических специальностей вузов. Составляет из шести разделов, включающих 23 главы, которые охватывают все направления исследований по клеточной биотехнологии растений. В основу учебника и практикума положены курсы лекций и практических занятий, которые проводились автором в течение ряда лет в Российском государственном аграрном университете — Московской сельскохозяйственной академии имени К. А. Тимирязева, а также материалы отечественных и зарубежных публикаций.

Раздел I

БИОЛОГИЯ

КУЛЬТИВИРУЕМОЙ КЛЕТКИ

И БИОТЕХНОЛОГИЯ

В результате изучения учебного материала данного раздела обучающиеся должны:

знать

- строение растительной клетки;
- различия между прокариотами и эукариотами;
- принцип тотипотентности;
- сущность и задачи клеточной инженерии растений;
- направления исследований клеточной инженерии растений;
- объекты и методы исследований в клеточной инженерии растений;
- технику культивирования первичных эксплантов на искусственных питательных средах;

• компоненты питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений;

- способы получения стерильной культуры;

уметь

• готовить питательные среды и правильно подбирать состав субстрата для культивирования изолированных эксплантов *in vitro*;

• работать в ламинар-боксе и получать стерильную культуру изолированных клеток и тканей растений;

владеть

- техникой приготовления питательных сред;
 - техникой работы в ламинар-боксах.
-

Глава 1

БИОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРУЕМОЙ КЛЕТКИ

Считается, что развитие клеточной биотехнологии стартовало в начале XX в., когда Г. Хаберландт выдвинул гипотезу о тотипотентности. Совершенствование технологий культивирования клеток, тканей и органов растений на искусственных питательных средах привело к образованию таких направлений исследований, как соматическая гибридизация, клональное микроразмножение растений, культивирование генеративных частей растений *in vitro* с целью получения гаплоидных растений, криосохранение, клеточная и тканевая селекция, культура изолированных зародышей и др.

Клетка является одной из основных форм существования жизни. В ней происходят все физиологические процессы, присущие как одноклеточным, так и многоклеточным организмам, рост и размножение которых связаны с образованием новых клеток. В целом организме все клетки разнообразны. Они различаются по форме, величине, степени дифференциации и определенным функциям, выполняющимся в целом организме.

Роль отдельных клеток в многоклеточном организме подвергалась неоднократно обсуждению и критике. Например, Т. Шванн представлял себе многогранную деятельность организма как сумму жизнедеятельности отдельных клеток. Это представление было принято и получило название теории «клеточного государства». Р. Вирхов писал: «...всякое тело сколько-нибудь значительного объема представляет устройство, подобное общественному, где множество отдельных существований поставлено в зависимость друг от друга, но так, однако же, что каждое из них имеет свою собственную деятельность, и если побуждение к этой деятельности оно и получает от других частей, то свою работу оно совершает собственными силами»¹.

При попадании интактного растения в условия абиотического или биотического стресса наблюдается ответная реакция растения на стресс за счет активации работы специализированных клеток. Аналогичная тенденция наблюдается и при размножении, движении или раздражении растений. Все органы и ткани многоклеточных организмов состоят из клеток, которые находятся во взаимной

¹ Волова Т. Г. Биотехнология. Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской академии наук, 1999.

связи друг с другом, поэтому нельзя говорить о главных органах или главных клетках в целом организме. Все клетки, ткани и органы многоклеточных организмов связаны между собой молекулярно-генетическими и физиолого-биохимическими реакциями. Вот почему мы говорим об организме как о целостной системе.

Клетка является элементарной единицей жизни. Различают половые и соматические клетки, в которых происходят определенные процессы обмена веществ и имеется все необходимое для размножения. Кроме того, клетки гетерогенны в целом организме по размеру и выполняемым функциям.

Все живые организмы делятся на две группы — прокариоты и эукариоты. В первую группу входят бактерии, сине-зеленые водоросли, у которых нет морфологически выраженного ядра. Ко второй группе относятся все остальные представители живого мира, у которых обязательной структурой является клеточное ядро. Строение эукариотической клетки приведено на рис. 1.1, из которого следует, что помимо ядра в клетке присутствуют цитоплазма, специализированные органеллы, а также клеточная стенка (греч. *ketos*), благодаря которой и появилось слово «клетка». В любой растительной клетке клеточная стенка окружает и защищает протопласт, который содержит цитоплазму, ограниченную снаружи специальной плазматической мембраной — плазмалеммой.

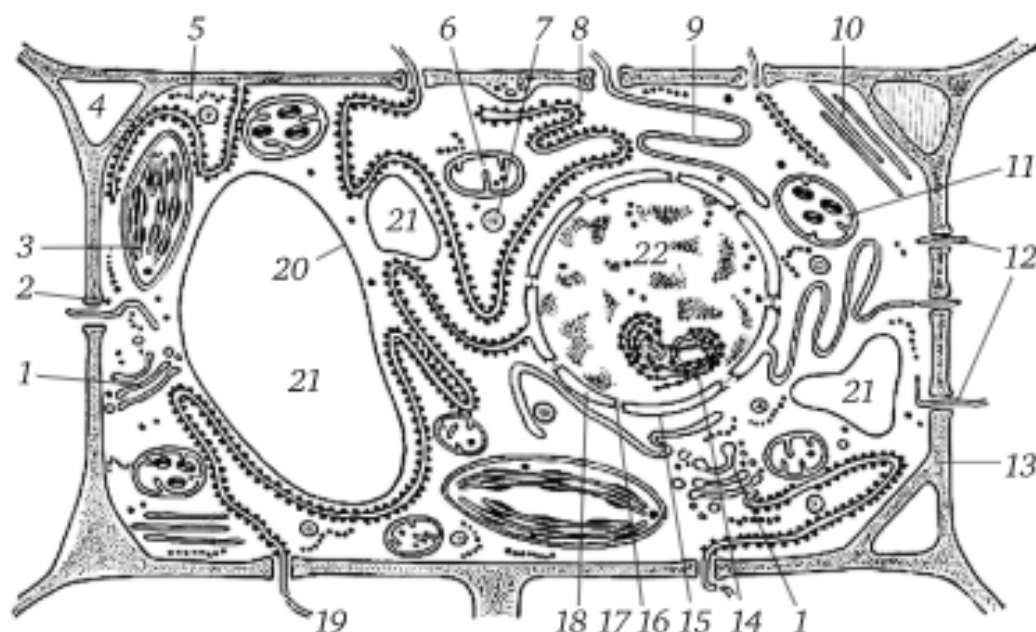


Рис. 1.1. Схема строения растительной клетки:

- 1 — аппарат Гольджи; 2 — рибосомы; 3 — хлоропласты; 4 — межклеточные пространства; 5 — полирибосомы; 6 — митохондрии; 7 — лизосомы;
- 8 — гранулированная эндоплазматическая сеть; 9 — гладкая эндоплазматическая сеть; 10 — микроотрубчики; 11 — пластиды;
- 12 — плазмодесмы, проходящие сквозь оболочку; 13 — клеточная стенка;
- 14 — ядрышко; 15, 18 — ядерная оболочка; 16 — поры в ядерной оболочке;
- 17 — плазмалемма; 19 — цитоплазма; 20 — тонопласт; 21 — вакуоли;
- 22 — ядро

Ядро — центр, управляющий жизнедеятельностью всей клетки и координирующий ее. Оно имеет сложное строение, изменяющееся на разных этапах жизненного цикла клетки. Ядро окружено ядерной оболочкой (мембраной), пронизанной порами, через которые осуществляется обмен веществ между ядром и цитоплазмой. Внутри ядра находятся хроматин, одно или несколько ядрышек и ядерный сок — кариолимфа, или нуклеоплазма. Ядрышки — тельца, связанные с хромосомами, — содержат большое количество рибонуклеиновой кислоты (РНК), в них происходит синтез рибосомной РНК.

Энергия в клетке вырабатывается *митохондриями* — особыми сферическими или палочковидными образованиями разнообразной величины и сложной структуры. При исследовании цитоплазмы с помощью электронной микроскопии была открыта система мембран и канальцев, служащих продолжением клеточной мембраны и связанных с внешней мембраной ядерной оболочки. Эта система получила название *эндоплазматической сети*, или *ретиккулама*. По эндоплазматической сети канальцев, образуемых мембранами, передвигаются вещества внутри клетки. Здесь же открыты субмикроскопические частицы — рибосомы, — состоящие из белков и РНК.

Важнейшими структурными элементами клетки являются *пластиды* — хлоропласты, лейкопласты, хромопласты и др., — характерные для цитоплазмы растительных клеток. Хлоропласты содержат хлорофилл и участвуют в процессе фотосинтеза; бесцветные пластиды синтезируют крахмал; хромопласты — пигменты; зупласты — жиры и пластидные нуклеиновые кислоты.

В цитоплазме клетки имеются специфические органоиды: *аппарат Гольджи* — производное эндоплазматической сети — обеспечивает выделительную и секреторную функцию клетки; *лизосомы* — тела, содержащие ряд ферментов и выполняющие функцию пищеварения внутри клетки; *центросомы* — клеточный центр которых состоит из небольших телец центриолей и центросферы — особым образом дифференцированного участка цитоплазмы.

Клеточная мембрана имеет сложное строение, приспособленное к выполнению определенных функций: защитной, избирательной проницаемости и активного втягивания частиц и молекул. Активный транспорт молекул через клеточную мембрану осуществляется с помощью ионных каналов.

Передача наследственных признаков потомству как при вегетативном, так и при половом размножении, осуществляется делением клеток. Изучение процессов деления эукариотических клеток показало, что из всех клеточных компонентов только хромосомы распределяются поровну между дочерними клетками. Это указывает на участие хромосом в передаче наследственных признаков: в результате деления ядра каждая дочерняя клетка получает точно

такой же набор хромосом, как у исходной родительской клетки. В этом уравнительном распределении хромосом ядра заключается генетическое значение митоза. Пластиды и митохондрии также размножаются путем деления, но их распределение по дочерним клеткам не подчиняется строгой закономерности.

Деление клетки состоит из двух основных этапов: 1) деление ядра — митоз (кариокинез); 2) деление цитоплазмы (цитокинез). Ядро клетки при делении проходит последовательные стадии: интерфазу, профазу, метафазу, анафазу и телофазу (рис. 1.2). Между двумя последовательными делениями клетки ядро находится в стадии интерфазы. Хотя интерфазу и называют стадией покоящегося ядра, однако метаболические процессы в ядре в этот период протекают наиболее активно.

Продолжительность всего митотического цикла — от 30 мин до 3 ч — зависит от вида и физиологического состояния организма, типа ткани, внешних факторов: температуры, света и др. Скорость прохождения отдельных фаз митоза также различна.

Новый организм при половом размножении возникает из зиготы — оплодотворенной яйцеклетки, — которая образуется при слиянии гамет, т. е. мужской и женской половых клеток. Если бы каждая гамета вносила в зиготу полный набор хромосом родительского организма, то их число увеличивалось бы вдвое за каждое поколение. Мейоз, предшествующий образованию как женских, так и мужских половых клеток, является регулирующим механизмом, позволяющим сохранять постоянное число хромосом.



Рис. 1.2. Схема митоза:

1 — неделящаяся клетка; 2 — профазу; 3 — метафаза; 4 — анафаза;
5 — телофаза

Мейоз — процесс деления клетки, при котором наблюдаются соединение (конъюгация) гомологичных хромосом попарно и редукция (уменьшение) их числа в клетках — продуктах деления (рис. 1.3). При мейозе ядро делится дважды. В результате первого мейотического деления образуются два ядра с половинным — гаплоидным числом хромосом. Во втором делении каждое вновь образовавшееся ядро делится еще раз, но уже митотическим путем, — расходятся хромосомы, которые образовались из сестринских хроматид. Таким образом, из каждой клетки, вступившей в мейоз, после двух последовательных делений образуются четыре клетки с половинным числом хромосом.

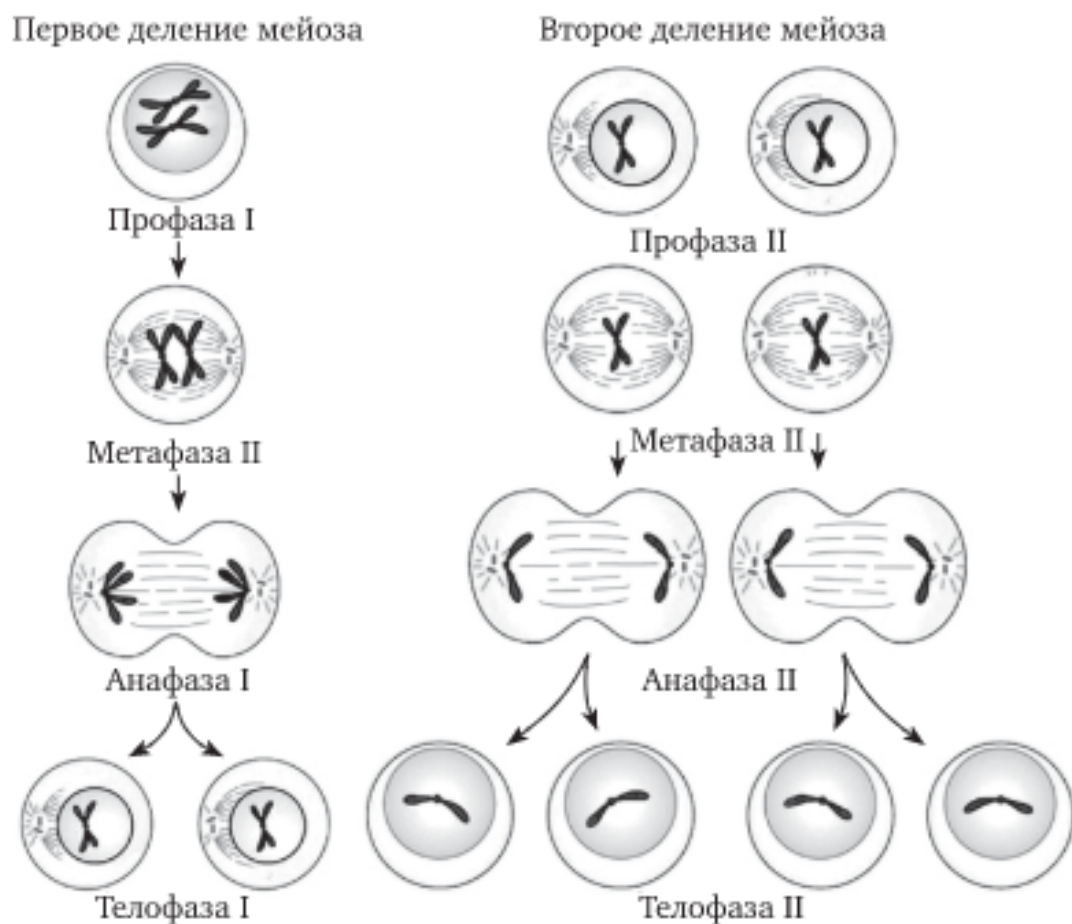


Рис. 1.3. Схема и фазы мейоза

При мейозе не только вдвое уменьшается число хромосом, но и происходит распределение компонентов парных гомологичных хромосом по разным клеткам. При этом каждая пара ведет себя независимо. Редукции хромосом в мейозе предшествует слияние — конъюгация гомологов, которое позволяет каждой паре гомологичных хромосом обмениваться участками. Это создает дополнительный резерв наследственных комбинаций при половом размножении организмов. Процесс обмена гомологичных хромосом своими частями получил название *кроссинговера*.

Возникшая после слияния отцовского и материнского ядер зигота содержит программу развития будущего организма, записанную в молекуле дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Изменяя эндогенные факторы развития, можно управлять продукционным процессом и морфогенезом. Причем генетическая информация в специализированных клетках не изменяется, но при создании соответствующих благоприятных условий можно наблюдать формирование целого организма из каждой соматической клетки растения. Это явление называется *тотипотентностью*, оно присуще только растительным клеткам, но не клеткам животных, для которых восстановление целого организма возможно только из половых клеток. Все паренхимные клетки растения, в каких бы тканях они ни находились, содержат полный набор генов, такой же, какой имела зигота. Однако в каждой ткани действует только часть генов, связанная с дифференциацией данного типа клеток. Одни гены функционируют во всех клетках организма, например гены, контролирующие дыхание, проницаемость мембран, синтез аденозинтрифосфата (АТФ); другие — только в определенных. Каждая специализированная клетка характеризуется своим набором активных генов. Чем более специализированы клетки, тем меньше в них активных генов. Разные гены работают не только в различных клетках, но и в разное время, на разных стадиях развития особи. В однотипных клетках одной и той же ткани на разных стадиях развития организма непрерывно меняется набор активных генов. Одни гены включаются, синтезируя иносформационную РНК (иРНК) определенных белков, другие выключаются из этой работы.

Образование в процессе развития из однородных клеток разнообразных по морфологическим признакам и функциям типов клеток, тканей и органов называется *дифференциацией*. В основе дифференциации тканей лежит разница в активности генов. Различия в структуре и функциях в конечном счете определяются тем, какие типы белков синтезируются в клетке. Поскольку синтезом белков управляют гены, а набор генов во всех клетках тела одинаков, дифференцировка должна зависеть от активации или инактивации тех или иных генов в различных типах клеток. Регуляция активности генов происходит на уровне транскрипции, т. е. образования иРНК с использованием ДНК в качестве матрицы. Только транскрибированные гены производят белки. Синтезируемые белки могут блокировать транскрипцию, но иногда и активируют ее. Кроме того, поскольку белки являются продуктами генов, одни гены могут контролировать транскрипцию других генов. Очень активные гены могут многократно дублироваться (удваиваться) для производства большего количества иРНК. В регуляции транскрипции участвуют также гормоны. Кроме того, предполагают, что клетки ранее образующейся ткани выделяют вещества, способные активизировать ра-

боту генов, необходимых для дифференциации другой ткани. Этот процесс называется *тканевой индукцией*. Центральная проблема онтогенетики — анализ действия гена при формировании признака и установление промежуточных звеньев в цепи «ген — признак».

Гормональная регуляция — наиболее хорошо изученный механизм активизации генов. Гормоны могут воздействовать на гены непосредственно или вызывать появление в цитоплазме каких-то специфических веществ, действующие затем на гены. Одни гормоны — очень сложные белки; другие — короткие цепочки полипептидов; третьи — простые производные аминокислот. Проникая в клетку, гормоны воздействуют на комплекс «гистоны — ДНК» и активируют отдельные локусы.

Особую роль в дифференциации тканей играют гомеобоксные гены, группы которых содержат одинаковые элементы «гомеобоксы». Они служат адресом для гормональных веществ-регуляторов, определяя одновременную активацию или репрессию целого семейства генов. У растений гомеобоксные гены были открыты в 1980-х гг. Показано, что и у растений они контролируют порядок возникновения и специализации метамеров.

Таким образом, растительная клетка — весьма сложное образование, включающее различные микроскопические и субмикроскопические структуры, отличительной особенностью которых является высокая динамичность, способность закономерно изменяться под влиянием условий существования.

Контрольные вопросы и задания

1. Расскажите о строении растительной клетки.
2. Какие растения входят в прокариотическую группу?
3. Какие растения входят в эукариотическую группу?
4. Дайте объяснение явлению тотипотентности.
5. Расскажите о процессе митоза.
6. Перечислите фазы мейоза.

Глава 2

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ, ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Сущность и задачи клеточной инженерии растений

Еще с древних времен известен такой процесс, как сбраживание с помощью микроорганизмов, который в настоящее время широко применяется, например, при изготовлении пива. Об этом говорят археологические раскопки, свидетельствующие о существовании таких технологий в Вавилоне еще 6 тыс. лет до н. э. Следовательно, биотехнологические процессы известны издревле и рассматриваются в современном мире как классические.

Сегодня мы с уверенностью говорим о том, что биотехнологические процессы широко применяются на практике, а с продуктами биотехнологии мы сталкиваемся повседневно.

Основной отличительной особенностью всех биотехнологических процессов является участие в них живых клеток растений, животных, микроорганизмов и человека.

Современная биотехнология начала свое развитие с середины 1960-х гг. Этому способствовали важные научные достижения, например, в области молекулярной генетики (1953, открытие двойной молекулы ДНК), физиологии растений (открытие двух регуляторных классов фитогормонов — ауксинов, 1932, и цитокининов, 1955), а также в биохимии и биологии клетки. Кроме того, наметился определенный сдвиг в прикладных областях получения новых фармацевтических средств, биосинтезом которых можно управлять за счет применения модифицированных микроорганизмов и их ферментов.

Развитие биотехнологии определяется не только совершенствованием, повышением эффективности и автоматизацией традиционных биотехнологических процессов в части сбраживания с использованием микроорганизмов, но и разработкой совершенно новых процессов. К последним относятся отрасли, в которых традиционные технологии заменяют на современные биотехнологические процессы, например, при длительном хранении продуктов, при производстве пищевых добавок, полимеров, сырья для текстильной

промышленности, спирта, биогаза и водорода, а также при извлечении некоторых драгоценных металлов из недр земли. Следует отметить, что для некоторых областей народного хозяйства биотехнология играет ведущую роль в изготовлении продуктов питания, повышении устойчивости сельскохозяйственных культур к факторам абиотической и биотической природы, в производстве новых лекарств, в уменьшении загрязнения окружающей среды и др.

Для быстрого и правильного решения биотехнологических задач недостаточно знать только науки биологического профиля, такие как физиология, генетика, селекция, биохимия, микробиология, растениеводство, энтомология, фитопатология, ботаника и др., важно также уметь применять на практике и многие другие науки — химию, биофизику, энергетику и т. д.

Основные преимущества биотехнологических процессов над другими технологиями:

- низкая энергоемкость;
- применение стандартного оборудования;
- экологически чистое производство;
- безотходное производство;
- проведение работ в течение всего года.

Клеточная биотехнология базируется на способности клеток к существованию и размножению *in vitro*, их тотипотентности и регенерации.

Тотипотентность (от лат. *totus* — весь, *potentia* — сила) — это свойство клетки реализовать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма. Тотипотентностью обладают оплодотворенные яйцеклетки растений и яйца животных организмов. Что касается дифференцированных клеток, то у животных тотипотентность присуща только некоторым клеткам кишечнораотовых. Так, соматические клетки гидры дают начало новому организму. У высших животных с ранних этапов эмбриогенеза, с началом специализации клеток, тотипотентность не реализуется. Однако клетки, изолированные из эмбрионов млекопитающих, в условиях культивирования способны сохранять плюрипотентность — способность дифференцироваться во все типы клеток как собственно зародыша, так и экстраэмбриональных тканей. Такие клетки получили название эмбриональных стволовых клеток, с ними связывают решение проблемы пересадки тканей.

Для растений, произрастающих в естественных условиях, тотипотентностью обладают любые специализированные соматические клетки. Например, вегетативное размножение происходит путем черенкования или индукции образования растений из листовых пластинок (бегонии, сенполии, каланхоэ и др.). Тотипотентность у растений реализуется и при заживлении ран; в результате на ра-

невой поверхности образуется неорганизованно растущая ткань, которая получила название «каллус» (лат. *callus* — мозоль, толстая кожа). Однако многие однодомные растения в процессе эволюции утратили способности к вегетативному размножению и образованию каллуса. Реализовывать супрессированную (подавленную) *in vivo* тотипотентность клеток возможно при их культивировании на искусственных питательных средах в условиях *in vitro*. Это осуществляется под действием регуляторов роста, являющихся необходимым компонентом любой питательной среды.

Метод культивирования изолированных тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) применяют в растениеводстве: для сохранения и размножения ценных генотипов, в эмбриогенезе, оздоровлении посадочного материала, для получения продуктов вторичного метаболизма, в создании форм растений, устойчивых к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды и т. д.

2.2. Направления исследований клеточной биотехнологии растений

В клеточной биотехнологии существует три направления исследований.

1. *Использование изолированных клеток и тканей в селекции растений in vitro.* В этом направлении исследований все методы можно условно разделить на две группы: вспомогательные и основные (рис. 1.4).

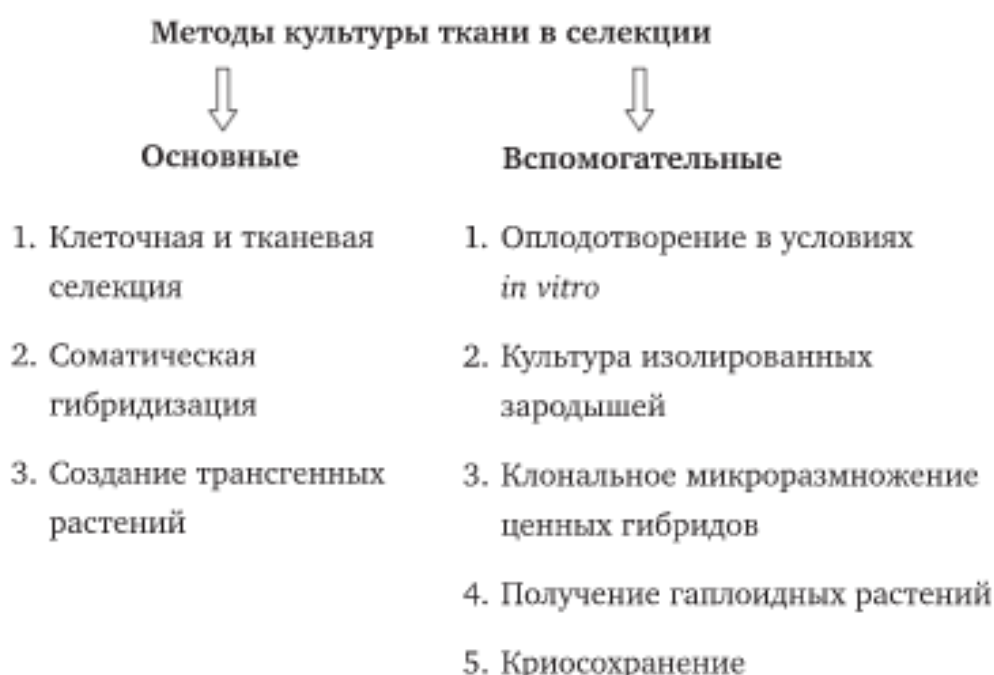


Рис. 1.4. Методы культуры ткани в селекции растений

Группа вспомогательных методов помогает селекционеру решить определенные трудные задачи на разных этапах селекционного процесса: например, преодолеть прогамную несовместимость растений возможно с применением метода оплодотворения *in vitro*, а постгамную несовместимость — культурой изолированных зародышей. Для получения чистых линий применяют гаплоидные технологии *in vitro*, а для размножения ценных гибридов и сортов — клональное микроразмножение. Группа основных методов помогает селекционеру создать новые формы растений (соматическая гибридизация, клеточная и тканевая селекция), которые в дальнейшем могут быть включены в селекционный процесс.

2. *Быстрое размножение и оздоровление посадочного материала от вирусов.* Реализуется данное направление исследований за счет применения метода клонального микроразмножения растений (рис. 1.5).

За последнее десятилетие технология клонального микроразмножения становится коммерческим производством. Наибольшее распространение эта технология получила для декоративных, тропических и цветочных растений, а для картофеля, спаржа, земляники, некоторых подвоев яблони и персика оно начинает заменять традиционные способы размножения и селекции.

3. *Способность изолированных растительных клеток продуцировать ценные для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей промышленности вещества вторичного синтеза:* алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др. Как правило, вторичные вещества получают из каллусной ткани, культивируемой на твердой (агаризованной) или жидкой (суспензионная культура) питательной среде. На основе клеточных технологий получают такие медицинские препараты, как диосгенин из клеток диоскореи, аймолин из клеток раувольфии змеиной, тонизирующие вещества из клеток женьшеня, используемые в медицине и парфюмерии. Продуктивность культивируемых клеток в результате их селекции *in vitro* может значительно превышать продуктивность целых растений. Также преимуществом этого способа получения веществ вторичного синтеза является возможность использовать для этой цели растения, не произрастающие в наших природных условиях, и получать продукцию круглый год.

Выращивание клеточных культур в промышленных масштабах осуществляется в ферментерах (рис. 1.6): в проточной культуре либо стационарно. Сложность оборудования диктуется необходимостью контроля состава культуральной среды и поддержания различных физико-химических параметров.

Успешность применения культуры клеток и тканей в первую очередь зависит от оптимизации физиологических процессов, обеспечивающих нормальное деление клеток, их дифференцировку и ре-

генерацию из них взрослых растений. Наиболее сложной является регенерация растений из отдельных клеток. В первую очередь это растения, относящиеся к семействам Сложноцветные (подсолнечник и др.), Злаковые (пшеница, ячмень и др.). Поэтому огромное значение имеет выяснение механизмов и лежащих в их основе процессов, регулирующих морфогенез *in vitro*, а также регенерацию растений.

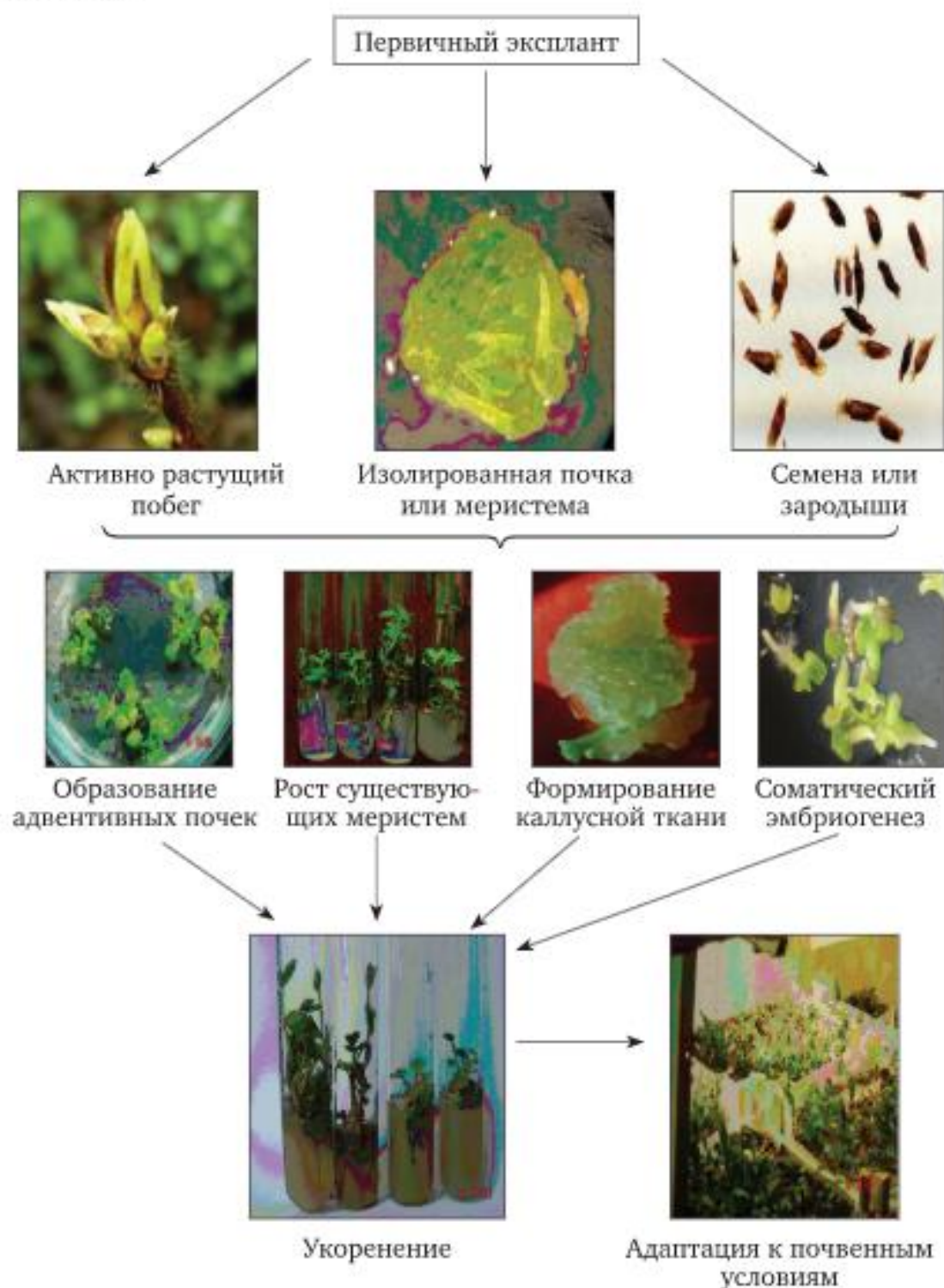


Рис. 1.5. Клональное микроразмножение растений



Рис. 1.6. Лабораторные шестилитровые ферментеры

Контрольные вопросы и задания

1. Дайте определение термину «современная биотехнология».
2. Назовите продукты, полученные при использовании биотехнологических процессов.
3. В каких областях народного хозяйства применяется биотехнология?
4. Перечислите преимущества биотехнологических процессов над другими технологиями.
5. Что является основным отличием биотехнологических процессов от других?
6. Назовите основные направления исследований по клеточной биотехнологии.
7. Какое явление лежит в основе получения целого растения из одной соматической клетки?
8. Что такое вещества вторичного синтеза? Приведите примеры.
9. Что такое клональное микроразмножение растений?
10. Какие вы знаете методы, ускоряющие и облегчающие селекционный процесс?

Глава 3

ТЕХНИКА ВВЕДЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

3.1. Методы исследований

Необходимым условием работы с культурой изолированных тканей является соблюдение строгой стерильности. Богатая питательная среда является прекрасным субстратом для развития в ней микроорганизмов, а изолированные от растения фрагменты (экспланты), которые помещают на питательную среду, легко поражаются микроорганизмами, поэтому нужно стерилизовать как эксплант, так и питательную среду. Все манипуляции с изолированными тканями (введение в культуру, пересадка на свежую питательную среду) проводят в асептическом помещении (ламинар-боксе) стерильными инструментами. Важно соблюдать стерильность и во время культивирования изолированных тканей, особенно при перепаде температуры и влажности, так как при этом пробки становятся влажными и по ним в пробирку могут проникать микроорганизмы.

Стерилизацию эксплантов и семян проводят, выдерживая их 5—20 мин в стерилизующих растворах с последующей многократной промывкой их стерильной водой. Продолжительность процесса зависит от характера экспланта и от стерилизующей активности раствора. Семена стерилизуют 10—20 мин, а вегетативные части — 5—10 мин (табл. 1.1)¹. Органы растений, из которых изолируют эксплант для введения в культуру, предварительно моют щеткой в мыльном растворе и споласкивают дистиллированной водой, а затем погружают на несколько секунд в 70%-ный этанол. Семена погружают в спирт на 1—2 мин. Кроме собственно стерилизующего действия спирта обработка тканей этанолом перед помещением в основной раствор повышает стерилизующий эффект последнего.

¹ Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе : учеб. пособие. М. : ФБК-ПРЕСС, 1999.

Стерилизация исходного растительного материала

Объект	Время стерилизации			
	диацид, 0,1%-ный раствор	сулема, 0,1%-ный раствор	гипохлориты (Na, Ca), 5—9%-ный раствор	пероксид водорода, 10—12%-ный раствор
Семена сухие	15—20	10—15	15—20	12—15
Семена набухшие	6—10	6—8	10—15	6—8
Ткани мясистого корня, клубня	20—30	15—25	15—20	—
Одревесневшие стебли	20—40	20—25	20—25	—
Листья	1—3	1—3	3—6	3—5
Апексы	1—10	1—7	3—15	2—7

Для стерилизации семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют следующие растворы: 0,1%-ный — сулемы (двухлористая ртуть), 0,1%-ный — диацид, 13—20%-ный — пероксида водорода, 10%-ный — хлорамина, 8%-ный — гипохлорита натрия или кальция.

Диацид готовят, растворяя отдельно 330 мг этанолмеркурхлорида и 660 мг цетилпиридиния хлорида в горячей воде (около 300 мл), затем их смешивают и доводят объем жидкости до 1 л, добавляют несколько капель детергента твин-80; хранят в плотно закрытой колбе в темноте. Перед стерилизацией ткань растения предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щеткой с мылом в теплой проточной воде, снимают кожуру (у корней и корнеплодов), кроющие чешуи (у листьев), промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд (семена — на 1—2 мин) в 70%-ный этиловый спирт. Обработка тканей этанолом повышает эффект основного стерилизующего раствора. Затем растительные объекты многократно прополаскивают в стерильной воде.

Пероксид водорода рекомендуется использовать для фасоли, люпина, подсолнечника (с очищенной кожурой), сулему — для томатов, тыквы и др. Продолжительность стерилизации семян сулемой — 10—15 мин, пероксидом водорода — 30 мин, для меристем и кусочков тканей требуется примерно в 2 раза меньше времени. Опушенные семена (хлопчатник) обрабатывают концентрированной серной кислотой в течение 5 мин. Легче всего семена отмываются от пероксида водорода. После сулемы и диациды воду меняют 5—6 раз.

Семена томатов, яблоны, тыквы, бобов и табака ко времени созревания заключены в мясистые, деревянистые или костяковидные покровы. Поэтому здоровые, с неповрежденной поверхностью плоды этих культур достаточно тщательно промыть мыльной водой, затем — несколько раз спиртом, после чего в строго асептических условиях их разрезают. Стерильным пинцетом вынимают семена и помещают их в стерильные чашки Петри для проращивания.

Поверхностная стерилизация освобождает эксплант только от наружной инфекции. Если же ткани экспланта имеют внутреннюю инфекцию, то его необходимо обработать антибиотиками. Особенно богаты внутренней инфекцией ткани тропических и субтропических растений с крупными сосудами. Загрязнение культур грибами или бактериями обычно выявляется через 3—14 суток после посадки. Загрязненные культуры необходимо тотчас же удалить, чтобы избежать заражения воздуха в световой комнате.

Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 120 °С и давлении 0,7—1 атм в течение 20 мин. Если в состав питательной среды входят вещества, разрушающиеся при высокой температуре, то их подвергают холодной стерилизации, пропуская через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22—0,45 мкм, после чего добавляют в проавтоклавированную охлажденную до 40 °С основную среду.

Посуду, предварительно завернутую в фольгу или оберточную бумагу, стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при 160 °С в течение 2 ч.

Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы (азот, фосфор, калий, кальций, магний, серу, железо) и микроэлементы (бор, марганец, цинк, медь, молибден и др.), а также витамины, углеводы, фитогормоны или их синтетические аналоги. Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток.

Для получения каллусной ткани в отдельных случаях к питательной среде добавляют жидкий эндосперм кокосового ореха (кокосовое молоко), каштана и др.

Углеводы являются необходимым компонентом питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние не способны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве углевода используют сахарозу или глюкозу в концентрации 2—3 %.

Фитогормоны необходимы для дедифференцировки клеток и для индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны обязательно входить аук-

сины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление клеток. В случае индукции стеблевого морфогенеза содержание ауксинов в среде может быть снижено или они могут быть полностью исключены из питательной среды.

В качестве источников ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индолил-3-уксусную кислоту (ИУК), α -нафтилуксусную кислоту (НУК), индолмасляную кислоту (ИМК).

В качестве источников цитокининов в искусственных питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин (БАП), зеатин, 2-изопентениладенин (2iP). 6-БАП и зеатин проявляют более высокую активность в поддержании роста изолированных тканей и индукции органогенеза по сравнению с кинетином. В состав некоторых сред входит аденин и другие биологически активные вещества.

В настоящее время известно большое число различных по составу питательных сред, но наиболее часто применяемая при выращивании изолированных растительных тканей в условиях *in vitro* среда Т. Мурасига и Ф. Скуга, впервые составленная в 1962 г. Эта среда содержит хорошо сбалансированный состав питательных веществ и отличается от других, как правило, соотношением аммонийного и нитратного азота (табл. 1.2).

Таблица 1.2

Состав питательных сред для культивирования изолированных тканей растений

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л				
	Мурасига — Скуга	Гамборга	Шенка — Хильдебрандта	Гресхофф — Доу	Нича
NH_4NO_3	1650	2500	2500		720
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	—	—	300	—	
KNO_3	1900	—	—	1000	950
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	200	150	166
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	400	250	185
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	—	130		200	
KH_2PO_4	170		—	—	68
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3	37,3	20,0	37,3	37,3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	27,85	15,0	27,8	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	—	150		90	
H_3BO_3	6,2	3,0	5,0	3,0	10
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	10,0	10,0	10,0	25

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л				
	Мура- сига — Скуга	Гам- борга	Шенка — Хиль- дебрандта	Гресхофф — Доу	Нича
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	2,0	1,0	3,0	10
KI	0,83	0,75	1,0	0,75	
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,1	0,25	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,2	0,25	0,025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,1	0,25	
Глицин	2,0			2,0	
Мезоинозит	100	100	1000	10	200
Никотиновая кислота	0,5	1,0	5,0	1,0	
Пиридок- син — HCl	0,5	1,0	0,5	0,1	1
Тиамин — HCl	1	10,0	5,0	0,1	3
2,4-Д	—	0,1— 1,0	—	—	
Кинетин	—	0,1	0,1	—	
Глутамин		—	—	2,0	
Сахароза	30 000	30 000	30 000	20 000	60 000

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар, который представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей. *Применять желатин в качестве затвердителя питательных сред для культивирования клеток растений запрещено.*

С целью рационального использования времени растворы солей макро- и микроэлементов, а также витаминов и фитогормонов готовят более концентрированными, что позволяет использовать их многократно. Концентрированные (маточные) растворы хранят в холодильнике.

Ламинар-боксы предназначены для культивирования изолированных клеток, тканей и некоторых других работ, требующих стерильности, которая обеспечивается с помощью бактериальных воздушных фильтров (рис. 1.7, а). За 10—20 мин до начала работы ламинар-бокс облучают бактерицидными ультрафиолетовыми лампами. Предварительно в ламинаре размещают спиртовую горелку, спички, фарфоровый стакан с 96%-ным спиртом и стерильной водой, а при изолировании меристем — и бинокулярную лупу. Внут-

треннюю поверхность ламинар-бокса, лупу, спиртовку, пробирки или колбы с питательной средой протирают 70%-ным спиртом.

Условия культивирования. Для успешного культивирования изолированных клеток и тканей растений необходимо соблюдать определенные условия выращивания. Большинство каллусных тканей не нуждается в свете, так как не имеют хлоропластов и питаются гетеротрофно. Исключение составляют некоторые зеленые каллусные ткани, такие как каллусная ткань мандрагоры. В некоторых случаях каллусные ткани, не способные к автотрофному питанию, все же выращивают на непрерывном освещении, что является необходимым условием дальнейшего успешного морфогенеза, как у люцерны. Большинство же каллусных тканей получают в темноте или при рассеянном свете.

Детерминированные к морфогенезу ткани переносят на свет и далее культивируют их 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 (рис. 1.7, б). Необходимо учитывать фотопериод, который требуется для данного культивируемого объекта. Влажность в культуральной комнате должна 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.

Оптимальная температура для большинства культивируемых тканей — 22—25 °С, для культуры тканей тропических растений она может достигать 29—30 °С. В случае индукции морфогенеза температуру понижают до 18—20 °С.

Наилучшие световой и температурный режимы, а также режим оптимальной влажности можно создать с помощью климатических камер (рис. 1.7, в).

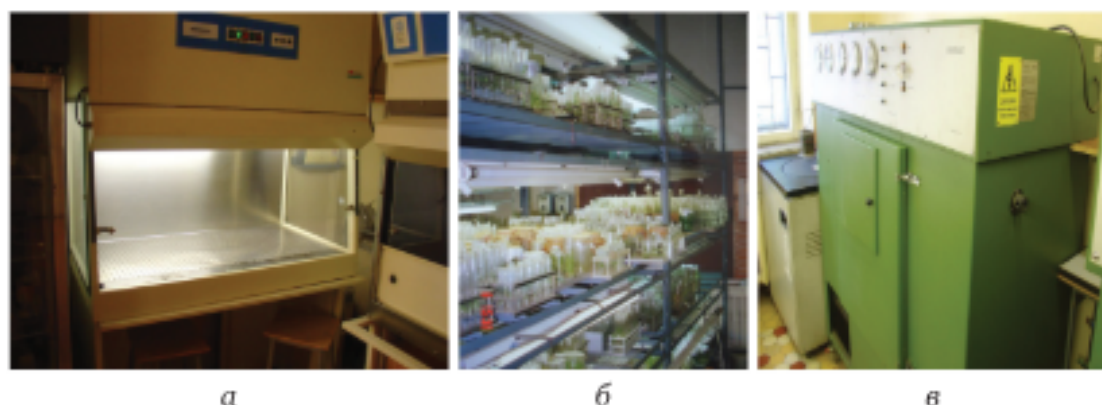


Рис. 1.7. Ламинар-бокс (а); световая комната (б); климакамера (в)

3.2. Объекты исследований

Набор объектов растительного происхождения, с которыми возможно проводить исследования в культуре *in vitro*, велик. Практически любая часть растения может стать донором первичного экспланта.

Наиболее легкими объектами для культивирования являются двудольные травянистые растения, затем следуют однодольные травянистые виды и зерновые культуры. Труднее создать оптимальные условия культивирования, обеспечивающие дифференциацию клеток и поддержание их длительное время в активном состоянии, для древесных растений и особенно для голосеменных. Это связано, прежде всего, с особенностями физиологических процессов, например повышенным синтезом фенольных соединений и локализацией их в клетках растений, которые ингибируют процессы морфогенеза *in vitro* изолированных эксплантов. Кроме того, древесные растения характеризуются медленным ростом в условиях *in vivo*, что закономерно проявляется и в условиях *in vitro*. Древесные растений по мере старения теряют способность к морфогенезу. Перечисленные выше особенности в большей степени относятся к хвойным породам, возраст которых превышает 15 лет.

Основными объектами исследований *in vitro* являются интактные растения, изолированные органы (сегменты гипокотилия, стебля, семядольных листьев, корня), специфические органы (изолированные репродуктивные органы), изолированные пазушные и верхушечные почки, меристема, изолированные протопласты, а также калусная ткань.

При работе с клетками, тканями и изолированными органами растений в условиях *in vitro* в зависимости от поставленной цели исследований, а также минерального и гормонального состава питательной среды можно наблюдать различные морфогенетические реакции изолированных эксплантов (рис. 1.8).



Рис. 1.8. Реализация морфогенетического потенциала культивируемых клеток, тканей и органов растений *in vitro*

Как показали исследования, проще всего реализовать морфогенетический потенциал всех культивируемых объектов через индукцию формирования калусной ткани. При этом необходимо создать

определенные условия культивирования, в частности правильно подобрать гормональный состав питательной среды. Экспериментально установлено, что культивирование клеток на среде с ауксином и цитокинином (первый преобладает по концентрации над вторым) приводит к делению клеток и началу каллусогенеза.

Основные факторы, определяющие эффективность каллусогенеза и морфогенеза, следующие:

- 1) генотип исходного растения;
- 2) тип первичного экспланта;
- 3) условия культивирования.

Каллусная ткань сегодня является одним из интереснейших объектов как для фундаментальных исследований, так и для прикладного использования. Она широко используется, например, для получения веществ вторичного метаболизма; создания новых форм растений путем клеточной селекции и соматической гибридизации; гомозиготных диплоидных растений и др.

Реализация клетками морфогенетического потенциала в направлении индукции образования адвентивных почек или формирования побегов, как правило, применяется при оздоровлении и размножении растений с целью сохранения биоразнообразия растительного мира. Это направление исследований имеет не только научное, но и все шире приобретает в последнее время коммерческое значение.

Таким образом, изолированные клетки, ткани и органы растений при культивировании их в условиях *in vitro* могут по-разному реализовывать свой морфогенетический потенциал, которым возможно управлять путем изменения условий культивирования.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое первичный эксплант? Что может служить первичным эксплантом?
2. Какие вы знаете объекты исследований, используемые в клеточной инженерии растений?
3. Как может реализовываться морфогенетический потенциал клеток, тканей и изолированных органов в условиях *in vitro*?
4. Какие вы знаете методы исследований?
5. Каким способом получают стерильную питательную среду и необходимые для работы соответствующие материалы?
6. Назовите основные компоненты питательной среды.
7. Что вы знаете о стерилизующих агентах? Приведите примеры.
8. Какая существует зависимость между типом первичного экспланта и временем стерилизации?
9. Какие необходимо создать условия, обеспечивающие нормальный рост культуры изолированных клеток, тканей и органов растений?
10. Назовите объект, наиболее часто используемый в клеточной биотехнологии. Объясните, почему.

Глава 4

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

4.1. Основные этапы развития биотехнологии

Существует неоднозначное мнение среди ученых о начале возникновения биотехнологии. По мнению Ю. Овчинникова, А. Баева, К. Скрыбина, к сфере биотехнологи следует отнести древние процессы брожения, включая получение спирта, а также силосование. По мнению Ш. Аиба, А. Хемфри, Н. Миллис условной датой появления биотехнологии можно считать присуждение компании «Мерк Кемикал Компани» за достижения в области биохимической технологии в 1947 г. премии Мак-Гро — Хилла. В то же время, существует мнение, что начало биотехнологии положено в 1970-х гг., в момент зарождения генетической инженерии. Видимо, правомерно отнести возникновение современной биотехнологии, начавшей свое формирование на базе существующих отраслей микробиологической промышленности, к началу 1950-х гг., а весь предшествующий данному периоду этап называть предысторией формирования биотехнологии, которая начала свое развитие в древнейших цивилизациях.

Человек с давних времен начал использовать в своей хозяйственной деятельности биологические организмы, в частности микроорганизмы, не зная об их существовании. Первым микробиологическим процессом, использованным на практике, было брожение — процесс обмена веществ, при котором в органическом субстрате происходят изменения под воздействием микробных ферментов. Возбудителями бродильных процессов являются грибы, бактерии, дрожжи. Данные организмы легко культивировать, они быстро размножаются в сравнительно простых условиях и синтезируют ферменты, вызывающие разложение органических веществ. С древнейших времен брожение применяли при хлебопечении, пивоварении и виноделии. Так, при раскопках Вавилона обнаружены дощечки, «возраст» которых приблизительно 6000 лет, с описанием процесса приготовления пива, а в пирамидах Египта, построенных в этот же период, — караван хлеба. Существуют сведения об очистных сооружениях, которые функционировали в древнем Риме.

В древности человечество сталкивалось и с отрицательными последствиями деятельности микроорганизмов, например появлением плесени на продуктах, возникновением инфекционных болезней людей и домашнего скота и др. Стали появляться методы и средства борьбы с этими явлениями, которые разрабатывались неосознанно и эмпирически. Такие исследования привели к появлению методов консервирования продуктов.

Во второй половине XV в. стало развиваться современное естествознание. На становление и развитие биологии существенное влияние оказала химия, которая из описательной в этот период превращается в аналитическую. В это время широко изучаются процессы брожения, появляется термин «ферментация». Все это привело к объяснению процесса брожения за счет наличия в среде дрожжей либо ферментов. В XVI—XVII вв. сначала во Франции, а затем и в других странах для разрыхления теста стали использовать пивные дрожжи; позднее с изменением и совершенствованием технологии пивоварения для этих целей стали применять дрожжи спиртовых производств.

Во второй половине XVIII в. была доказана способность одного вещества разрушать (разлагать) другое. Это послужило началом экспериментального изучения уникальной способности ферментов к катализу специфических химических реакций. Таким образом, развитие описательной микробиологии и изучение химических превращений оказались важной предпосылкой для становления микробиологии и биохимии.

В XIX в. возникли основы развития органической химии. Были открыты многие органические кислоты, глицерин, холестерин, глюкоза, первые аминокислоты, осуществлен синтез мочевины. Для зарождения энзимологии большое значение имело изучение процесса гидролиза полисахаридов. Благодаря трудам Л. Пастера в конце XIX в. были созданы условия для дальнейшего развития прикладной (технической) микробиологии, а также в значительной мере — биотехнологии. Пастер установил, что микроорганизмы играют ключевую роль в процессах брожения, и показал, что в образовании отдельных продуктов участвуют разные их виды. Это послужило основой развития в конце XIX — начале XX в. бродильного производства органических растворителей (ацетона, этанола, бутанола, изопропанола) и других химических веществ, где использовались разнообразные виды микроорганизмов. Современник Пастера Т. Г. Гексли, оценивая работы Пастера, говорил, что «...он своими открытиями возместил Франции большую часть контрибуции, уплаченной Германией».

Крупными достижениями данного периода были разработка метода чистых культур, а также усовершенствование сред для выделения и выращивания микроорганизмов. Чистые культуры ста-

ли применять в сложившихся микробиологических производствах. Большое значение имели работы по изучению микробного антагонизма и применению его в медицине. И. Мечников создал учение об антагонизме микробов и научно обосновал рекомендации для практических применений этого учения. В этот период активно изучалась азотфиксация. Немецкие исследователи Н. Гельригель и Х. Вильфарт установили биологическую природу процесса фиксации азота бобовыми растениями, а В. Бейеринк выделил чистую культуру клубеньковых бактерий и доказал их присутствие в ризосфере растений. Тогда же блестящими работами С. Виноградского, В. Омелянского, С. Надсона, А. Исаченко были заложены основы геологической микробиологии; начато изучение роли микроорганизмов в превращениях серы, железа, кальция, грязеобразования. Стали закладываться научные основы биологической обработки и обезвреживания стоков.

Последний период эры предистории современных биотехнологий (1910—1940-е гг.) условно можно подразделить на два этапа. На первом этапе происходило усовершенствование технологии существующих производств, а затем благодаря успехам микробиологии, биохимии и других наук того периода появилась основа для организации новых производств. В этот период стали выпускать новые экологически чистые биоудобрения и биологические препараты для борьбы с вредителями и болезнями сельскохозяйственных растений, возникли производства ряда целевых продуктов (органических растворителей, спиртов), начались промышленные испытания биотехнологических процессов переработки и использования растительных отходов. Второй этап данного периода тесно связан с биотехнологическими методами получения ряда сложных веществ: антибиотиков, ферментов, витаминов.

Основой для производства антибиотиков послужило открытие А. Флемингом, Г. Флори и Э. Чейном химиотерапевтического действия пеницилина. Практически одновременно в Советском Союзе Н. Ермольева показала, что он является фактором естественного иммунитета, а Г. Гаузе и М. Бражникова получили новый активный препарат — антибиотик грамицидин.

После 1945 г. организовали производства аминокислот, белка одноклеточных, превращение стероидов, освоено культивирование клеток животных и растений. Клетки микроорганизмов стали широко использовать для получения лекарственных веществ стероидной природы. В этот период были налажены крупные производства вакцин.

Мировое признание биотехнология получила начиная с 1953 г., после выдающегося открытия Д. Уотсоном и Ф. Криком структуры и пространственной организации двойной спирали ДНК. Возмож-

ности биотехнологии значительно изменились с развитием технологии рекомбинантных ДНК. В 1973 г. американские ученые С. Коэн и Г. Бойер разработали стратегию переноса гена из одного организма в другой. Стало возможным не просто отбирать высокопродуктивные штаммы микроорганизмов и эукариотических клеток, но и создавать принципиально новые виды, используя их в качестве «биологических фабрик» по производству различных продуктов: инсулина, интерферонов, интерлейкинов, гормонов роста, вирусных антигенов и множества других белков. Технология рекомбинантных ДНК позволила получать в промышленных масштабах ценные низкомолекулярные вещества и макромолекулы, которые в естественных условиях образуются в минимальных количествах.

Бурно развивающиеся в настоящее время генетическая и клеточная инженерия способствуют тому, что биотехнологии постепенно завоевывают все новые области производства и решительно проникают во многие сферы деятельности человека. Внедрение методов биотехнологии в различные области народного хозяйства позволяют интенсифицировать производство экологически чистых продуктов, кормовых препаратов, а также решать задачи обеспечения человечества материальными и энергетическими ресурсами и решать экологические проблемы.

4.2. История развития клеточной инженерии растений

Попытки культивировать изолированные с растений ткани проводились с давних времен. Например, еще в 1870—1880-е гг. были заложены основы культивирования растительных клеток и животных тканей. После работ Т. Шванна и Р. Вирхова, назвавших клетку элементарным организмом, возник интерес к изучению живых клеток и начались эксперименты по сохранению жизнеспособности клеток и кусочков тканей в специфических условиях и средах. В истории развития клеточной инженерии растений выделяется несколько этапов.

I этап (1892—1902 гг.) связан с именами таких немецких исследователей, как Г. Хаберландт, Х. Фехтинг, С. Рехингер. Они пытались культивировать в растворе сахарозы различные растительные ткани. Для сегментов цветоносов одуванчика и изолированных почек тополя был получен первичный каллус и определен минимальный размер сегмента, способный к каллусогенезу. Не достигнув положительных результатов, эти исследователи высказали ряд идей и гипотез, которые подтвердились значительно позже. Так, Х. Фехтинг, изучавший полярность, пришел к выводу, что изолированная клетка имеет полярность, как и органы растений. Г. Хаберландт выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой растительной клетки, Ги-

потеза звучала следующим образом: из любой соматической клетки можно получить целое растение, если эту клетку поместить в определенные условия культивирования. В научном мире это высказывание не было воспринято всерьез, и гипотеза была доказана лишь после открытия ауксина (1932) и цитокинина (1955).

II этап (1902—1922 гг.) ознаменовался созданием первых питательных сред для культивирования тканей животных. Эти среды были природного происхождения и содержали, как правило, плазму крови и зародышевую жидкость. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах, содержащих растительные экстракты, оказались неудачными, так как в экспериментах использовались мало подходящие для проявления ростовой активности клетки и ткани высших растений.

III этап (1922—1932 гг.). В этот период независимо друг от друга американский ученый В. Робинс и немецкий ученый В. Котте показали возможность культивирования на твердых питательных средах меристемы кончиков корня томатов и кукурузы. Однако через определенное время растительные ткани бурели и погибали. Подлинное развитие метода культуры растительных тканей началось с 1932 г.

IV этап (1932—1940 гг.) связан с именем французского ученого Р. Готре, который показал возможность долгого культивирования в условиях *in vitro* растительных тканей за счет периодического пересаживания их на свежую питательную среду. Это открытие дало новый толчок в работе по культуре ткани, что привело к нарастанию числа новых объектов, успешно введенных в культуру.

V этап (1940—1960 гг.). С открытием в 1955 г. нового класса фитогормонов — цитокининов, в частности кинетина, была получена возможность стимулировать деление клеток ткани сердцевинной паренхимы табака, лишенной проводящих пучков и камбия. Эти исследования были проведены Тран Тан Ван. Показано, что, изменяя гормональный состав питательной среды, можно было усиливать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез. Например, клетки сердцевинной паренхимы, помещенные на питательную среду с ИУК, но без добавления цитокинина, не были способны к делению; на средах с присутствием ИУК и кинетина в равных соотношениях наблюдался процесс каллусогенеза; на средах, в которых цитокинин преобладал над ауксином, на первичном экспланте можно было индуцировать образование адвентивных почек. Если же ауксин преобладал в питательной среде над цитокинином, то можно было индуцировать процесс ризогенеза. В этот период было оценено положительное действие натуральных экстрактов типа эндосперма кокосового ореха, каштана, кукурузы и других растений для поддержания неорганизованного клеточного роста и стимуляции процессов морфогенеза

в культуре каллусных тканей. Были разработаны методы получения и выращивания клеточных суспензий, а также культивирования одиночных клеток, деление которых было индуцировано с помощью ткани-«няньки». Данный метод был предложен российскими учеными М. Павловой и Р. Бутенко.

В 1957 г. Ф. Стевардом, изучавший биологию клеток *in vitro*, обнаружил нестандартную ответную реакцию клеток суспензионной культуры моркови на гормональный состав питательной среды — образование биполярных структур. Это явление получило название соматического эмбриогенеза. В своем развитии соматические зародыши проходят четыре стадии развития: глобулярную, сердцевидную, торпедовидную, соматического зародыша.

Более 140 видов высших растений было введено в культуру *in vitro*, для них разрабатывались специфические питательные среды, различающиеся по минеральному составу, наличию или отсутствию витаминов и стимуляторов роста.

VI этап (1960—1975 гг.). Наиболее важным событием этого периода была разработка профессором Ноттингемского университета (Англия) Е. Кокингом метода получения ферментативным путем изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивирования их в контролируемых условиях. Позже, в 1970 г., в той же лаборатории С. Пауэр и сотрудниками осуществили искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию соматических гибридов. В этот же период был разработан метод клонального микроразмножения растений в условиях *in vitro* с использованием меристемной культуры. Основоположником данного направления исследований стал французский ученый Ж. Морель, который получил оздоровленный посадочный материал орхидей и картофеля.

VII этап (1975 г. — настоящее время). Продолжается быстрое развитие техники *in vitro*, изучение биологии культивируемых объектов, разрабатываются методы электрослияния изолированных протопластов, методы мутагенеза и клеточной селекции, методы получения гаплоидных растений, совершенствуется метод глубинного культивирования клеток с использованием изолированных протопластов и векторов, созданных на основе Ti- и Ri-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*. С помощью методов генной инженерии разработан эффективный метод переноса генов для двудольных растений.

Таким образом, за последние десятилетия был сделан большой шаг вперед в развитии технических приемов работы с изолированными тканями и клетками растений. Объектом исследования, как правило, служили однодольные и двудольные травянистые растения и в редких случаях — древесные.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие науки внесли большой вклад в развитие биотехнологии?
2. Перечислите основные вехи развития биотехнологии.
3. Какие продукты получают методами биотехнологии?
4. Перечислите приоритетные для народного хозяйства направления биотехнологии.
5. Какие первоочередные задачи стоят перед биотехнологами?
6. Назовите основные исторические вехи развития клеточной биотехнологии.
7. Что вы знаете о развитии клеточной биотехнологии в России?

Ситуационные задачи

1. Рассчитайте навеску каждого компонента питательной среды для приготовления 1 л маточного раствора среды Гресхофф и Доу, если известны концентрации водных или безводных форм этих солей по прописи (для приготовления 1 л питательной среды необходимо брать 25 мл маточного раствора макросолей) (табл. 1.3).

Таблица 1.3

Расчеты для приготовления маточных растворов по прописи Гресхофф — Доу

Компоненты питательной среды	Концентрация солей в 1 л питательной среды	Навеска	Количество маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды
<i>Макросоли, мг на 1 л маточного раствора</i>			
KNO_3	1000		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250		25
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	200		
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	90		

2. Рассчитайте навеску каждого компонента питательной среды для приготовления 100 мл маточного раствора среды Гресхофф и Доу, если известны концентрации водных или безводных форм этих солей по прописи (для приготовления 1 л питательной среды необходимо брать 5 мл маточного раствора микросолей) (табл. 1.4).

Таблица 1.4

Расчеты для приготовления маточных растворов по прописи Гресхофф — Доу

Компоненты питательной среды	Концентрация солей в 1 л питательной среды	Навеска	Количество маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды
<i>Микросоли, мг на 100 мл маточного раствора</i>			
H_3BO_3	3,0		
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10,0		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,0		
KI	0,75		5
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25		
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,25		
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25		

3. Рассчитайте навеску каждого компонента питательной среды для приготовления 100 мл маточного раствора среды Гресхофф и Доу, если известны концентрации водных или безводных форм этих солей по прописи (для приготовления 1 л питательной среды необходимо брать 2,5 мл маточного раствора хелата железа) (табл. 1.5).

Таблица 1.5

Расчеты для приготовления маточных растворов по прописи Гресхофф — Доу

Компоненты питательной среды	Концентрация солей в 1 л питательной среды	Навеска	Количество маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды
<i>Хелат железа, мг на 100 мл маточного раствора</i>			
Na ₂ ЭДТА	37,3		
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8		2,5

4. Рассчитайте, какой объем маточного раствора препарата Дропп необходимо добавить в питательную среду, если концентрация маточного раствора этого препарата составляет 0,1 мг/мл, а концентрация препарата Дропп в среде должна составлять 0,01 мг/л. Вам необходимо приготовить 500 мл питательной среды.

5. Рассчитайте, какой объем маточного раствора фитогормона ИУК необходимо добавить в питательную среду, если концентрация маточного раствора этого гормона составляет 1,0 мг/мл, а концентрация ИУК в среде должна составлять 0,1 мг/л. Вам необходимо приготовить 250 мл питательной среды.

6. Рассчитайте, какой объем маточного раствора витамина пиридоксина (В₆) необходимо добавить в питательную среду, если концентрация маточного раствора этого витамина составляет 1,0 мг/мл, а концентрация пиридоксина в среде должна составлять 10,0 мг/л. Вам необходимо приготовить 1350 мл питательной среды.

7. Рассчитайте, какую навеску CaCl₂ необходимо взвесить для приготовления 2000 мл питательной среды, если CaCl₂·2H₂O нужно взять 440 мг/л.

8. Рассчитайте, какую навеску NH₄NO₃·3H₂O необходимо взвесить для приготовления 1300 мл питательной среды, если NH₄NO₃ нужно взять 2500 мг/л.

9. Известно, что для получения стерильной питательной среды необходимо применять автоклавирование, которое проводят в оптимальных режимах — 20 мин при давлении 1 атм. Как вы думаете, к чему приведет автоклавирование питательной среды при давлении 1 атм в течение 40 мин; 10 мин; 60 мин?

10. Какие способы стерилизации металлических инструментов и лабораторной посуды применяют для работы в ламинар-боксе?

Какой из перечисленных вами способов является оптимальным для стерилизации: металлических инструментов, лабораторной посуды, матрасиков, наконечников для автоматической пипетки, воды и др.

11. Какие стерилизующие агенты и временные экспозиции применяют для стерилизации растительного материала? Какие стерилизующий агент и время экспозиции из перечисленных вами являются оптимальными для стерилизации семян, бутонов, листьев, корней, почек и др.

12. Для стерилизации листьев хризантемы применили следующую схему ступенчатой стерилизации: 1) промывка листьев под проточной водой в течение 5 мин; 2) выдерживание листьев в 75%-ном растворе спирта 2 мин; 3) обработка листьев 10%-ным раствором пероксида водорода 2 мин; 4) выдерживание листьев в 0,1%-ном растворе сулемы в течение 5 мин; 5) промывка в трех порциях стерильной дистиллированной воды. Допущена ли в данной схеме стерилизации ошибка? Если да, то найдите и объясните ее.

13. Перед началом работы необходимо включить ультрафиолетовый (УФ) свет в ламинарной комнате, ламинар-боксе, в котором находятся все необходимые инструменты, вода и растительный материал для культивирования. Допущена ли в данной схеме работы ошибка? Если да, то найдите и объясните ее.

14. Для активации морфогенетических процессов в состав питательной среды входят регуляторы роста (РР), которые можно добавлять в среду двумя способами: холодной и горячей стерилизацией. Выберите для разных гормонов правильный способ стерилизации.

15. Как отличить внутреннюю инфекцию от внешней после введения первичных эксплантов в культуру *in vitro*? Перечислите приемы предотвращения проявления данных видов инфекций.

16. Часто после автоклавирования возможно наблюдать, что питательная среда не застывает. Перечислите причины данного явления.

Лабораторный практикум

Работа 1. Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений

Объяснение. Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы: азот, фосфор, калий, кальций, серу, магний, железо; микроэлементы: бор, цинк, медь, марганец и др., а также витамины, углеводы, фитогормоны или их синтетические аналоги. Некоторые питательные среды включают гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав питательных сред входит этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) или ее натриевая соль (трилон Б), которые улучшают доступность железа для клеток в широких пределах pH.

Углеводы являются незаменимыми компонентами питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей, так как в большинстве случаев последние неспособны к автотрофному питанию. Чаще всего в качестве источника углерода используют сахарозу или глюкозу в концентрациях 2—4 %. Полисахариды, как правило, не применяются, но поскольку некоторые ткани, например опухолевые, содержат активные гидролитические ферменты (амилазу и др.), они могут расти на средах с растворимым крахмалом.

Фитогормоны необходимы для дедифференцировки клеток и индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны обязательно входить ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление дедифференцированных клеток. В случае индукции стеблевого морфогенеза содержание ауксинов может быть снижено или же они могут быть полностью исключены. На безгормональной среде растут опухолевые и «привыкшие» ткани. Автономность по отношению к обоим гормонам или к одному из них связана со способностью этих клеток продуцировать гормоны.

В качестве источников ауксинов в питательных средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), ИУК, α -нафтилуксусную кислоту (НУК). ИУК почти в 30 раз менее активна, чем 2,4-Д. Для индукции каллуса обычно необходимы высокие концентрации ауксинов (чаще это 2,4-Д), при последующих пересадках их уменьшают.

В качестве источников цитокининов в питательных средах используют кинетин, 6-бензиламинопурин (6-БАП), 2-изопентениладенин (2iP), зеатин. 6-БАП и зеатин по сравнению с кинетином более активны в отношении поддержания роста изолированных тканей и индукции органогенеза. В состав некоторых питательных сред входит аденин.

Кроме веществ ауксинового и цитокининового типа действия в отдельные питательные среды включают гибберелловую кислоту (ГК), присутствие которой в среде не является обязательным, но в некоторых случаях она стимулирует рост изолированной ткани.

Для индукции первичного каллуса и реже для поддержания его пролиферативной активности в состав питательной среды иногда входят растительные экстракты или соки. Наибольшей ростактивирующей способностью обладает кокосовое молоко — жидкий эндосперм кокосового ореха.

Для приготовления твердых питательных сред используют агар-агар — полисахарид, получаемый из морских водорослей. Наименьшее количество нежелательных примесей содержит бактериальный агар (*Bacto Agar* или агар отечественного производства). Обычно концентрация агара в среде составляет 0,7 %.

С целью рационального использования времени растворы макро- и микросолей, витаминов и фитогормонов готовят более концентрированными, что позволяет многократно их использовать. Концентрированные (маточные) растворы хранят в холодильнике (причем для хранения растворов витаминов нужна отрицательная температура).

Для культивирования клеток, тканей и органов растений используют питательные среды различного состава. Наиболее широко применяются среды Мурасиге — Скуга (МС), Уайта, Гамборга (В₅).

Материалы и оборудование: стаканы химические на 1 л (4 шт.), мерные цилиндры на 500 мл и 1 л (2 шт.), колбы с притертыми пробками для хранения маточных растворов (на 1 л — 3 шт., на 100 мл — 1 шт.), флаконы из-под пеницилина (10 шт.), мерные пипетки на 10 и 1 мл, весы технические, весы торсионные или аналитические, электроплитка, химические реактивы.

Ход работы. Приготавливают питательную среду МС.

Маточные растворы солей готовят на дистиллированной воде. Каждую из макросолей растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, а затем сливают и объем доводят до 1 л, причем раствор $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ вливают последним без нагревания в охлажденную смесь, что предотвращает выпадение осадка. Соль $CaCl_2$ готовят и хранят отдельно. Хелат железа (раствор $FeSO_4$ и Na_2EDTA), готовят при нагревании и хранят отдельно. Каждую соль микроэлементов также растворяют отдельно и сливают в общий стаканчик, а объем доводят до 100 мл. Полученные растворы макро- и микроэлементов

сливают в колбы с притертой пробкой (хелат железа — в темную колбу), наклеивают этикетку и помещают в холодильник.

Для приготовления концентрированных растворов витаминов берут 10-кратные навески и растворяют их (каждый витамин по отдельности) в 10 мл воды; 1 мл содержит концентрацию витамина, необходимую для приготовления 1 л раствора по прописи МС. Хранят растворы во флакончиках из-под пенициллина в замороженном состоянии.

Растворы фитогормонов готовят следующим образом: берут 10 мг вещества, ауксины (2,4-Д, ИУК, НУК) растворяют в 0,5—2,0 мл этанола, цитокинины (кинетин, зеатин, БАП, 2iP) — в небольшом количестве 0,5 н. HCl или KOH, абсцизовую кислоту (АБК) — в 70%-ном этаноле. Затем растворы подогревают (кроме АБК) и доливают водой до объема 100 мл (1 мл содержит 1 мг гормона). В холодильнике их можно хранить при температуре 4 °С не более 1 месяца. На основе маточных растворов готовят питательную среду МС, которая будет использована в дальнейших работах.

Приготовление питательной среды: в химический стакан емкостью 1 л помещают 30 г сахарозы, доливают дистиллированной водой примерно до 400 мл и после растворения сахарозы вносят необходимые количества маточных растворов макросолей, микросолей (табл. 1.6), витаминов и гормонов, после чего проверяют pH раствора. Если pH превышает 5,5—5,6, то в питательную среду вносят 0,1%-ный раствор HCl. Одновременно в другом стакане нагревают предварительно замоченный для набухания агар-агар, осторожно помешивая до полного растворения. Его сливают с приготовленными растворами и доводят объем до 1 л.

Таблица 1.6

Расчеты для приготовления маточных растворов по МС

Компоненты питательной среды	Навеска	Количество маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды
Макросоли, г на 1 л маточного раствора		
KNO ₃	38	50
NH ₄ NO ₃	33	
KH ₂ PO ₄	3,4	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,4	5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	8,8	
Микросоли, мг на 100 мл маточного раствора		
H ₃ BO ₃	620	
MnSO ₄ ·2H ₂ O	2230	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860	

Компоненты питательной среды	Навеска	Количество маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды
KI	83	1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5	
CoCl ₂ ·6H ₂ O	2,5	
<i>Хелат железа, мг на 100 мл маточного раствора</i>		
FeSO ₄	557	
Na ₂ ЭДТА	745	5

Приготовленную питательную среду разливают в пробирки, стеклянные банки или колбы (примерно на 1/3 объема), закрывают ватными пробками или алюминиевой фольгой и стерилизуют в автоклаве.

Работа 2. Методы стерилизации растительных объектов и оборудования при проведении работ с культурой изолированных клеток и тканей растений

Объяснение. При работе в условиях *in vitro* необходимо соблюдать строгую стерильность. Это связано с тем, что в состав питательной среды входят такие элементы, как азот, витамины, сахароза и др., которые способствуют быстрому появлению и размножению микроорганизмов. Поэтому все исследования необходимо проводить в контролируемых условиях, стерильных помещениях и в ламинар-боксах.

Стерилизация ламинар-бокса осуществляется путем включения УФ лампы за 15—20 мин до начала работы, после чего рабочую поверхность стола протирают 96%-ным спиртом и вносят все необходимое для работы.

Стерилизация посуды осуществляется путем автоклавирования или обработкой горячим воздухом в условиях сушильного шкафа (160 °С в течение 2 ч). Перед стерилизацией посуду тщательно моют, ополаскивают дистиллированной водой, высушивают и после этого заворачивают в крафт-бумагу или фольгу.

Стерилизацию инструментов осуществляют путем обработки горячим воздухом в сушильном шкафу (160 °С в течение 2 ч), предварительно завернув в крафт-бумагу или фольгу. Перед началом работы инструменты в условиях ламинар-бокса извлекают из оберточного материала и помещают в стаканчик со спиртом. После этого инструменты обжигают в пламени спиртовки и помещают на матрасик. Перед повторным использованием инструментов их следует снова простерилизовать спиртом и обжечь.

Стерилизация материалов. Вату, марлю, ватные пробки, бумажные матрасики, фильтровальную бумагу, халаты, косынки стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм в течение 25—30 мин.

Стерилизация растительного материала. Для стерилизации семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют следующие растворы; 0,1%-ный сулемы (двухлористая ртуть), 0,1%-ный диацид, 13—20%-ный пероксида водорода, 10%-ный хлорамина, 8%-ный гипохлорита натрия или кальция.

Стерилизация питательных сред. Разлитые в пробирки или стеклянные колбы питательные среды закрывают ватными пробками или фольгой, завертывают в целлофан и автоклавируют при температуре 120° и давлении 1 атм в течение 20 мин.

Холодная стерилизация. Органические жидкости, не поддающиеся термической обработки, гормоны освобождают от бактерий путем пропускания их через стерильные мелкопористые бактериальные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм.

Материалы и оборудование: чашки Петри (10 шт., одна — с фильтровальной бумагой), стаканы химические на 300—500 мл (4 шт.), колба на 1 л с дистиллированной водой, пробирки или колбы с питательной средой МС без гормонов и с гормонами (2,4-Д — 2мг/л, кинетин — 0,2 мг/л), пинцеты, скальпели (4 шт.), целлофан, шпагат, ножницы, крафт-бумага для матрасиков.

Ход работы. Инструменты, посуду и питательные среды, необходимые для проведения работ по клеточной инженерии стерилизуют.

Завернутую в плотную крафт-бумагу стеклянную посуду и инструменты стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при температуре 160 °С. Таким же образом стерилизуют следующий материал: чашки Петри (10 шт.), химические стаканы на 300—500 мл (2 шт.), скальпели и пинцеты.

В автоклаве стерилизуют бумажные матрасики и дистиллированную воду в колбе. Матрасики завертывают в плотную бумагу, а сверху — в целлофан. Для получения стерильной воды в колбу наливают 1/3 часть объема дистиллированной воды, закрывают ватной пробкой или фольгой, а сверху — плотной бумагой и целлофаном. Автоклавируют материалы под давлением 2 атм в течение 30 мин.

Пробирки с питательной средой, закрытые ватными пробками, также стерилизуют в автоклаве в течение 20 мин под давлением 1 атм.

Работа 3. Получение стерильных эксплантов из семян огурца (*Cucumis sativum* L.) и зерновок мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

Объяснение. Получить стерильный материал от селекционных образцов из семян огурца и пшеницы часто бывает довольно трудно, что связано с необходимостью правильного выбора стерилизующего

агента. Наиболее распространены в культуре *in vitro* стерилизаторы, содержащие активный хлор: гипохлориты кальция и натрия в концентрации 35 г/л; стерилизующие растворы, содержащие ртуть – сулема и диацид в концентрации 0,1 %; пероксид водорода в концентрации 10—12 %; антибиотики в концентрации 4—5 мг/л. Как правило, вещество должно обеспечивать наибольший процент неповрежденных тканей под семенной оболочкой, способных к росту и новообразованиям при наименьшем проценте инфекции. Следует подбирать также и длительность стерилизации эксплантов.

Перед стерилизацией семена тщательно промывают на сите теплой проточной водой, затем их помещают в марлевые мешочки, в которые кладут этикетки с указанием номера генотипа, после чего марлевые мешочки вносят в стерильный бокс, где последовательно проводят все операции по стерилизации. Стерильные проростки, полученные из семян, используют в дальнейшей работе для получения: 1) эксплантов верхушечных меристем (огурец); 2) первичного каллуса из тканей листьев, сегментов щитка и изолированных зародышей (пшеница).

Материалы и оборудование: семена огурца и пшеницы (20 шт.), стерильные чашки Петри с 1—2 слоями фильтровальной бумаги, пробирки, колбы на 250 мл со стерильной дистиллированной водой (3 шт.), стерильные пинцеты, ножницы, стерильные марлевые мешочки, 0,1%-ный раствор сулемы, 96%-ный этиловый спирт, стерильные химические стаканы (3 шт.), спиртовка, спички.

Ход работы. Отбирают по 10 семян огурца и пшеницы, помещают в марлевые мешочки и тщательно промывают под проточной водой. В условиях ламинар-бокса марлевые мешочки с семенами погружают в 0,1%-ный раствор сулемы или диацида на 10—15 мин. После этого семена промывают в 3—5 объемах стерильной дистиллированной воды и слегка подсушивают. Пинцетом раскладывают по 10 семян в чашки Петри на 1—2 слоя фильтровальной бумаги и добавляют по 10—15 мл стерильной воды, закрывают крышками и парафилом. Чашки Петри с подготовленным объектом помещают в термостат с 25 °С или на 2—3 суток в климатическую комнату для прорастания. Зарисовывают в рабочей тетради схему процесса стерилизации.

Заполняют таблицу (табл. 1.7) с указанием стерилизующего агента, его концентрации и экспозиции для стерилизации семян огурца и пшеницы.

Таблица 1.7

Методы стерилизации семян *Cucumis sativum* L. и *Triticum aestivum* L.

Метод стерилизации	Стерилизующее вещество	Концентрация, %, мл	Экспозиция, с/мин	Цель
1. Престерилизация				
2. Стерилизация				
3. Постстерилизация				

Работа 4. Получение стерильных проростков

Объяснение. Стерильные проростки выращивают с целью изолирования эксплантов для получения каллусной ткани или прямой регенерации растений. В зависимости от задачи опыта семена проращивают на воде или на агаризованной питательной среде.

Материалы и оборудование: семена подсолнечника, гороха, фасоли и др.; стерильные чашки Петри (1 шт.), стерильная коническая колба на 300—500 мл, дно которой покрыто смоченной водой ватой или фильтровальной бумагой, пробирки с половинной питательной средой МС без гормонов, стерильная вода, стерильные химические стаканы (2 шт.).

Ход работы. Отбирают 10 здоровых, одинаковых по размеру семян, тщательно промывают в мыльном растворе, затем — водопроводной и дистиллированной водой. Помещают в марлевые мешочки и погружают на 1—2 мин в 96%-ный спирт, после чего стерилизуют 0,1%-ным раствором сулемы в течение 15 мин. Затем промывают в стерильной дистиллированной воде, сменяя ее 5—6 раз.

В ламинар-боксе с помощью стерильного пинцета раскладывают 10 семян в стерильную колбу на влажную вату или фильтровальную бумагу; мелкие семена (табак, морковь и т. д.) можно проращивать в чашках Петри на фильтровальной бумаге, обильно смоченной стерильной водой. Для получения стерильных проростков семена проращивают на агаризованной безгормональной питательной среде МС (1/2 нормы). В одну пробирку помещают по одному семени. Пробирки, колбы и чашки Петри с семенами помещают в термостат или световую комнату, где поддерживается температура 25 °С.

Раздел II

КАЛЛУСНАЯ ТКАНЬ — ОСНОВНОЙ ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате изучения учебного материала данного раздела обучающиеся должны:

знать

- способы культивирования и получения каллусной ткани;
- основные характеристики каллусной ткани;
- способы культивирования и получения суспензионной культуры;
- основные характеристики суспензионной культуры;
- морфогенез дедифференцированных клеток и способы его управления;
- факторы, влияющие на соматоклональную изменчивость каллусных клеток;
- технологию выращивания дедифференцированных клеток в ферментерах;
- принцип работы стационарных, полупроточных и проточных ферментеров;
- понятие вторичных веществ;

уметь

- применять на практике дедифференцированные клетки в сельском хозяйстве;
- подбирать условия для культивирования дедифференцированных клеток;
- получать суспензионную культуру и давать ей характеристику;

- получать растения-регенеранты из каллусной ткани;
- управлять процессами морфогенеза;

владеть

• технологиями производства веществ вторичного синтеза в условиях *in vitro*;

• технологиями культивирования и регенерации растений из дедифференцированных клеток.

Глава 5

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ. ПРАКТИЧЕСКОЕ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Образование каллусной ткани связано с неорганизованным делением — *пролиферацией* — недифференцированных клеток, поэтому дедифференцировка лежит в основе формирования каллусной ткани.

У интактных растений дедифференцировки и индукция каллусогенеза происходят при механическом повреждении вследствие образования раневых гормонов (травматиновая кислота). В случае клеточных культур обязательным условием дедифференцировки тканей экспланта интактного растения и формирования каллусной ткани является не только повреждение (поранение), но и присутствие в питательной среде веществ гормональной природы — ауксинов и цитокининов. Именно эти гормоны переводят специализированные клетки интактного растения в дедифференцированное состояние. Кроме того, формирование и пролиферация каллусной ткани в условиях присутствия гормонов является отличительной особенностью этих клеток по сравнению с клетками опухолевой ткани.

Каллусная ткань является основным объектом исследований по клеточной инженерии растений. Это связано, прежде всего, с тем, что такие направления исследований, как клеточная селекция, соматическая гибридизация, клональное микроразмножение, получение веществ вторичного метаболизма и другие направления, предусматривают в своей технологии получение растений-регенерантов именно из каллусной или суспензионной культуры (дедифференцированных клеток).

Культура изолированных тканей обычно бывает представлена каллусными или реже — опухолевыми тканями. *Каллусная культура* — это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т. е. становятся особым образом дифференцированными. Каллус, что означает «мозоль», может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) *in vitro*, так и на растении при поранении.

Известный ученый-ботаник Н. Кренке более 50 лет назад часть своих работ посвятил изучению роли каллусной ткани в целом растении. Он установил, что каллусная ткань выполняет следующие функции в интактном растении:

- защитные (места повреждений);
- запасание питательных веществ (синтез вторичных соединений);
- способность к регенерации утраченных органов (корни, побеги).

5.1. Способы получения каллусной ткани

Каллусную ткань *in vitro* можно получить практически из любой живой ткани растений (рис. 2.1)¹.



Рис. 2.1. Получение культуры каллусной ткани из различных эксплантов: сегментов стебля, корня, листа, лепестков, тычинок и других частей растений

Каллусная ткань *in vitro* в основном бывает белого или желтоватого, реже светло-зеленого цвета. Очень редко она может иметь интенсивную зеленую окраску, как, например, у мандрагоры, а также антоциановые включения (рис. 2.2). Темно-коричневая окраска чаще возникает при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов. Последние окисляются в хиноны. Для избавления от них в питательные среды вносят антиоксиданты.

¹ Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе.

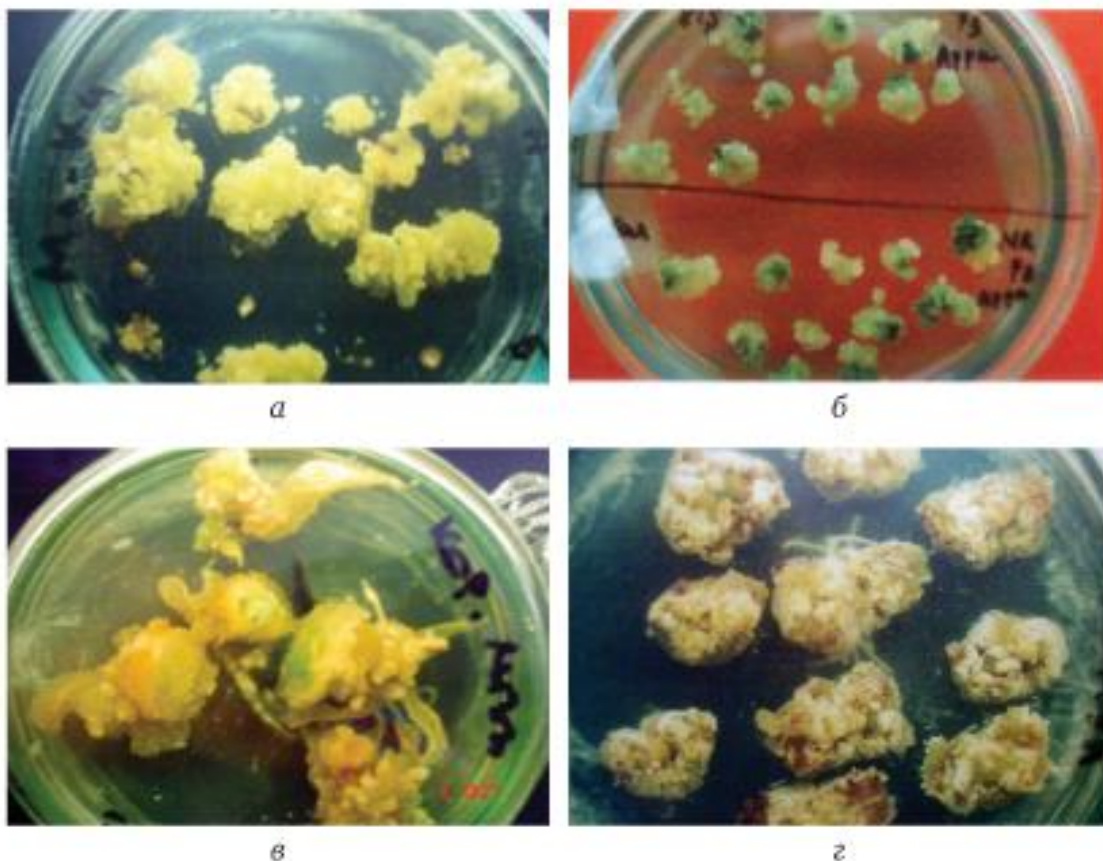


Рис. 2.2. Каллусная ткань, полученная:

- а* — из листьев табака; *б* — незрелых зародышей пшеницы;
в — сегментов гипокотыля стерильных проростков подсолнечника;
г — листовых эксплантов картофеля

Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции. По классификации Р. Г. Бутенко существует три типа каллусной ткани 1) рыхлая, состоящая из сильно оводненных клеток, легко распадающаяся на отдельные мелкие агрегаты; 2) средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами; 3) плотная, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Любой тип плотности каллусной ткани можно превратить в другой. Существует несколько приемов: замена одного ауксина на другой (например, ИУК на 2,4-Д); изменение концентрации ауксина в питательной среде; увеличение или уменьшение концентрации соли хлорида кальция в питательной среде; добавление в питательную среду ферментов (в случае если необходимо получить каллусную ткань рыхлого типа).

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки

клетки, подготавливающий ее к делению, а цитокинины — пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток. Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня (без верхушки) или любой другой растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению. Каждая клетка проходит три фазы роста: 1) деление; 2) растяжение; 3) дифференцировку. Характерной чертой заключительной фазы роста является утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря клеткой способности к делению. Для того чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т. е. клетки как бы возвратились в меристематическое состояние. Размножение дедифференцированных клеток приводит к анархическому, неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки.

У сердцевинной паренхимы табака (СПТ) отсутствие цитокининов в питательной среде блокирует клеточный цикл в премитотическом периоде. Поэтому если в питательной среде присутствует только ауксин, то клетки не делятся и после четырехдневной латентной фазы переходят к росту растяжением. Одни цитокинины без ауксинов приводят к такому же старению тканей СПТ, как и на среде без гормонов. Приведенные данные, полученные для СПТ, не всегда могут объяснить всех случаев, когда каллусная ткань получается на среде с одним гормоном, например, каллусообразование на среде с 2,4-Д без цитокининов у незрелых зародышей пшеницы или получение каллуса на семядолях подсолнечника на среде с цитокининами, но без ауксинов. Установлено, что результаты во многом зависят от эндогенных гормонов, содержащихся в клетках того или иного экспланта, т. е. связаны с особенностями их гормонального статуса.

Имеются новые представления, согласно которым не ауксины и цитокинины, а полисахариды и какие-то другие индукторы вызывают деление клеток, приводящее к образованию каллуса.

Процесс перехода к каллусному росту в базальной части апекса начинается с остановки клеточных делений. Лаг-фаза продолжается 24—48 ч. В течение этого времени клетки увеличиваются в размерах и ткань разрыхляется. После лаг-фазы клетки начинают быстро делиться, образуя каллусную ткань. Таким образом, если дедифференцировка специализированной клетки связана с индукцией деления под влиянием фитогормонов, то дедифференцировка делящейся меристематической клетки связана с остановкой деле-

ний, деспециализацией клетки и только после этого — с индукцией делений, приводящей к калусообразованию.

Эффект, вызываемый действием одних и тех же фитогормонов, может быть различным в зависимости от физиологической характеристики ткани-мишени. Компетентность ее определяется степенью дифференцировки клеток.

5.2. Культивирование калусной ткани в условиях *in vitro*

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям обусловлен изменением активности генов (эпигеномной изменчивостью). Активирование одних генов и репрессирование других приводит к изменению в белковом составе клеток. В калусных клетках появляются специфические белки и одновременно исчезают или уменьшаются в количестве белки, характерные для фотосинтезирующих клеток листа. У двудольных растений процесс репрессии и депрессии генов, лежащий в основе дедифференцировки, происходит легче, чем у однодольных.

При переходе дедифференцированной клетки к неорганизованному анархическому размножению, приводящему к образованию калусной ткани, в клетках происходят биохимические и цитологические изменения. Дедифференцировка начинается с использования запасных веществ и разрушения специализированных клеточных органелл. Через 6—12 ч после индукции дедифференцировки клеточная стенка разрыхляется и разбухает, увеличивается число свободных рибосом, число элементов аппарата Гольджи, а также размеры и число ядрышек. Все эти изменения предшествуют делениям, которые начинаются через 48—72 ч. Следует учитывать, что в клетках экспланта в начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, вызванные как дедифференцировкой, так и травматическими синтезами. Для разделения этих процессов лучше проводить предынкубацию экспланта на безгормональной среде 3—6 сут. Калусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки, включая деление, растяжение и дифференцировку, после чего наступает старение и отмирание клетки. Калусную дифференцировку можно назвать вторичной, но ее не следует путать со вторичной дифференцировкой клетки, лежащей в основе морфогенеза.

Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирания калусных клеток, первичный калус, возникающий на эксплантах, через 4—6 недель переносят на свежую питательную среду. Эту операцию называют *пассированием*. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение десятков лет.

Ростовая кривая каллусных клеток имеет S-образную форму (рис. 2.3).

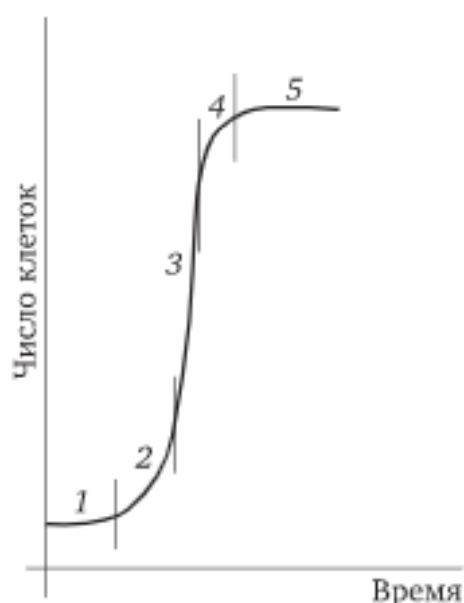


Рис. 2.3. Модельная кривая ростового цикла при периодическом выращивании каллусных тканей. Фазы ростового цикла:

1 — лаг-фаза; 2 — логарифмическая; 3 — линейная; 4 — замедление роста;
5 — стационарная

Такой характер роста легко обнаружить у суспензионных культур каллусных клеток. Кривая роста включает пять фаз. Во время 1-й латентной, или лаг-фазы, увеличения числа или массы клеток не происходит. Клетки в этот период подготавливаются к делениям. Следующая, 2-я фаза — логарифмическая, или экспоненциального роста, — характеризуется наибольшей митотической активностью и увеличением массы каллусной культуры, кроме того, рост происходит с ускорением. 3-я фаза — линейная, в которой скорость роста клеток постоянна. Далее наступает 4-я фаза — замедленного роста, когда митотическая активность клеток резко снижается. В 5-й — стационарной фазе — ростовая кривая выходит на плато. В этот период начинается деградация клеток, однако она еще уравновешивается возрастанием числа клеток за счет их деления; в целом же скорость нарастания клеточной массы равна нулю. После стационарной фазы наступает отмирание (деградация) клеток, во время которой число и масса живых клеток уменьшаются.

5.3. Особенности каллусных клеток

Каллусные клетки *in vitro* сохраняют многие физиолого-биохимические черты, свойственные нормальным клеткам, входящим в состав растительного организма. Каллусные клетки сохраняют

способность к синтезу вторичных метаболитов. Морозостойкость и способность к закаливанию присущи каллусным клеткам, полученным от морозостойких растений. Этим свойством не обладают каллусные ткани, полученные от тропических и субтропических культур. Таким образом, устойчивость к низким температурам сохраняется при переходе клетки к каллусному росту. Каллусным тканям свойственна и фотопериодическая реакция, что связано с сохранением активности фитохрома.

Общим у каллусных и нормальных клеток растения является и еще ряд признаков, в частности устойчивость к действию высоких температур, осмотически активных веществ, засолению.

Вместе с тем каллусные клетки обладают отдельными свойствами, отличающими их от нормальных. В них появляются специфические белки и уменьшается количество белков, характерных для фотосинтезирующих клеток листа, или они совсем исчезают. Каллусные клетки отличаются большой генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью.

В результате выхода из-под контроля организма рост каллусных клеток происходит неорганизованно, асинхронно и является неограниченным. При пересадках на свежую питательную среду культура каллусной ткани моркови, полученная Р. Готре более 60 лет назад, до сих пор растет в коллекции.

Клеточный цикл у каллусных клеток более длительный, чем у растений, произрастающих в открытом грунте.

Особенностью каллусных клеток является гетерогенность по возрасту. В каллусной ткани одновременно присутствуют клетки: молодые в G_1 -фазе; старые — в G_2 - и S-фазах цикла клеточных делений.

Значительные различия наблюдаются в энергетическом обмене каллусных клеток. Они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными клетками. Еще в 1938 г. Р. Рамсгорн обнаружил такую же особенность у меристематических клеток; следовательно, это свойство активно у делящихся клеток. Дыхательный коэффициент (ДК) каллусных клеток больше единицы. Так, в 1988 г. в работах А. В. Романовой было показано, что в каллусе гороха $ДК > 3,5$. Это свидетельствует о сдвиге соотношения между дыханием и брожением в сторону усиления брожения, т. е. о снижении эффекта Пастера¹. Увеличение дыхательного коэффициента при неизменном дыхательном субстрате говорит о том, что дыхание перестает подавлять брожение и даже в присутствии кислорода в каллусных клетках наряду с дыханием идет бескислородное расщепление углеводов — брожение. О бескислородном расщеплении углеводов при неорганизованном росте свидетельствует накопление этилового

¹ Под эффектом Пастера понимают подавление брожения дыханием в присутствии кислорода.

спирта в делящихся клетках. Такие данные получены при индукции неорганизованного роста на интактных проростках гороха.

Митохондрии в каллусных клетках так же, как и в меристематических, являются слабо развитыми, в них мало крист, что не может не оказывать влияния на активность аэробного дыхания.

Наиболее выражено нарушение эффекта Пастера в опухолевых клетках животных. Это явление было обнаружено П. Варбургом, но до настоящего времени не имеет четкой интерпретации. Возникающий вследствие нарушения эффекта Пастера аэробный гликолиз, под которым понимают бескислородное расщепление углеводов в присутствии кислорода, приводит к очень резкому (в 19 раз) усилению потребления углеводов опухолевыми клетками.

Наряду с изменением характера дыхания в каллусных клетках в направлении усиления бескислородного расщепления углеводов происходит также сдвиг в сторону пентозофосфатного пути, который является источником пентоз, необходимых для делящихся клеток.

5.4. Генетика каллусных клеток

Длительное время считали, что каллусные клетки генетически строго однородны. Однако в 1960-х гг. было выяснено, что клетки каллусной ткани обладают выраженной генетической гетерогенностью. Генетическая неоднородность каллусных клеток выражается, прежде всего, в различной ploидности, т. е. каллусные клетки различаются по числу хромосом. Генетически стабильными *in vitro* являются меристематические ткани.

В каллусных и суспензионных культурах встречаются клетки, имеющие диплоидный набор хромосом, свойственный исходному растению, полиплоидные клетки, содержащие три, четыре, пять хромосомных наборов и более. Наряду с полиплоидией в культуре каллусных тканей нередко можно наблюдать анеуплоидию (возрастание или уменьшение хромосомного набора на несколько хромосом). Чем дольше культивируют каллусные клетки, тем больше они различаются по ploидности. В каллусных клетках табака через четыре года культивирования совсем не остается диплоидных клеток: все клетки становятся полиплоидными или анеуплоидными. Этот факт указывает на то, что изменение ploидности происходит под влиянием условий культивирования и прежде всего входящих в состав питательной среды веществ. Однако можно интерпретировать его и иначе. Полиплоидные клетки имеют меньшую лаг-фазу и поэтому быстрее переходят к делениям, чем диплоидные. Вследствие этого они и получают преимущество в дальнейших пассажах. Скорее всего, влияние оказывают обе причины.

Кроме изменения ploидности культивирование клеток и тканей растений *in vitro* вызывает появление в клетках хромосомных aberrаций. Последние сказываются на биологических особенностях культивируемых тканей, изменяя их внешний вид, обмен веществ, скорость роста. Наряду с видимыми под микроскопом хромосомными мутациями в культивируемых клетках могут возникать изменения, не выявляемые микроскопически. Эти изменения могут затрагивать как незначительные участки хромосом, так и структуру генов. Генные мутации выявляются по изменению морфологии и физиолого-биохимических свойств клеток.

Каковы же причины генетической нестабильности культивируемых клеток? Таких причин несколько. Прежде всего — это генетическая неоднородность исходного материала (гетерогенность экспланта). У многих растений дифференцированные ткани характеризуются наличием клеток разной ploидности и лишь активно пролиферирующие в течение онтогенеза ткани, такие, как верхушечные меристемы, камбий и другие, остаются всегда диплоидными. Другой причиной может быть длительное пассирование тканевых и клеточных культур, приводящее к накоплению в них генетических изменений, в том числе к неравномерному изменению ploидности. Нарушение коррелятивных связей при изолировании участков тканей растений и помещении их на питательную среду также приводит к генетической нестабильности клеток. Подобные результаты могут быть связаны и с влиянием на генетический аппарат клетки входящих в состав питательных сред фитогормонов. В качестве гормонов в питательные среды для каллусообразования обязательно входят ауксины и цитокинины. О мутагенном действии этих веществ известно из целого ряда работ. Наиболее активным мутагенным препаратом является 2,4-Д, входящий в состав большинства питательных сред. Цитокинины, в частности кинетин, способствуют полиплоидизации клеток.

Генетическое разнообразие каллусных клеток позволяет использовать их для клеточной селекции на устойчивость к неблагоприятным факторам среды, фитопатогенам и на повышенную продуктивность.

5.5. Гормоннезависимые растительные ткани

Каллусные клетки могут делиться только при наличии гормонов в питательной среде. Однако при длительном культивировании они в ряде случаев могут приобрести способность расти на среде без гормонов, т. е. становятся автономными по отношению к ауксинам и цитокининам. Такие клетки называются «привыкшими». Нередко ткани, образованные «привыкшими» клетками, называют химиче-

скими опухольями. «Привыкшие» ткани, как и опухолевые, в большинстве случаев не способны к нормальной регенерации и образуют лишь тератомы, хотя по некоторым данным из них в отдельных случаях получают нормальные регенеранты.

Следует отметить, что у всех каллусных тканей в процессе культивирования, у некоторых культур уже начиная с четвертого пассажа, заметно снижается, а затем и полностью утрачивается способность к регенерации. Из старых пересадочных культур получить растения-регенеранты не удастся.

Пока нет четкого ответа о причинах «привыкания». Возможно, оно связано с длительным действием на клетки гормонов, поддерживающих их в дедифференцированном или активно пролиферирующем состоянии.

Кроме «привыкших» тканей, представляющих собой химические опухоли, существуют опухоли растительного происхождения, вызванные бактериями, вирусами, а также генетические опухоли, возникающие на межвидовых гибридах различных растений. Наиболее распространенными в природе и представляющими наибольший интерес для исследователей являются корончатые галлы-опухоли, индуцированные у двудольных растений агробактериями (*Agrobacterium tumefaciens*). Часто встречаются еще два вида истинных опухолей у растений — бородатый корень (заболевание, вызываемое *A. rhizogenes*) и стеблевой галл, вызываемый *A. ruby*, сходный с корончатым галлом.

Общим свойством «привыкших» и опухолевых растительных тканей является их гормонезависимость, т. е. способность расти на средах без гормонов. Это основное их отличие от каллусных тканей, для которых присутствие гормонов в питательной среде является необходимым условием дедифференцировки и пролиферации клеток.

В «привыкших» тканях, так же, как и в опухолевых, идет интенсивный синтез собственных гормонов, поэтому они не нуждаются во внесении гормонов в питательные среды.

Внешние гормонезависимые ткани не отличаются от каллусных, основным их отличием является приобретение способности к интенсивному синтезу гормонов. Это свойство является общим как для «привыкших», так и для опухолевых клеток. Однако пути решения этой задачи у них различны. У «привыкших» тканей гормонезависимость достигается в результате изменения активности генов, отвечающих за синтез ферментных белков, участвующих в построении молекул гормонов, а следовательно, отвечающих за синтез гормонов. Таким образом, изменения в данном случае имеют эпигеномный характер, хотя нельзя исключить и возможность мутаций. Для того чтобы ответить на вопрос, являются ли изменения в «привыкших» клетках эпигеномными или генетическими,

можно проверить, сохраняется ли свойство гормоннезависимости в ряду «клетка — растение — клетка». С этой целью необходимо получить регенерацию в «привыкшей» ткани, а затем эксплант от регенерировавшего растения поместить на питательную среду без гормонов или без одного из гормонов. Если в такой среде клетки будут делиться, т. е. окажутся автономными по отношению к гормонам, значит, свойство гормоннезависимости передается по наследству следующим поколениям, а следовательно, оно имеет генетическое происхождение. Если же на безгормональной среде клетки делиться не будут и каллусной ткани не образуют, т. е. гормоннезависимость не наследуется, то это позволяет сделать вывод об эпигеномном характере изменений. Проведенные эксперименты говорят в пользу эпигеномного характера гормоннезависимости в «привыкших» тканях. Однако таким путем можно проверить только те «привыкшие» клетки, которые не утратили способность к регенерации. В то же время подавляющее большинство «привыкших» клеток теряет способность к регенерации, что затрудняет использование предложенного метода для определения характера природы гормоннезависимости.

В опухолевых тканях синтез гормонов связан с переносом в растительную клетку бактериального гена, отвечающего за этот процесс.

В 1940-х гг. В. Браун, ученик Ф. Уайта, показал, что культура ткани корончатогалловой опухоли даже в отсутствие агробактерий, например, после гибели их под воздействием повышенной температуры, сохраняет опухолевые свойства. На искусственной питательной среде без гормонов ткань корончатого галла, лишенная бактерий, продолжала интенсивно пролиферировать. Ткани корончатых галлов содержат более высокие уровни ауксинов, чем нормальные, и продуцируют несколько цитокининов. На основании своих опытов Браун пришел к выводу, что растительные клетки каким-то образом трансформируются (превращаются) в опухолевые после воздействия *Agrobacterium tumefaciens*. Было выдвинуто предположение, что агробактерий вводят в клетки растения фактор *Ti*p (*Tumor inducing principle*), который за 36 ч превращает нормальные клетки в опухолевые. В дальнейшем оказалось, что *Ti*p представляет собой ДНК и находится в большой плазмиде агробактерий (*Ti*-плазида). Онкогенная активность может быть утрачена в результате удаления из бактериальной клетки всей *Ti*-плазмиды или ее определенной части.

В 1977 г. Р. Чилтон с сотрудниками доказали, что опухоли корончатого галла возникают в результате включения определенного фрагмента *Ti*-плазмиды агробактерий в растительную ядерную ДНК.

Таким образом, сегмент *Ti*-плазмиды (*T*-ДНК) интегрируется в хромосому и становится частью наследственного аппарата транс-

формированной (опухолевой) растительной клетки. Интеграция Т-ДНК Ti-плазмиды агробактерий в хромосому растения приводит к появлению опухоли и гормоннезависимому росту опухолевых клеток на искусственных питательных средах. Оба эти явления тесно связаны друг с другом, так как именно гормоннезависимость, являющаяся следствием экспрессии генов, контролирующих синтез ауксинов и цитокининов, приводит к дедифференцировке и пролиферации клеток.

Ti-плазида является природным вектором — переносчиком новых генов в растения. Путь синтеза ауксинов и цитокининов клетками опухолей, индуцированных агробактериями, иной, чем у нормальных и «привыкших» клеток. Он более простой и короткий. С помощью мутагенов стало возможным идентифицировать участки Т-ДНК, контролирующие изменения гормональной активности. Было выяснено, что не один локус, а ряд генов ответственны за опухолевый рост.

Кроме ауксинов и цитокининов Т-ДНК детерминирует синтез галлами нового класса аминокислот, не встречающихся в природе, — опинов. Эти вещества не являются причиной возникновения опухолей: они синтезируются в уже образовавшейся опухолевой ткани. Опухоли начинают синтез опинов в возрасте нескольких дней. Например, на каланхоэ синтез опинов начинается на 7-е сутки с момента индукции опухолей.

Опины — производные аминокислот, различных кетокислот и сахаров. Они являются биологически активными соединениями нового типа, обнаруживаемыми только в тканях корончатых галлов у растений, поэтому их можно рассматривать как биохимические маркеры для клеток корончатых галлов. Опины служат питательным веществом для агробактерий, однако опухоли продолжают продуцировать эти соединения и в стерильных культурах, не содержащих агробактерии. Известно три типа опинов: нопалин, октопин и агропин. Одни штаммы бактерий индуцируют октопинпродуцирующие опухоли, другие — нопалинпродуцирующие.

Итак, первое общее свойство «привыкших» и опухолевых тканей, индуцированных агробактериями, заключается в гормоннезависимости, связанной с приобретением способности интенсивно синтезировать гормоны. В галловых опухолях такая способность возникает в результате переноса чужеродного гена из бактериальной клетки в растительную. В клетках химических опухолей («привыкших» тканях) это же свойство связано, как полагают, с депрессией генов, отвечающих за синтез гормонов, однако оно может быть связано и с мутациями.

Второе общее свойство, которое вытекает из первого, — потеря способности «привыкших» и опухолевых клеток, индуцированных агробактериями, регенерировать фертильные растения. Галловые

опухоли в подавляющем большинстве случаев не способны к регенерации нормального растения. Иногда они образуют тератомы (уродливые органоподобные структуры), которые не могут развиваться нормально.

«Привыкшие» ткани обычно также не регенерируют нормальных растений, их клетки утрачивают способность ко вторичной дифференцировке и морфогенезу. Однако в некоторых случаях, варьируя составы питательных сред, удается отодвинуть порог «привыкания». Следовательно, имеется резерв, использование которого позволит получать растения-регенеранты из все более длительно пассируемых тканевых культур.

Контрольные вопросы и задания

1. Дайте определение каллусной ткани.
2. Какие функции выполняет каллусная ткань в интактном растении?
3. Какие гормоны регулируют процесс каллусогенеза?
4. Назовите типы каллусной ткани. Какие факторы регулируют процесс формирования каллуса разной плотности?
5. Перечислите фазы ростового цикла каллусной ткани.
6. Назовите сходства и различия каллусной и нормальной клетки.
7. Какие причины вызывают появление генетически гетерогенной каллусной ткани?
8. Что вы знаете о гормонезависимых клетках растений?
9. Какими факторами можно регулировать плотность каллусной ткани? Приведите примеры.
10. Как вы понимаете термин «пролиферация каллусной ткани»?

Глава 6

МОРФОГЕНЕЗ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ

Существует несколько путей, по которым может идти развитие клетки после ее дедифференцировки. Первый путь — это вторичная регенерация целого растения, возможна дифференцировка на уровне клеток, тканей, органов. Второй путь — утрата клеткой способности ко вторичной дифференцировке и регенерации растения, стойкая дедифференцировка, приобретение способности расти на среде без гормонов, т. е. превращение в опухолевую. Такими свойствами часто характеризуются клетки старых пересадочных культур. Третий путь — нормальный цикл развития каллусной клетки, заканчивающийся ее старением и отмиранием. В этом случае клетка претерпевает вторичную дифференцировку и прекращает делиться (стационарная фаза роста). Однако такая дифференцировка не ведет к морфогенезу, а закрепляет за ней свойства старой каллусной клетки.

Для сельскохозяйственной биотехнологии наибольший интерес представляет регенерация в культуре тканей из отдельной клетки целого растения. Иногда этот путь лежит через образование отдельных органов.

В культуре каллусных тканей *морфогенезом* называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток. Существует два основных типа морфогенеза (рис. 2.4). В культуре тканей он может проявляться в виде *органогенеза* (образования монополярной структуры, т. е. отдельных органов): корневого, стеблевого, реже флорального (цветочного) или листового, а также в виде *соматического эмбриогенеза* (образования биполярных зародышеподобных структур из соматических клеток). В случае органогенеза сначала регенерируют отдельные органы, а затем уже из них — целые растения, исключение составляет корневой органогенез (рис. 2.5).

В результате соматического эмбриогенеза, в отличие от органогенеза, сразу образуется зародыш, имеющий как меристему корня, так и меристему верхушечной почки, из которого в дальнейшем развивается целое растение.

Способность отдельной соматической клетки полностью реализовывать свою программу развития и давать начало целому растительному организму называют *тотипотентностью растительной*

клетки. Любая растительная клетка обладает одинаковыми потенциальными возможностями, так как содержит весь набор генов и, следовательно, клетки сохраняют свойственную зиготе программу развития. Поэтому если мы получаем каллус из клеток лепестка цветка, или из клеток сердцевинной паренхимы стебля, или из клеток любой ткани, то в принципе каждая такая клетка может регенерировать целое растение. Однако свойство тотипотентности не всегда реализуется, так как потенциальные возможности клеток разных типов проявляются неодинаково. В некоторых из них гены в сильной степени репрессированы, в связи с чем проявление тотипотентности становится ограниченным.



Рис. 2.4. Типы морфогенеза в культуре каллусной ткани

Идею о тотипотентности растительной клетки выдвинул Г. Хаберландт еще в 1902 г., хотя она и не получила тогда экспериментального подтверждения. Согласно определению Г. Хаберландта, любая клетка растения может дать начало новому организму, и если этого не наблюдается, то только потому, что растительный организм подавляет потенции клетки к развитию. Изоляция клеток от растений способствует проявлению этих потенций.

Клеточную основу морфогенеза составляет цитодифференцировка. Регенерация растения начинается со вторичной дифференцировки клеток. При этом дедифференцированные клетки вновь приобретают структуру и функции специализированных.

Вторичная дифференцировка каллусных клеток не всегда заканчивается морфогенезом и регенерацией растения. Иногда она приводит только к образованию тканей (гистодифференцировка). Таким путем каллусная клетка может превращаться во флоэмные или ксилемные элементы. Другим примером вторичной дифференцировки может служить превращение дедифференцированной активно пролиферирующей клетки в старую неделящуюся каллусную клетку (стационарная фаза роста).

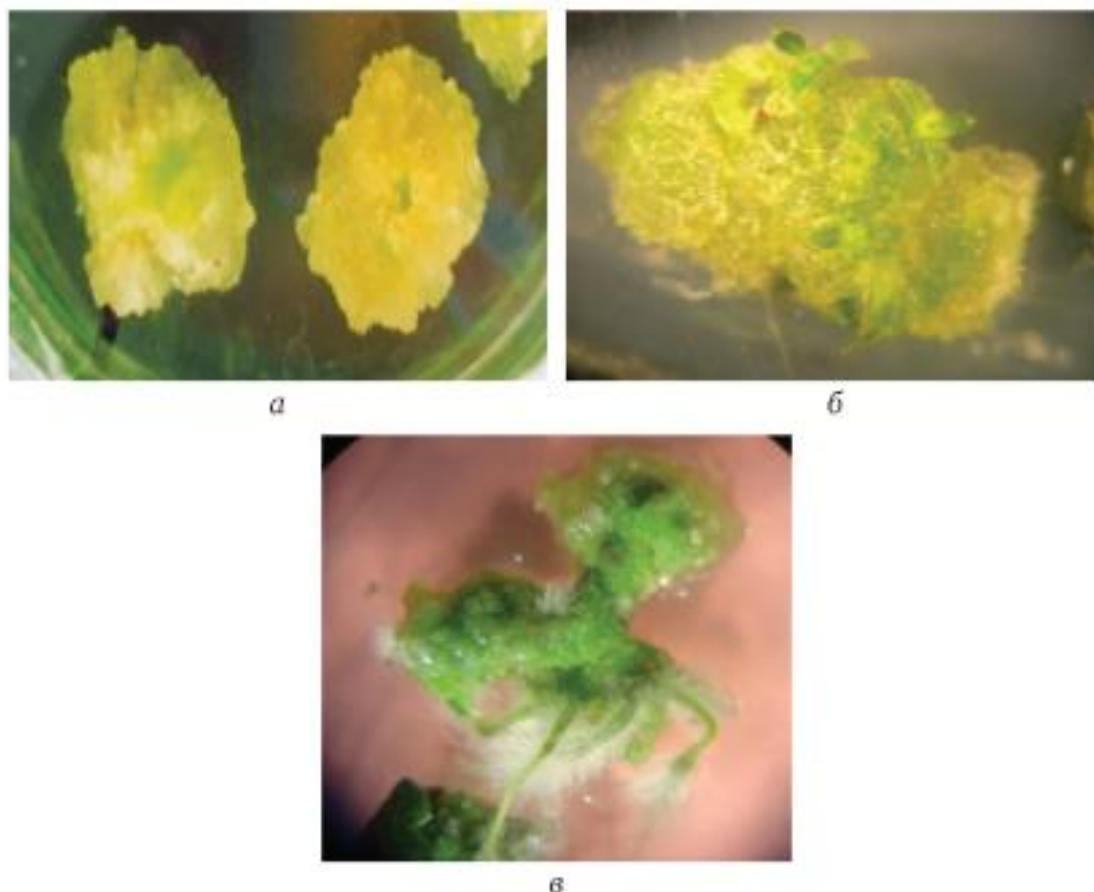


Рис. 2.5. Морфогенетические реакции каллусной ткани:

а — пролиферирующий каллус; *б* — образование адвентивных почек;
в — образование корней (ризогенез)

Из всех видов вторичной дифференцировки наибольший интерес представляет морфогенез, так как он позволяет получать целое растение из каллусной клетки.

В основе дифференцировки и морфогенеза лежит последовательное включение различных генов, т. е. дифференцировка клеток определяется дифференциальной активностью генов. Изменение активности структурных генов может быть связано с их дерепрессией, репрессией или амплификацией (умножением). Большую роль в этом процессе играют фитогормоны.

Таким образом, различия в балансе экзогенных гормонов ауксинового и цитокининового типа определяют, с одной стороны, возможность перехода клетки в культуре к дедифференцировке и неорганизованной пролиферации, а с другой — индукцию вторичной дифференцировки того или иного типа морфогенеза, что было отмечено Ф. Скутом и Е. Миллером в 1957 г. Следовательно, ауксины и цитокинины, вызывающие в зависимости от соотношения либо дедифференцировку и переход к каллусному росту, либо дифференцировку и морфогенез в культуре каллусных тканей, являются не только регуляторами роста, но и регуляторами дифференцировки.

Если органогенез можно индуцировать с помощью ауксинов или цитокининов, то соматический эмбриогенез фактически независим от экзогенных фитогормонов. Обычно эмбриогенные зоны возникают в каллусной ткани на той же питательной среде, которая использовалась для каллусообразования. Развитие соматических зародышей в каллусной ткани начинается тогда, когда устраняется дедифференцирующий фактор из питательной среды (2,4-Д или ауксины). Развивающийся зародыш не нуждается в экзогенных гормонах, так как сам обеспечивает себя ими.

Независимость соматического эмбриогенеза от гормонов является аргументом в пользу точки зрения, высказанной еще Г. Хаберландтом, а позднее — С. Стэвардом, что сам процесс изолирования клетки стимулирует реализацию ее тотипотентности, т. е. переход к морфогенезу. Таким образом, основными стимулами морфогенеза являются изменения соотношения гормонов в питательной среде, а также сам процесс изоляции растительной клетки от организма. Дополнительными стимулами морфогенеза в культуре каллусных тканей является присутствие в питательной среде нитрата серебра, нитрата аммония, некоторых аминокислот (пролин, тирозин, иногда серии), полиаминов (путресцин и спермидин). В ряде случаев стимулируют процесс морфогенеза манит и сорбит. Ионы NO_3^- оказывают влияние на развитие возникших в каллусной ткани организованных структур, а их индукцию стимулируют ионы NH_4^+ . Гибберелловая кислота стимулирует рост зачатков стебля, а абсцизовая — ускоряет дифференцировку органов соматических зародышей.

Интересно отметить, что некоторые из перечисленных веществ, например нитрат серебра, продлевают регенерационную способность в старых пересадочных культурах.

Под влиянием того или иного стимула морфогенеза каллусная клетка должна стать детерминированной, однако не все клетки, а лишь одна из 400—1000 становится на путь регенерации. Следовательно, для перехода к морфогенезу недостаточно индуктора (стимула), а необходимо, чтобы клетка была готова к ответу на него. Способность воспринимать стимулы морфогенеза называют *компетентностью клетки*. Исследователи пришли к выводу, что компетентность клеток — событие случайное и поэтому столь редкое. В связи с этим напрашивается вопрос о судьбе тех каллусных клеток, которые в силу некомпетентности не способны воспринять стимулы морфогенеза и детерминироваться. В пересадочной культуре эти клетки продолжают делиться и, скорее всего, становятся на путь перехода к гормоннезависимости. Однако не все каллусные ткани со временем завершают развитие возникновением гормоннезависимости. Многие из них в силу генетических особенностей продолжают использовать экзогенные гормоны, но полностью утрачивают

способность к регенерации. Такие ткани занимают промежуточное положение между «привычными» и свежими каллусными тканями.

Морфогенез в каллусной ткани начинается с того, что под влиянием соответствующих условий детерминированная клетка обособляется от окружающих ее каллусных клеток, образуя утолщенную клеточную стенку. Это явление было обнаружено в 1972 г. при изучении соматического эмбриогенеза в культуре ткани моркови.

Клетка-инициаль при соматическом эмбриогенезе дает начало зиготе, а при органогенезе — меристематическому очагу. От недетерминированных каллусных клеток инициальная отличается более крупным ядром и меньшими размерами вакуолей. Ядро обычно занимает центральное положение. В инициальных клетках содержатся большие количества запасных веществ: крахмала, иногда — липидов.

Некоторое время инициальные клетки находятся в лаг-фазе, что необходимо для их перестройки и подготовки к последующим быстрым делениям. Затем эти клетки делятся по типу дробления, образуя сферическую массу мелких изодиаметрических клеток. В случае органогенеза эту массу клеток называют меристематическими очагами, а в случае соматического эмбриогенеза — глобулярным проэмбрио. В дальнейшем в меристематическом очаге дифференцируются зачатки стебля, корня, листа или цветочной почки и соответственно происходит стеблевой, корневой, листовой или флоральный, органогенез. В глобулярном проэмбрио развивается биполярная эмбриоидная структура. Можно выделить несколько последовательных стадий формирования соматических эмбриондов из каллусной клетки: глобулярную, сердечка, торпедовидную, соматического зародыша (рис. 2.6). Меристематические очаги или проэмбрио могут возникать на периферии каллусной ткани или быть погруженными в нее. Обычно не наблюдается определенной закономерности в их локализации (рис. 2.7). Исключение составляет стеблевой органогенез в каллусной ткани, полученной из сердцевинной паренхимы табака сорта Висконсин-38. Меристематические очаги здесь всегда локализуются только в нижней части каллусной массы.

При переходе каллусных клеток к морфогенезу происходит существенное изменение их метаболизма. Морфогенезу предшествует появление в клетках белков-антигенов. Работами Р. Г. Бутенко, Н. И. Володарского и Н. А. Моисеевой показано, что морфогенез в культуре каллусных тканей табака характеризуется включением и выключением синтеза определенных белков-маркеров. В меристемах обнаружено два белка-антигена, которые являются маркерами этих клеток. Одновременно показано, что индуцированная детерминация клеток каллусной ткани сопряжена с появлением в ней антигена-маркера клеток меристемы стебля.

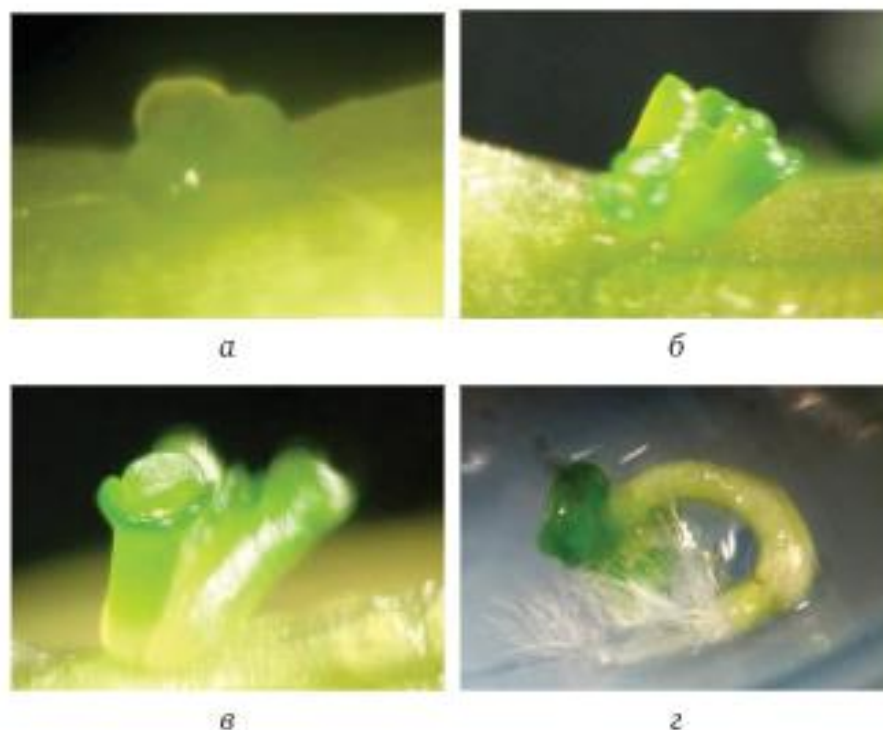


Рис. 2.6. Стадии соматического эмбриогенеза растений рапса *in vitro*:
 а — глобулярная; б — сердечко; в — торпедовидная;
 г — соматический зародыш



Рис. 2.7. Формирование соматических зародышей (глобулярная стадия)
 в пересадочной каллусной ткани ячменя

Белок (гликопротеид), выделенный из эмбриогенных культур, можно рассматривать как кондиционирующий фактор. При частых пересадках на свежую питательную среду, где гликопротеид накапливаться не может, эмбриогенез не идет. Если белок, появляющийся в клетках при переходе к соматическому эмбриогенезу, выделить и ввести в длинные (неэмбриогенные) каллусные клетки, у которых гены морфогенеза не работают или потеряны, то в них индуцируется переход к морфогенезу.

Некоторое время инициальные клетки находятся в лаг-фазе, что необходимо для их перестройки и подготовки к последующим бы-

стрым делениям. Затем эти клетки делятся по типу дробления, образуя сферическую массу мелких изодиаметрических клеток. В случае органогенеза эту массу клеток называют меристематическим очагом, а в случае соматического эмбриогенеза — глобулярным проэмбрио. В дальнейшем в меристематическом очаге дифференцируются зачатки стебля, корня, листа.

Работы по поиску новых маркеров морфогенеза продолжаются. Клетки меристематических очагов и клетки, дающие начало эмбрионным структурам, отличаются от каллусных интенсивным синтезом РНК и ДНК, что связано с особенностями их белкового обмена. Изменения в белковом обмене сходны с теми, которые протекают при дедифференцировке клетки, но итоги у них различны. По мнению Р. Г. Бутенко, специфика реакции определяется не общим усилением синтеза макромолекул, что необходимо для усиленной пролиферации, а теми уникальными синтезами, которые идут на этом общем фоне и обуславливают появление белков регуляторного типа. Переход к морфогенезу в культуре каллусных тканей сопровождается значительными изменениями дыхательного метаболизма. В целом дыхание (по CO_2) усиливается, но изменяется его характер в направлении интенсификации пентозофосфатного пути. Возрастает активность дыхательных ферментов. Вслед за биохимической наступает структурная реорганизация клетки. Биохимическая дифференцировка клетки всегда предшествует структурной. В клетках, вступивших на путь морфогенеза, возрастает число рибосом, митохондрий, меняется их внутренняя структура.

Процессы морфогенеза в каллусных клетках протекают асинхронно и продолжительно. Одновременно в каллусной ткани могут иметься как полностью сформированные структуры, так и клетки, только что вступившие на этот путь.

Повышенная синтетическая активность клеток меристематического очага и глобулярного проэмбрио делает их аттрагирующим центром, в который устремляются питательные вещества. Окружающие каллусные клетки при этом часто разрушаются, и образующиеся эмбриониды легко «выпадают» из массы каллусных клеток.

Каллусные клетки не связаны между собой плазмодесмами или последние сильно редуцированы. При появлении зародышеподобных структур или меристематических очагов между клетками снова восстанавливается связь с помощью плазмодесм.

Все изменения, происходящие при морфогенезе и заканчивающиеся регенерацией из каллусной клетки растения, управляются (контролируются) специальными генами. В настоящее время одни ученые считают, что признак морфогенеза полигенен и контролируется несколькими хромосомами, другие пришли к заключению, что этот признак определяется двумя ядерными генами. Тот факт, что морфогенетическая активность каллусных клеток имеет гене-

тическую природу, объясняет, почему не удастся в ряде случаев получить регенерацию из каллусной ткани тех или иных генотипов. Регенерационную способность может увеличить скрещивание генотипов, морфогенетически активных *in vitro*.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое морфогенез каллусной ткани?
2. Чем отличается монополярная структура от биполярной? Приведите примеры.
3. Какие факторы регулируют процесс морфогенеза?
4. Перечислите стадии соматического эмбриогенеза.
5. Дайте определение тотипотентности.

Глава 7

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА МОРФОГЕНЕЗ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ

Процесс морфогенеза *in vitro* зависит от ряда факторов, главные из которых следующие: физиологические, минеральный состав питательной среды, баланс экзогенных и нативных гормонов, физические, а также присутствие сигнальных белков и белков-акцепторов — условия, обязательные для получения клеток, способных к морфогенезу.

Способность каллусных клеток к формированию монополярных и (или) биполярных структур, главным образом, зависит от видовых и сортовых особенностей исследуемых генотипов, для которых принципиально важно учитывать принадлежность его к однодольным или двудольным растениям, а также тип первичного экспланта. В табл. 2.1¹ представлены различные семейства, растения которых способны к морфогенезу в той или иной степени.

Таблица 2.1

**Перечень семейств высших растений, расположенных по степени снижения
способности к морфогенезу**

Максимальная способность	Пасленовые
↓	Капустные
	Сельдерейные
	Астровые
	Бобовые (травы)
	Бобовые (зерновые)
	Мятликовые (травы)
Минимальная способность	Мятликовые (зерновые)

Материнский эффект при наследовании способности к морфогенезу отмечали ряд авторов. Однако никем не уточнялось, какие именно органеллы (хлоропласты или митохондрии) несут гены, ответственные за регенерационную способность растительных тканей. В работах Ю. И. Долгих показано, что все стерильные линии кукурузы обладали пониженной по сравнению с фертильной формой способностью индуцировать морфогенный каллус. На основании

¹ Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе.

полученных данных было сделано предположение о вероятном участии митохондриальных генов в регуляции процесса морфогенеза¹.

7.1. Физиологические, гормональные и физические факторы

Физиологический возраст первичного экспланта, из которого была получена каллусная ткань, имеет несомненное значение в проявлении способности каллусных клеток к морфогенезу. Установлена прямая корреляция между возрастом первичного экспланта и морфогенезом: чем моложе эксплант, тем большей морфогенетической активностью обладают каллусные клетки. С увеличением возраста исходного материала, как правило, снижается способность каллусной ткани к морфогенезу.

Существенное влияние на реализацию морфогенетического потенциала каллусной ткани оказывает число субкультивирований ее в условиях *in vitro*. С увеличением числа пассажей значительно снижается степень морфогенетической активности каллусных клеток. Особо это проявляется на трудных объектах, таких как пшеница, ячмень, рис, подсолнечник и другие культуры.

Применение экзогенных гормональных препаратов и изменение их соотношения и концентраций является главным фактором, влияющим на морфогенез каллусной ткани. Преобладание содержания ауксина над цитокинином приводит к дифференциации меристематических очагов корня, а преобладание цитокинина над ауксином — меристематических очагов апекса, дающих начало росту адвентивным побегам.

Изучению регуляции морфогенеза экзогенными факторами посвящено много работ, однако молекулярные механизмы эндогенной регуляции почти не исследованы. Учитывая большое значение баланса эндогенных гормонов в определении тотипотентности, можно предположить, что компетентность клеток к морфогенезу в значительной степени обусловлена количеством и соотношением эндогенных регуляторов роста. При сопоставлении уровней гормонов в морфогенных и неморфогенных тканях некоторых видов растений были обнаружены заметные различия. Экспериментально доказано, что в большинстве случаев для морфогенных тканей характерно преобладание цитокининов над ауксинами и невысокий уровень АБК, а для неморфогенных — обратное соотношение².

Из трофических факторов особое внимание необходимо уделять минеральным солям, содержащим азот в нитратной или аммоний-

¹ Долгих Ю. И. Соматоклональная изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы) : дис. ... д-ра биол. наук. М. : ИФР РАН, 2005.

² Там же.

ной форме. Присутствие в питательной среде NH_4^+ необходимо для начала морфогенеза, тогда как для роста и развития дифференцированных морфогенных структур предпочтение по концентрации отдается NO_3^- .

Не только минеральные соли могут регулировать морфогенетические процессы в каллусной ткани, но и добавление в питательную среду аминокислот (тирозин, аспарагин, глютамин), а также нитрата серебра (для ингибирования синтеза этилена) значительно повышает морфогенетическую активность каллусных клеток.

Особое влияние на морфогенез каллусной ткани оказывают стрессовые факторы, такие как воздействие тяжелых металлов, хлорида или сульфата натрия, низкие положительные температуры, низкие концентрации токсинов или культурального фильтрата патогенов. Например, в конце 1960-х гг. в лаборатории академика РАСХН и члена-корреспондента РАН Р. Г. Бутенко Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН на культуре ткани моркови показано стимулирующее действие 0,5 % NaCl на морфогенез и регенерацию растений *in vitro*, что было в дальнейшем подтверждено на каллусной культуре пшеницы. С помощью культуры каллусных клеток риса установлена положительная роль низких положительных температур на морфогенетический потенциал дедифференцированных клеток.

Интенсивность освещения, спектральный состав света, температурный режим, а также другие физические факторы воздействия оказывают особое влияние на морфогенез каллусной ткани. Доказано, что дифференциация адвентивных почек в каллусной ткани происходит при ее культивировании на свету с белым или синим спектральным составом, в то время как при использовании света красного спектрального состава в каллусной ткани дифференцируются меристемы корня. Для большинства растений температурный оптимум составляет 23—25 °С. Однако среди исследуемых растений существуют исключения, например подсолнечник, для которого температурный режим, обеспечивающий морфогенез каллусной ткани находится в пределах 18—22 °С.

Таким образом, чтобы повысить морфогенетический потенциал каллусной ткани, необходимо подбирать индивидуальные условия культивирования для каждого исследуемого генотипа, учитывая при этом их генотипические особенности.

7.2. Управление функциональной активностью растительной клетки когерентным светом

Знание механизмов межклеточных контактов и взаимодействий является необходимым условием понимания важнейших биологических процессов: эмбриогенеза и морфогенеза, дифференцировки

и регенерации растений из дедифференцированных тканей. Особое место среди межклеточных отношений занимают такие, которые происходят на расстоянии сотен и тысяч микрон без посредства молекулярных или ионных сигналов. В литературе за ними закрепилось название «дистанционное (или дистантное) межклеточное взаимодействие» (ДМВ). Носителем информации в этом случае должно выступать поле, однако до сих пор остается неясным, какова его физическая природа и биологические функции.

Экспериментальные исследования показали, что дистанционные взаимодействия живых организмов могут осуществляться посредством чрезвычайно слабых сигналов электромагнитного излучения радио- и оптического диапазонов.

Проблема поля живых организмов, являющаяся на протяжении многих десятилетий предметом острых дискуссий и всестороннего изучения, до сих пор остается неразрешенной. Уже в начале прошлого века стало ясно, что не все взаимодействия биологических систем можно представить в рамках молекулярного или ионного обмена и механических контактов.

В биологическом контексте поле впервые упоминается Г. Шлеманом в 1921 г., но приоритет в создании теории биологического поля, безусловно, принадлежит А. Г. Гурвичу, посвятившему этой проблеме наиболее плодотворные годы своей работы. Он отмечал, что «...идея поля возникает из необходимости признания пространственных взаимоотношений между молекулами, не вытекающих из их ближнедействия»¹. Возможность взаимодействия биосистем без посредства химических или механических сигналов, т. е. в полевой форме, экспериментально показана еще в 1923 г. Было сделано предположение, что между активно делящимися клетками возникает связь посредством так называемого митогенетического излучения.

Реальную физико-химическую основу поле приобретает в работах Н. К. Кольцова. По его мнению, «...активированное (например, путем оплодотворения) яйцо представляет собой силовое поле, разных пунктах которого поддерживается та или иная меняющаяся в процессе развития разница потенциалов»². В процессе развития зародыша «...поле не разрывается, а только осложняется, дифференцируется благодаря установлению межклеточных границ».

Биоэлектрическое поле как фактор формообразования живой материи рассматривали Г. Берр, Ф. Норсроп, Э. Синотт и др. Согласно концепции Г. Бера, в основе биологической организации лежат биопотенциалы, на что, в частности, указывает обнаруженная им взаимосвязь между формой организма и его электрическим по-

¹ Будаговский А. В. Дистанционное межклеточное взаимодействие. М. : НГЛЦ «Техника», 2004.

² Там же.

лем. Однако Г. Беру не удалось ответить, причиной или следствием морфогенетических процессов является это поле.

Исследования 1960—1980-х гг. позволили установить наличие у живых организмов рецепторов и связанных с ними регуляторных систем, чувствительных к различным типам излучений. Была показана способность клеток генерировать электромагнитные излучения. В результате появились объективные основания говорить о биорегуляторной роли эндогенных физических полей. Их природа, механизм генерации и частотный спектр весьма различны: от механических (акустических) колебаний до электромагнитных волн радио- и оптического диапазонов. По мнению С. Э. Шноля (1967), одним из возможных источников акустических волн служат конформационные колебания макромолекул. Разделение и перенос зарядов (электронный и ионный транспорт, донорно-акцепторные переходы и т. д.), лежащие в основе многих жизненно важных процессов, позволяют говорить о клетке как об «электрической машине»¹. В соответствии с законами термодинамики она должна быть чувствительна к электромагнитным полям. А. С. Пресманом в 1968 г. показано, в частности, что электромагнитные поля могут участвовать в передаче биологической информации, выполняя коммуникационные функции как внутри клетки, так и в межклеточном (межорганизменном) взаимодействии².

Межклеточные взаимодействия являются необходимым элементом биологической эволюции. На это указывает универсальность и разнообразие форм их проявления. По принципу организации взаимодействия могут быть близкодействующими и дистанционными. Дистанционная связь между отдельными клетками и целыми организмами может устанавливаться и не полем путем, а посредством выделяемых во внешнюю среду продуктов биологического синтеза. Молекулы, выполняющие сигнальные функции, как правило, имеют высокую подвижность и низкий порог рецепции. Гормоны, локальные химические медиаторы, антитела животных осуществляют коммуникационные функции на расстояниях от долей миллиметров до нескольких метров, распространяясь в ничтожно малых концентрациях³. Для растений характерны такие летучие метаболиты, как этан, этилен, фитонциды, терпены, с помощью которых быстро на незначительном удалении устанавливается опосредованная (дистанционная) связь между различными организмами.

Главная особенность живых организмов заключается в том, что они являются открытыми системами, позволяющими им обмениваться с окружающей средой энергией, веществом и информаци-

¹ Сент-Дьерди А. Биозлектроника. М. : Мир, 1971.

² Будаговский А. В. Дистанционное межклеточное взаимодействие. М. : НПЛЦ «Техника», 2004.

³ Албертс Б. [и др.]. Молекулярная биология клетки. В 3 т. М. : Мир, 1994.

ей¹. Живая клетка подчиняется второму закону термодинамики, в ней последовательно возрастает энтропия и происходит «разупорядочение» структуры. Однако особенностью живых систем по сравнению с неживыми системами является минимальная скорость возрастания у них энтропии. Способность клетки сохранять свою структуру обеспечивается за счет непрерывного потребления энергии. Обмен информацией происходит через восприятие клеткой сигналов от внешних раздражителей. Возникающее в клетке возбуждение приводит к изменению ее функциональной активности, о происходящих изменениях клетка посылает сигналы в окружающую среду².

Регуляторная система растения складывается из генетического аппарата, ферментативных систем, фитогормонов, клеточных мембран, межклеточных связей, ионов и биологических часов. Эти системы обладают большой чувствительностью («раздражимостью») к химическим и физическим воздействиям вследствие нековалентных слабых связей (водородных, гидрофобных, электростатических), образующих вторичные, третичные и четвертичные конформации белков, нуклеиновых кислот, нуклеопротеидов, их комплексов с липидами, углеводами, ионами и фитогормонами. Слабые связи принимают участие в организации и функционировании клеточных мембран, органелл и ферментных систем.

Исследования, проведенные в Институте биофизики клетки и Институте проблем передачи информации РАН было показано³, что увеличить внутриклеточную концентрацию эндогенных гормонов можно при воздействии ряда физических факторов: слабых электромагнитных излучений определенных частот, электроимпульсов и УФ света на молекулы ДНК, РНК, рецепторы, мембраны, клеточную энергетику митохондрий и хлоропластов. Авторами показана роль слабого досвечивания (5 Вт/м^2 ФАР), удлиняющего световой день, как индуктора хода накопления биомассы при 10-часовом периоде интенсивного освещения растений кукурузы.

Известная форма живого вещества в клетке — белково-нуклеиновая — не единственная, есть еще и полевые формы. Излучения, происходящие в химической машине клетки, принято называть биополем. Управление растительным организмом путем адресного

¹ Вернадский В. И. Живое вещество и биосфера // РАН, Комис. по разраб. науч. наслед. акад. В. И. Вернадского ; Ин-т геохим. и аналит. хим. М. : Наука, 1994 ; Свентицкий И. И. Принципы энергосбережения в АПК. Естественнонаучная методология. М. : ВИЭСХ, 2001.

² Ковалев В. М., Калашникова Е. А., Белов Д. В. Эффект «сверхмалых» доз (СМД): теория и практика. М. : МСХА, 2005.

³ Кожокару А. Ф. Механизм энергоинформационного воздействия ЭМИ слабой интенсивности // Проблемы электромагнитной безопасности человека. Фундаментальные и прикладные исследования: Тез. докл. 1-й Российской конференции. М., 1996. С. 21—22.

воздействия сигналами химической природы и нетрадиционными физическими полями определенной структуры и свойства по существу относятся к разряду информационных технологий. Высокоэффективное влияние крайне низких концентраций химических веществ (гормоны и гормоноподобные препараты) и сверхслабых излучений связывают с индукцией физиолого-биохимических процессов, обуславливающей фенотипическую активацию продуктивности и устойчивости растений.

Известно, что внутри- и межклеточные системы регуляции процессов функционируют во взаимодействии, которое организовано в виде регуляторных контуров. Одной из функций этих контуров является восприятие рецепторами первичных сигналов (гормон, элиситор, физический фактор) и преобразование их в сигналы второго порядка, индуцирующие экспрессию генов и активацию физиолого-биохимических процессов. По данным современных исследований, к числу таких сигнальных систем относится липоксигеназная система. В процессе функционирования липоксигеназного метаболического каскада принимает участие несколько автокаталитических реакций, способных значительно усиливать исходный слабый сигнал.

За последнее время для практики предложено несколько десятков различных способов воздействия физическими факторами на семена, интактные растения, а также на изолированные клетки и ткани растения для активации биологических процессов и повышения морфогенетической активности. Они основываются на том, что большая часть физиологических процессов, происходящих в живом организме, сопровождается электромагнитными явлениями. Постоянной составляющей электромагнитных колебаний в растительном организме являются биоэлектрические потенциалы, которые генерируются в процессе жизнедеятельности и отражают его физиологическое состояние.

Исследования П. П. Гаряева показали, что хромосомы излучают свет в видимом диапазоне¹. С помощью света, многократно отраженного от мембран, ядро управляет процессами жизнедеятельности клетки. Затем свет выходит за ее пределы и передает информацию другим клеткам. Воспринимая свет, хромосомы управляют своей живой системой. Таким образом, живые организмы и их клетки являются генераторами энергии и в то же время — бесчисленными приемниками излучений.

Воздействуя различными физическими излучениями на биоэлектромагнитные параметры растительного организма, можно управлять его жизнедеятельностью. Данные факторы имеют сходный механизм действия: активация электронного комплекса молекул,

¹ Гаряев П. П. Волновой геном. М. : Общественная польза, 1994.

их ионизация, образование свободных радикалов и т. п. Это приводит к повышению активности биохимических реакций, ферментных систем и изменению метаболизма растений.

В исследованиях, проведенных в РГАУ-МСХА, для повышения функциональной активности растений использовался квантово-резонансный излучатель¹. Генерируемое водородным газоразрядным генератором (ВГГ) поле обладает определенными энерго-информационными характеристиками (мощность, частота, периодичность и продолжительность излучения, длина волны), изменением параметров которых обеспечивается адресность его действия и оптимизация физиолого-биохимических процессов с учетом генетических особенностей организма. Мощность потока ВГГ на объект составляет 0,5—1,5 Вт/м² в области невидимого излучения с максимумом 200—300 нм и частотой волны от 10 до 100 МГц.

Биофизический механизм действия спектра излучения ВГГ на организм можно рассмотреть исходя из гипотезы Г. Н. Петраковича². Согласно этой гипотезе, в митохондриях процесс биологического окисления не завершается образованием АТФ, а создается высокочастотное электромагнитное поле и ионизирующее протонное излучение, которые составляют энергонасыщенное физическое поле живой клетки. В этом случае почти вся выработанная в митохондриях энергия передается в клетку со скоростью и импульсом, на много порядков превышающими «тихоходную» химическую связь. Образование такого физического поля в митохондриях обусловливается тем, что на поверхности их внутренней мембраны содержится 10³—10⁵ грибообразных дыхательных ансамблей, каждый из которых включает полный набор окислительных ферментов, АТФ и железосодержащий белок — цитохром³. Молекула цитохрома содержит четыре связанных между собой атома железа, причем каждый из них способен обратимо менять валентность $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$, т. е. производить электронный обмен. В этой реакции атом Fe^{3+} легко акцептирует у атома водорода электрон, превращая последний в протон. Происходящее с высокой скоростью перемещение электрона порождает электрический ток с образованием вокруг него электромагнитного поля с частотой, определяемой расстоянием между ближайшими атомами железа.

Таким образом, в митохондрии каждая молекула цитохрома является точечным источником сверхвысоких и крайне высоких частот излучения, которые, следуя законам физики, мгновенно сливаются между собой, синхронизируются и дают эффект биорезонанса.

¹ Ковалев В. М., Калашникова Е. А., Белов Д. В. Состояние и перспективы развития информационных технологий в сельском хозяйстве // Известия ТСХА. 1998. Вып. 3.

² Светлов А. В. Гипотеза о клеточной биоэнергетике Г. Н. Петраковича (или как Петракович Ревичи объяснил) // «Академия Тринитаризма». М., 1962.

³ Албертс Б. [и др.]. Молекулярная биология клетки.

Внутренние поля биосистемы и внешние физические поля функционируют в определенном биорезонансе¹. Физиолого-биохимические процессы в растениях взаимосвязаны и осуществляются ритмично. Временная их интеграция в организме определяется системой взаимосвязанных осцилляций. В случае, когда частота воздействующего излучения совпадает с частотой поля организма, которая у различных генотипов индивидуальна, как правило, наблюдается улучшение всех его важнейших функций.

При обработке старовозрастных (длительно пассивируемых) пробирочных растений стевии (*Stevia rabudiona* Ber.) спектром излучения ВГГ в течение 40 с (16 МГц) заметно усиливался рост побегов с одновременным приобретением ими нормальной морфологии. Кроме того, в этом варианте отмечалось повышение коэффициента размножения за счет индукции образования массового количества адвентивных почек и побегов (рис. 2.8), а также наблюдали изменение гормонального статуса растений-регенерантов (табл. 2.2): в растениях в 2—3 раза и более увеличивалось количество стимулятора — гибберелловой кислоты и снижалось содержание ингибитора роста абсцизовой кислоты. У обработанных растений активизировался синтез ауксинов и цитокининов, а их концентрация в интенсивно растущих органах зависела также от эффекта биоразбавления. Наиболее благоприятный баланс фитогормонов в каллусной ткани стевии складывался в вариантах, где растения после обработки были пересажены на новую питательную среду.

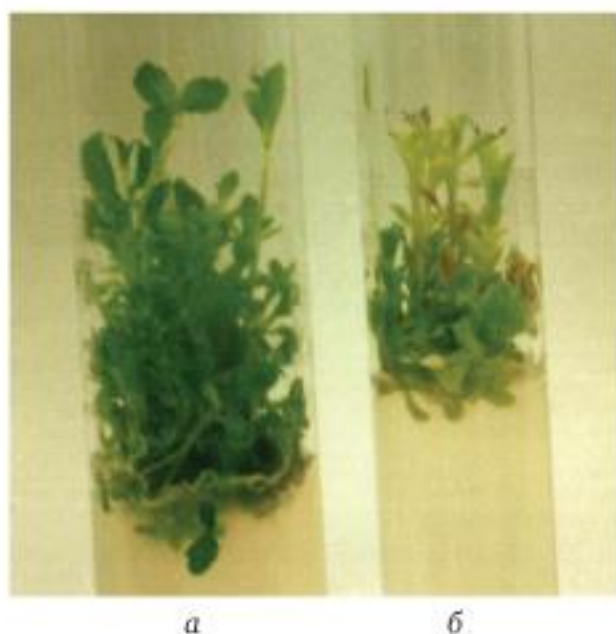


Рис. 2.8. Влияние спектра излучения ВГГ на морфогенетическую активность растений стевии *in vitro*:

а — опытный вариант; б — контрольный вариант

¹ Гаряев П. П. Волновой геном. М. : Общественная польза, 1994.

Таблица 2.2

Изменение гормонального состава растений стевии, культивируемых в условиях *in vitro*

Вариант	Орган растения	Содержание фитогормонов, мг/г сырого вещества			
		ГК	ИУК	ЦК	АБК
Контроль (свежепересаженные растения)	Стебель	$3,0 \cdot 10^{-9}$	$12,4 \cdot 10^{-4}$	$5,4 \cdot 10^{-4}$	$9,3 \cdot 10^{-4}$
	Каллус	0,0	$10,5 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-5}$	$9,0 \cdot 10^{-4}$
Обработка (свежепересаженные растения)	Стебель	$5,7 \cdot 10^{-9}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$	$6,1 \cdot 10^{-4}$	$3,3 \cdot 10^{-4}$
	Каллус	$3,2 \cdot 10^{-9}$	$27,0 \cdot 10^{-4}$	$5,3 \cdot 10^{-5}$	$3,2 \cdot 10^{-4}$
Обработка (непересаженные растения)	Стебель	$8,1 \cdot 10^{-9}$	$11,8 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-4}$
	Каллус	$7,0 \cdot 10^{-9}$	$4,6 \cdot 10^{-5}$	$8,6 \cdot 10^{-6}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$

Положительное влияние спектра излучения ВГТ на морфогенетическую активность изолированных эксплантов было отмечено и для пшеницы. У обработанных сигналом специальной формы (ССФ) изолированных зародышей, культивируемых в условиях *in vitro*, отмечалось для всех трех изучаемых генотипов пшеницы повышение содержания ЦК и АБК, а количество ИУК было близко к контролю (табл. 2.3). Следует отметить, что для сорта Энита было характерно повышение ЦК в изолированных зародышах после обработки ССФ в 3 раза по сравнению с контролем, что приводило к формированию калусной ткани, обладающей высоким морфогенетическим потенциалом.

Таблица 2.3

Гормональный баланс изолированных зародышей пшеницы перед введением их в культуру *in vitro* (мг/г сухого веса)

Генотип	Контроль			Обработка ССФ		
	ЦК	ИУК	АБК	ЦК	ИУК	АБК
Энита	$20,79 \cdot 10^{-5}$	$6,21 \cdot 10^{-6}$	$37,1 \cdot 10^{-8}$	$70,9 \cdot 10^{-5}$	$5,85 \cdot 10^{-7}$	$52,4 \cdot 10^{-7}$
Gaterin	$28,62 \cdot 10^{-4}$	$2,82 \cdot 10^{-6}$	$31,57 \cdot 10^{-7}$	$41,54 \cdot 10^{-5}$	$6,73 \cdot 10^{-6}$	$59,3 \cdot 10^{-7}$
Саратов, 29	$27,28 \cdot 10^{-4}$	$17,28 \cdot 10^{-5}$	$39,9 \cdot 10^{-7}$	$71,66 \cdot 10^{-4}$	$8,18 \cdot 10^{-6}$	$121,7 \cdot 10^{-7}$

Несомненно, что в основе морфогенеза лежат механические и химические взаимодействия, которые довольно глубоко изучены и в полной мере отражены в научной литературе. Однако имеющиеся факты не позволяют отрицать и существующей полевой регуляции. По мнению Л. В. Белоусова, она является наиболее ранней формой коммуникационных отношений биосистем.

Как отмечает ряд исследователей, параметры когерентного излучения клетки связаны с ее генетическим кодом. Тогда объединенное интерференционное поле должно стать автокоррелятором онтогенетической программы формирующегося организма. Поле влияет

на функции клеток, что в свою очередь приводит к изменению поля. По своей физической сути такой коррелятор представляет собой динамическую голограмму. Она отражает полевое взаимодействие отдельных клеток и связывает их в единую систему организма. Каждая часть волнового фронта голограммы содержит всю полноту информации о топологии объекта и может быть использована для восстановления его исходного образа¹.

Эффект голографической индукции морфогенеза был обнаружен А. В. Будаговским с соавторами во ВНИИ генетики и селекции плодовых растений им. И. В. Мичурина в экспериментах с плодовыми растениями. Объектом исследования служила каллусная ткань вишни сорта Харитоновская, характеризующаяся отсутствием морфогенетической активностью клеток (рис. 2.9).

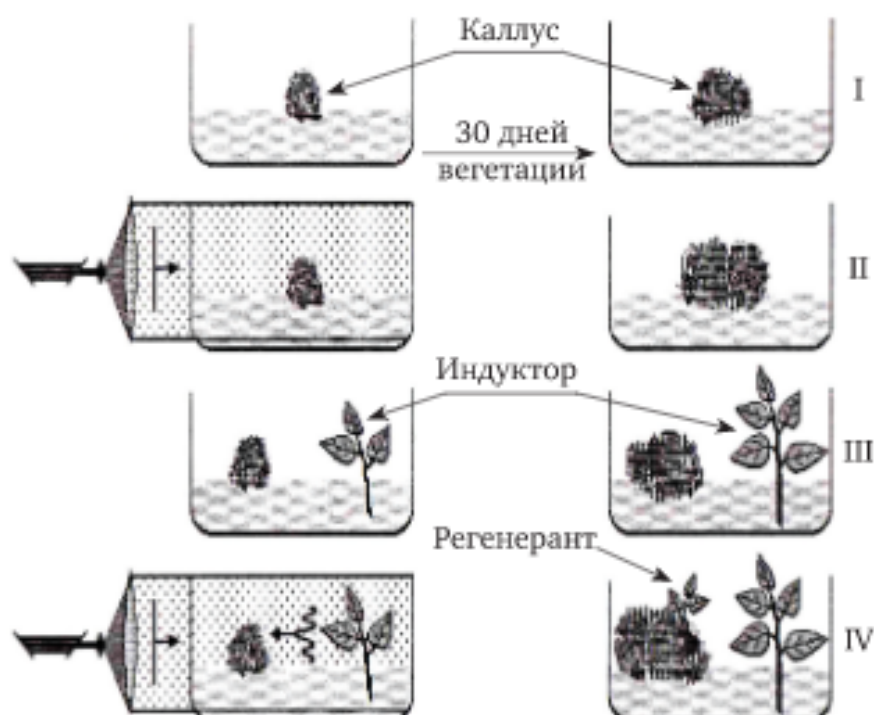


Рис. 2.9. Схема проведения эксперимента по голографической индукции морфогенеза (варианты опыта указаны римскими цифрами)²

В первом варианте каллусная ткань не подвергалась каким-либо воздействиям. Во втором — их кратковременно облучали низкоинтенсивным когерентным светом гелий-неонового лазера ($\lambda = 632,8$ нм). В третьем — каллусы культивировали вместе с индукторами — зелеными побегами этого же сорта, полученными

¹ Будаговский А. В. Дистанционное межклеточное взаимодействие.

² Первые три варианта являлись различными формами контроля. Оптическая форма четвертого варианта соответствовала схеме записи объемной голограммы Денисюка. Прямой и волнистой линиями показаны волновые фронты опорного и объектного пучков. Источником когерентного излучения служил гелий-неоновый лазер ЛГ-222, генерирующий одну пространственную моду n линии волны 632,8 нм (Будаговский, 2004).

в культуре меристем. Четвертый вариант соответствовал третьему, но дополнительно культуру облучали на лазерной установке по схеме записи объемной голограммы Денисюка. Этот тип голограммы образует систему стоячих волн при сложении двух движущихся навстречу друг другу когерентных световых пучков. Первый пучок — опорный — идет непосредственно от лазера, падает на объект и рассеивается на его поверхности. При этом возникает встречный волновой фронт второго — объектного пучка. Он содержит в фазовой форме информацию о пространственной структуре объекта. В результате интерференции опорного и объектного пучков происходит превращение фазовой информации в амплитудную, которая может быть зафиксирована некоторой фоточувствительной средой. В данном эксперименте такой средой служила каллусная ткань, а источником (индуктором) структурной информации — дифференцированные ткани побега. В первых трех вариантах опыта органогенез не был получен, в то время как в четвертом варианте частота дифференцировки клеток составила 2 %.

Таким образом, кроме полевых сигналов действует множество других раздражителей различной природы: химической, электрической, механической. Все они в конечном счете приводят к перераспределению регуляторных метаболитов в клетке и, как следствие, дифференциальной экспрессии генов¹. Когерентные электромагнитные поля являются важным продуктом жизнедеятельности клетки и необходимым ей в качестве одного из коммуникационных каналов. Биологическая роль таких полей, вероятно, заключается в оперативной передаче и пространственной реализации генетической информации при формировании целостного организма на уровне как отдельной клетки, так и многоклеточных структур. Полевая форма регуляции биологических систем не только не исключает химической, но и является прямым ее порождением и неотъемлемой частью. Обе они представляют единый процесс в разных своих проявлениях, взаимообусловленных и взаимозависимых.

Контрольные вопросы и задания

1. Что вы знаете о гормонах, регулирующих процесс морфогенеза каллусной ткани?
2. Перечислите физиологические факторы, оказывающие существенное влияние на морфогенез каллусной ткани.
3. Что вам известно о генотипических особенностях культивируемых клеток, тканей и органов растений *in vitro*?
4. Какая существует зависимость между морфогенезом каллусной ткани и числом субкультивирований?
5. Расскажите о применении фотонных технологий в регулировании процессов морфогенеза *in vitro*.

¹ Будаговский А. В. Дистанционное межклеточное взаимодействие.

Глава 8

КУЛЬТУРА КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

Дедифференцированные клетки возможно культивировать не только на твердых, но и на жидких питательных средах. В этом случае речь идет о получении суспензионной культуры, которая имеет широкое применение, прежде всего, в исследованиях по получению веществ вторичного метаболизма. Знание основ выращивания одиночных клеток и клеточных агрегатов *in vitro* позволяет решать широкий спектр теоретических и прикладных аспектов биотехнологии.

8.1. Получение и культивирование суспензионной культуры

Суспензию клеток получают из каллусной ткани, предварительно иницируемой на твердой агаризованной питательной среде, после чего ее помещают в жидкую среду с автоматическим перемешиванием. Клетки суспензии выращивают в колбах на качалке. Скорость вращения — 100 об/мин. Суспензионную культуру можно получать и непосредственно из первичного экспланта (лист, стебель, корень и т. д.). Для этого применяют фермент, например пектиназу. Сначала на поверхности экспланта образуется каллусная ткань, а затем уже от нее отделяются клетки и клеточные агрегаты, в результате чего получается клеточная суспензия (рис. 2.10).

Для получения 100 мл клеточной суспензии необходимо 2—3 г свежей каллусной ткани.

Необходимым условием культивирования клеточных суспензий является постоянное перемешивание или встряхивание среды. Если клеточная суспензия находится в неподвижном состоянии, то деление суспензионных клеток приводит к образованию каллусной ткани.

Деление суспензионных клеток поддерживается при наличии ауксинов и цитокининов, т. е. тех гормонов, которые необходимы для индукции и роста каллусных клеток. Таким образом, суспензионные культуры представлены типичными каллусными клетками, обладающими всеми свойствами, характерными для клеток такого рода.

Суспензии лучше образуются из рыхлого каллуса, получаемого на средах с 2,4-Д. Исключение из питательной среды ионов кальция

облегчает суспендирование. Еще более облегчает этот процесс добавление в среду фермента пектиназы, который разрушает пектат кальция, склеивающий отдельные клетки.

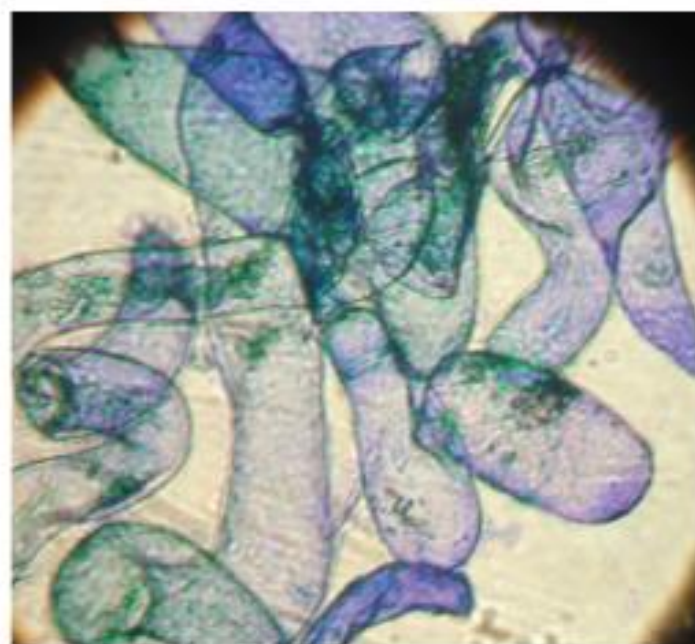


Рис. 2.10. Клетки суспензионной культуры подсолнечника

Клеточные суспензии в биотехнологии используются для получения веществ вторичного синтеза, многие из которых являются ценными лекарственными препаратами; для промышленного выращивания клеточной биомассы и для клеточной селекции. Наряду с этим суспензии клеток можно применять в качестве исходного материала для получения изолированных протопластов.

При использовании суспензионных культур в качестве продуцентов вторичных веществ применяют закрытые или открытые системы с периодическим или проточным режимом выращивания клеток. В закрытой системе клеточная суспензия лишена притока свежей питательной среды до конца выращивания, а в случае непрерывного режима выращивания в открытой системе питательная среда меняется на свежую. Как при периодическом, так и при проточном режимах выращивания в открытой системе клетки остаются в питательной среде и не удаляются даже при ее замене. Однако в открытых системах культивирования при замене питательной среды (периодическом или непрерывном) вместе со средой отбирается и часть суспензионных клеток.

Для работы с клеточными суспензиями необходимо знать их характеристики: жизнеспособность, плотность клеток в суспензионной культуре, степень агрегированности, скорость роста.

Жизнеспособность клеток определяют по их окрашиванию красителем (метиленовая синь или синька Эванса). Живые клетки не окрашиваются красителем вследствие непроницаемости для

него клеточных мембран. В мертвые клетки краска легко проникает, и они окрашиваются в синий цвет.

Одним из основных показателей, характеризующих состояние клеточной суспензии, является плотность клеточной популяции. Число клеток определяют в счетной камере Фукса — Розенталя (рис. 2.11) под микроскопом после мацерации (разделения клеток). В качестве мацерирующего вещества применяют хромовую кислоту (10—20%-ная), которая гидролизует средние пластинки, соединяющие клетки.

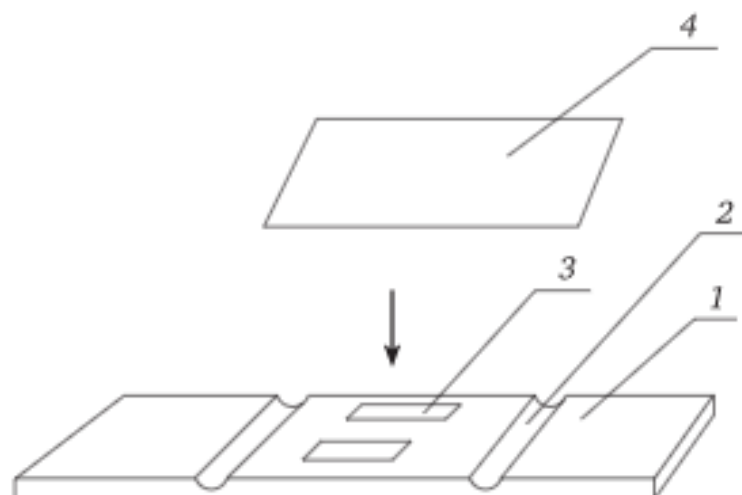


Рис. 2.11. Камера Фукса — Розенталя:

- 1 — предметное стекло; 2 — желобок для удаления лишнего раствора;
3 — область, в которой подсчитывают клетки; 4 — покровное стекло

Хорошо растущая суспензия имеет, как и калусная культура, S-образную кривую роста. Обычно длительность пассажа составляет 14—16 дней. При этом плотность возрастает от $5 \cdot 10^4$ до $5 \cdot 10^6$ кл/мл. Суспензия для субкультивирования берется в конце экспоненциальной фазы. Увеличение числа клеток, их сырой и сухой массы — основные критерии роста суспензионных культур.

Качество суспензии зависит от степени агрегированности ее клеток. По степени агрегированности выделяют следующие культуры: мелкоагрегированная; среднеагрегированная; крупноагрегированная. Мелкоагрегированная суспензионная культура состоит из одиночных клеток (40 %) и мелких агрегатов (60 %, агрегаты не должны содержать более 10—12 клеток). Среднеагрегированная суспензионная культура состоит из одиночных клеток (40 %), мелких агрегатов (40 %) и крупных агрегатов (20 %, агрегаты содержат более 12 клеток). Крупноагрегированная суспензионная культура состоит из мелких (40 %) и крупных агрегатов (60 %). Поэтому, чтобы избавиться от крупных агрегатов, суспензии фильтруют (фракционируют) через марлевые, нейлоновые или металлические фильтры. Одновременно это позволяет освободиться от остатков экспланта или плотных кусочков калусной ткани (рис. 2.12).

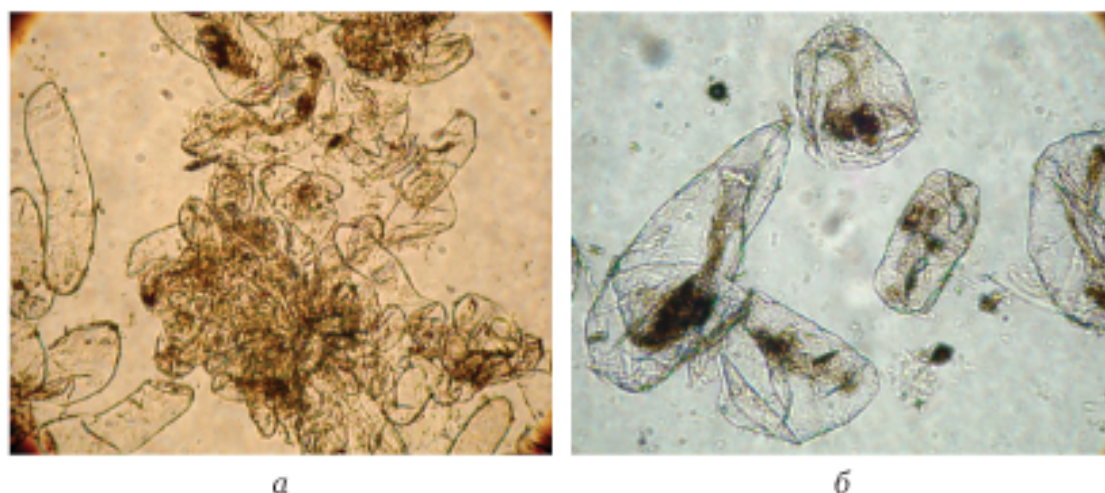


Рис. 2.12. Степень агрегированности суспензионной культуры:
 а — крупноагрегированная; б — мелко агрегированная (одиночные клетки)

Суспензионные культуры могут быть источником ценных вторичных метаболитов, и в них могут быть новые необычные соединения, например, камптотецин, харрингтонин и другие антиканцерогены, пептиды (ингибитор протеаз, ингибитор фитовирусов) и др.

Следует отметить, что деление клеток, приводящее к увеличению клеточной биомассы, и синтез вторичных метаболитов разобщены во времени. Синтез вторичных метаболитов достигает максимума в стационарной фазе роста.

8.2. Культура одиночных клеток

Для генетических и физиологических исследований, а также для практического использования в клеточной селекции очень ценным является культивирование отдельных клеток. Получение клон-потомства одиночной клетки помогает разобраться в причинах генетической неоднородности каллусных клеток, так как наблюдения в данном случае проводятся на ткани, полученной не из гетерогенного экспланта, а из одной клетки.

Одиночная гибридная клетка, выделенная из культуры изолированных протопластов, при дальнейшем ее делении позволяет получить клон, состоящий из гибридных клеток. Это намного облегчает работу исследователя, так как устраняет необходимость отбора потомства в культуре изолированных протопластов от негибридных, что представляет значительные трудности. Кроме того, сам процесс соматической гибридизации лучше наблюдать, если работа ведется с одиночными протопластами.

Выделяют одиночные клетки из клеточных суспензий, из тканей растений, например из мезофилла листа после его мацерации фер-

ментами, из культуры изолированных протопластов после восстановления клеточной стенки.

Для получения одноклеточной фракции суспензионной культуры иногда достаточно простого отстаивания в колбе в течение 15—30 мин. При этом крупные агрегаты оседают на дно колбы, а надосадочная фракция содержит только одиночные клетки или мелкие агрегаты. В том случае, когда при отстаивании не удастся получить одноклеточную фракцию, применяют мацерирующие ферменты, центрифугирование в градиенте сахарозы или фильтрование через сита (нейлоновые или металлические).

Трудности культивирования одиночных клеток связаны с тем, что отдельная клетка не делится в тех условиях, в которых хорошо растет калусная ткань. Для того чтобы заставить одиночные клетки делиться, разработаны специальные методы. В 1960 г. Джонсон предложил метод «няньки», при котором функцию «няньки», стимулирующей деление одиночной клетки, выполняют кусочки калусной ткани, отделенные от нее фильтровальной бумагой. В присутствии «няньки» одиночная клетка делится и дает индивидуальную колонию клеток — клон (рис. 2.13).

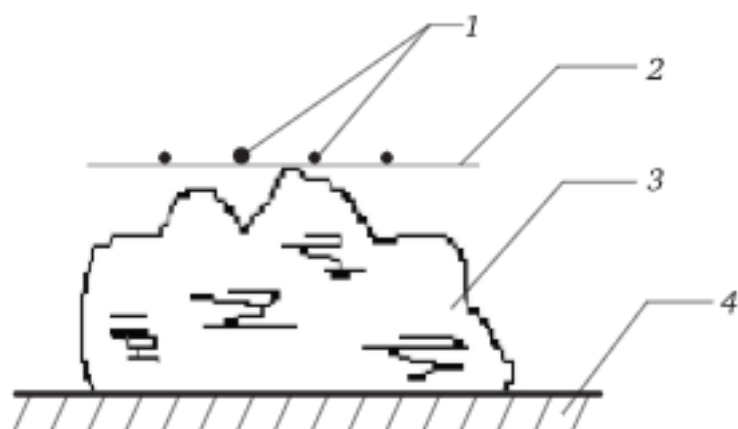


Рис. 2.13. Метод культуры ткани «няньки» для выращивания одиночных клеток:
1 — одиночные клетки суспензии; 2 — фильтровальная бумага; 3 — хорошо пролиферирующая калусная ткань; 4 — агаризованная питательная среда

Другой метод основан на использовании очень малых объемов богатой питательной среды и представляет собой культивирование одиночных клеток в микрокапле в чашке Купрака объемом 20 мкл. Метод предложен академиком Ю. Ю. Глебой¹. В микрокаплях удобно наблюдать за получением и делением клеток при соматической гибридизации.

Для индукции клеточных делений у одиночной клетки можно использовать также «кормящий слой» (активно делящиеся клетки

¹ Кириченко И. В., Глеба Ю. Ю. Индивидуальное культивирование преселектированных растительных протопластов и продуктов их слияния в микрокаплях // Biopolymers and cell. 1991. Т. 7. № 4.

суспензионной культуры того же вида растений, что и одиночная клетка) (рис. 2.14)¹.

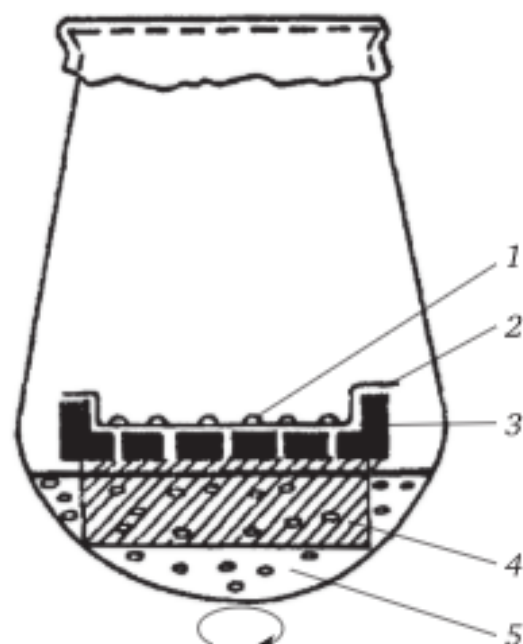


Рис. 2.14. Использование в качестве «няньки» культуры суспензионных клеток при выращивании изолированных протопластов и одиночных клеток:

1 — колонии клеток; 2 — фильтровальная бумага; 3 — алюминиевая сетка;
4 — пенополиуретан; 5 — суспензия клеток

Стимулирует клеточное деление и кондиционирование среды, для чего в нее добавляют питательную среду от интенсивно делящейся культуры клеток. Экспериментально установлено, что при очень малом инокулюме клетки в культуре *in vitro* прекращают деление, оставаясь при этом живыми. Было сделано предположение, что клетки выделяют в среду так называемые факторы кондиционирования, которые инициируют деление клеток. При небольшом количестве клеток концентрация выделяемых факторов кондиционирования недостаточна для индукции деления. В связи с этим для культивирования отдельных клеток, изолированных из рыхлой калусной ткани, необходимо применение методов культуры ткани-«няньки», или кормящего слоя. Отдельная клетка должна получить сигнал в виде факторов кондиционирования от соседних клеток, и только тогда деление индивидуальной клетки становится возможным (рис. 2.15).

Кондиционирующий фактор получают при фильтровании клеточной суспензии в экспоненциальной фазе роста через бактериальный фильтр. По сути все перечисленные методы основаны на использовании выделений из делящихся клеток — кондиционирующего фактора. Несмотря на многочисленные попытки опре-

¹ Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений ...

делить химическую природу и раскрыть механизм действия кондиционирующего фактора на деление клеток, добиться этого пока не удалось. Однако уверенно можно сказать, что этот фактор термостабилен, водорастворим, включает низкомолекулярные вещества и не заменяется фитогормонами¹. К сказанному можно добавить также, что вещество стабильно при pH 4—11, молекулярная масса его примерно 700 Д, и этот фактор является синергистом брассиностероида. Таким образом, исследования показали, что это не чисто химическое вещество, а сумма факторов, которые выделяются из клетки.

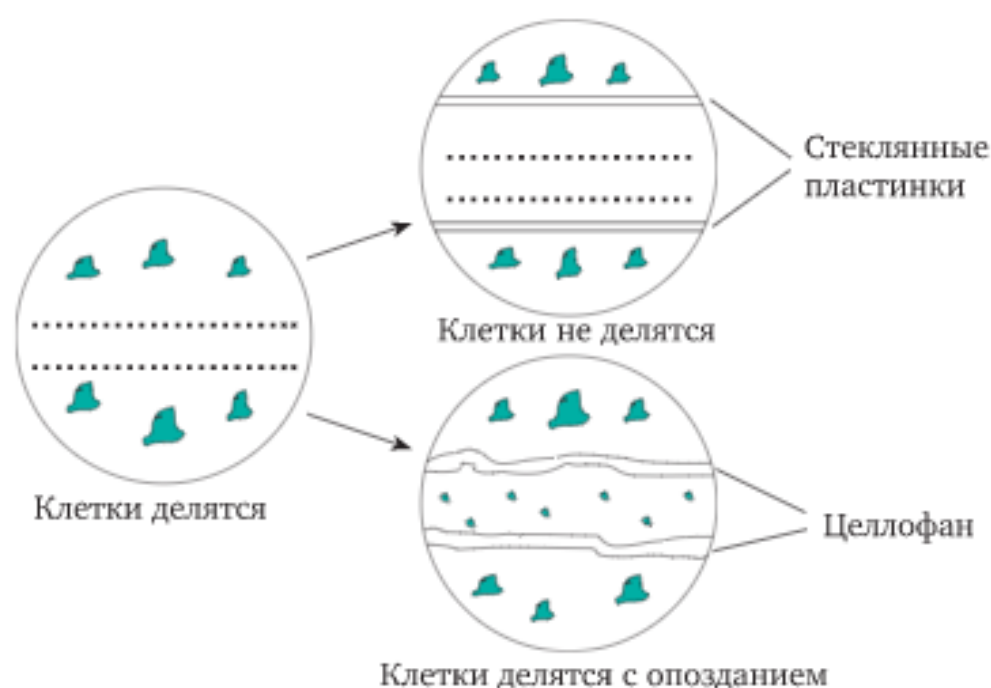


Рис. 2.15. Стимулирование деления одиночных клеток хорошо пролиферирующей каллусной тканью

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое суспензионная культура?
2. Какие вы знаете способы получения суспензионной культуры?
3. Назовите основные условия выращивания клеток суспензионной культуры.
4. В чем отличие клеток суспензионной культуры от клеток каллусной ткани?
5. Перечислите основные характеристики суспензионной культуры.
6. Какими факторами можно регулировать степень агрегированности суспензионной культуры?
7. По какой причине клетки суспензионной культуры необходимо пересаживать на свежую питательную среду 1 раз в 2 недели?

¹ Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений ...

8. Что такое культура одиночных клеток? Назовите основные способы ее культивирования.
9. Что вам известно о кондиционирующем факторе?
10. Каково практическое применение суспензионной культуры?

Глава 9

СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ

Метод культуры изолированных клеток, тканей и органов растений *in vitro*, широко используемый для решения многих фундаментальных вопросов клеточной биологии, физиологии и генетики растений, в настоящее время находит все большее применение и при создании новых биотехнологий. Начиная с первых работ по культивированию растительных клеток, тканей и органов особый интерес у исследователей вызывал вопрос о том, какие клеточные изменения могут происходить в изолированных клетках, развивающихся на искусственных питательных средах, и причины, их вызывающие.

Процесс культивирования изолированных клеток и тканей *in vitro* может сопровождаться различными аномалиями митоза, что приводит к возникновению значительного генетического разнообразия в популяциях клеток каллусных тканей. С разработкой приемов регенерации растений из дедифференцированной каллусной ткани, особый интерес исследователей привлек анализ геномной конституции вновь образовавшихся растений, среди которых были обнаружены формы с отличающимися по сравнению с исходным эксплантом числом хромосом. Фенотипические и генетические изменения обнаружены и среди растений, полученных из изолированных протопластов. Следовательно, вариабельность хромосомных чисел растений, которые прошли стадию неорганизованного роста, в той или иной степени была отражением таковой в культивируемых *in vitro* клетках. Такое разнообразие клеточных линий и растений-регенерантов называют *сомаклонами*, хотя в 1970—1980-е гг. было принято называть растения, регенерировавшие из каллусной ткани *каликлонами*, а из протопластов — *протоклонами*.

Сомаклональную вариабельность желательно свести к минимуму, когда целью исследований является получение однородного материала, а в случае получения дополнительной генетической изменчивости степень вариабельности необходимо усилить.

Генетическая природа и механизм возникновения сомаклональной изменчивости пока мало изучены. Однако можно четко выделить зависимость возникновения сомаклональных вариантов, прежде всего, от генотипической и эпигенетической изменчиво-

сти, индуцируемой условиями культивирования *in vitro*, в первую очередь составом питательных сред и уровнем концентраций солей и регуляторов роста растений, а также от генотипа и исходного экспланта.

9.1. Естественное генетическое разнообразие клеток растений

Дифференцированные клетки в интактном растении могут иметь разную степень пloidности, хотя для отдельных видов характерно наличие только диплоидных клеток, пloidность которых может изменяться в процессе онтогенеза. Например, экспериментально доказано, что в меристемных тканях, наряду с факторами видового постоянства числа хромосом, почти у 80 % покрытосеменных растений в процессе дифференцировки в соматических клетках могут происходить эндоредупликация хромосом и формирование тканей различного уровня пloidности. Для вегетативно размножаемых и апомиктичных растений характерно образование с высокой частотой анеуплоидных клеток. Усиление хромосомных перестроек, приводящих к появлению химерности и миксопloidии у растений, наблюдается при изменении условий произрастания, особенно при их резком ухудшении: засоление почв, повышенные или пониженные температуры, применение гербицидов или пестицидов, минеральных удобрений в повышенных дозах. Эти и другие факторы могут приводить к физиологическим нарушениям, связанным, в первую очередь, с появлением аномальных митозов и формированием клеток с числом хромосом, отличающихся от такового в материнской ткани.

Цитологические исследования показали, что вариабельность, индуцируемая условиями культивирования *in vitro*, связана с генетическими изменениями. Прежде всего, одним из основных источников появления фенотипических вариантов являются различные кариологические изменения и перестройки¹. Однако выявить, какие из них будут иметь фенотипический эффект и наследоваться как стабильная мутация генов, часто сложно. Как грубые, так и тонкие хромосомные изменения, могут вызывать существенные фенотипические изменения и в растениях-регенерантах, и в последующем потомстве. Хромосомные изменения часто наблюдаются при мейозе. Анализ мейоза клетки в регенерантах показал такие интенсивные перестройки хромосом, как транслокация, инверсия, субхроматидный обмен, частичная утрата хромосом.

Некоторые случаи соматической изменчивости могут быть объяснены соматическим кроссинговером, который индуцируется

¹ Шамина З. Б. Генетическая изменчивость в популяциях соматических клеток растений в культуре : дис. ... д-ра биол. наук в форме научного доклада : 03.00.15. Ленинград, 1988.

условиями культуры тканей. Например, при культивировании сои в условиях *in vitro* частота соматического кроссинговера увеличивалась от $5,7 \cdot 10^{-5}$ до $7,7 \cdot 10^{-6}$. В этом случае обмены происходят несимметрично или даже между негомолотичными хромосомами, причем в условиях культуры частота сестринских обменов очень велика. Мелкие делеции часто обуславливают потерю гена, например выпадение доминантной аллели, следствием чего часто бывают рецессивные мутации. В литературе это явление названо культуральным индуцированием гемизигот¹. Это также является доказательством того, что большая часть фенотипических изменений обусловлена генетическими механизмами.

Генетическая природа соматических изменений может быть успешно установлена с помощью анализа фрагментов рестрикции ДНК, который в настоящее время широко используется для классификации и идентификации разновидностей, биоформ и даже соматических вариантов. Одной из основных задач, связанных с проблемой изучения соматических вариантов, является разработка методов, позволяющих выявлять генетические различия между регенерантами, полученными из каллусной ткани или из клеток, подвергшихся действию стрессового фактора.

Ранее молекулярный анализ соматических вариантов проводился с использованием метода RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), основанном на выявлении полиморфизма рестриционных фрагментов ДНК. Показано, что метод RFLP может быть использован для классификации и идентификации соматических вариантов. С помощью этого метода был выявлен полиморфизм соматических регенерантов кукурузы, полученных из каллусной культуры, который выражался в изменении копийности гена и ряда других небольших изменений специфических локусов; приведены данные о перестройках нуклеотидной последовательности и метилировании ДНК у растений риса, полученных из каллусной ткани.

В настоящее время наибольшее распространение при анализе генома растений приобрел метод RAPD PCR (*random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction*), основанный на амплификации геномной ДНК с помощью случайных десятичных праймеров. По сравнению с RFLP методом RAPD является более дешевым и быстрым и не требует большого количества растительного материала для анализа, что позволяет анализировать индивидуальные растения и отдельные каллусы.

Молекулярные методы исследования применяются, например, для определения уровня геномного полиморфизма у длительно культивирующихся клеточных культур. На примере сахарного

¹ Лутова Л. А., Матвеева Т. В. Генная и клеточная инженерия в биотехнологии высших растений / под ред. И. А. Тихоновича. СПб. : Эко-Вектор, 2016.

тростника, а также ряда других культур было показано, что RAPD спектры растений-регенерантов полученных из каллусной ткани, культивируемой в условиях *in vitro* в течение двух лет, более полиморфны, чем спектры растений-регенерантов, полученных из молодых эмбриональных культур.

Высокая разрешающая способность RAPD метода позволяет обнаружить изменения наследственной информации клеток на разных этапах их культивирования, что может способствовать изучению природы соматической изменчивости.

Приведенные выше материалы позволяют утверждать, что при клональном микроразмножении, клеточной селекции или при получении веществ вторичного синтеза для различных культур следует учитывать возможность возникновения соматической изменчивости в процессе их длительного культивирования *in vitro*.

9.2. Эпигенетическая изменчивость

Кроме соматической вариабельности, связанной с наследуемыми перестройками генома, отмечены фенотипические изменения («эпигенетические»), которые могут стабильно передаваться дочерним клеткам, но не проявляться в растениях-регенерантах или их половом потомстве (рис. 2.16)¹.

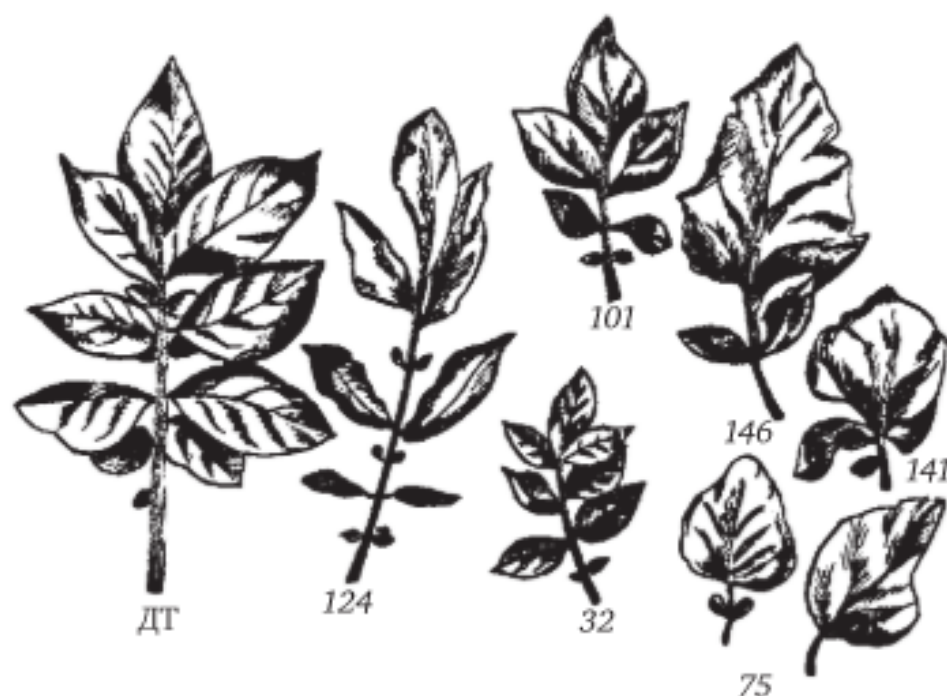


Рис. 2.16. Изменение формы листьев у соматических вариантов картофеля сорта Смена. ДТ — исходный тип, цифрами обозначены номера различных линий

¹ Хромова Л. М. [и др.], Клеточная селекция картофеля // Сельскохозяйственная биология. 1983. №6. С. 3—12.

Высокая степень разнообразия соматклонов зависит от исходного генотипа, природы и стадии развития экспланта. Например, у различных злаков степень изменчивости среди соматклонов может значительно различаться: у пшеницы ($2n = 6x = 42$) из 192 исследованных растений-регенерантов 29 % были анеуплоидными, у гексаплоидного овса ($2n = 6x = 42$) выявлены цитогенетические изменения с такой же частотой, а для кукурузы частота возникновения анеуплоидных растений не превышала 2—3 %. Образование полиплоидных и анеуплоидных растений может наблюдаться и у других видов, например на картофеле. Причем частота появления новых вариантов у диких видов значительно ниже, чем у дигаметоидных линий культивируемого картофеля.

Тип исходного экспланта также влияет на появление соматклональных вариантов, различающихся количественными и качественными признаками. Для картофеля, например, аномальные растения получены в 12 % случаев при использовании в качестве первичного экспланта мезофильных тканей листа, а в случае применения лепестков или оси соцветий частота формирования растений с фенотипическими отклонениями от нормы составила 50 %.

Условия культивирования, в том числе нарушение гормонального баланса питательной среды, — одна из причин возникновения генетического разнообразия культивируемых клеток вследствие нарушения клеточного цикла, в частности митоза. От соотношения фитогормонов, входящих в состав питательных сред, во многом зависит цитогенетическая структура клеточных популяций. Одним из наиболее вероятных путей влияния фитогормонов на репрессию и дерепрессию генов является метилирование ДНК, вызывающие усиление или ослабление экспрессии соответствующих генов или полное прекращение их функционирования на том или другом этапе органогенеза. Количество присоединившихся или освободившихся метильных групп, места их локализации в боковых ветвях структур нуклеотидных последовательностей ДНК оказывают при этом существенное влияние на функциональную активность генов, в состав которых входят указанные структуры. Изменения в характере метилирования ДНК влияют на процессы гетерохроматизации и компактизации хромосомного материала. Как известно, гетерохроматиновым участкам свойственна задержка репликации, что может приводить к возникновению анафазных мостов и индукции хромосомных разрывов. В свою очередь, хромосомные разрывы могут активировать мобильные генетические элементы и повышать мутабельность культивируемых клеток растений¹. Известно, что мобильные элементы могут инактивировать структурные гены, изменять генную регуляцию, реактивировать молчащие гены

¹ Лутова Л. А., Матвеева Т. В. Генная и клеточная инженерия ...

и генерировать дупликации и делеции. Шок развития (выражение П. Ларкина применительно к условиям культивирования *in vitro*) могут индуцировать транспозиции мобильных элементов, которые являются эффективным способом повышения адаптивности клеток к стрессовым условиям.

В настоящее время известны ферменты, например ДНК-метилаза, ответственные за метилирование ДНК в соответствии со следующим уравнением реакции: ДНК + S-аденозилметионин → Метил-ДНК + S-аденозилгомоцистеин. С этим процессом связаны многочисленные факты возникновения так называемых эпигенетических, ненаследуемых изменений у растений.

Морфологическая и цитогенетическая разнокачественность клеточных популяций может возникнуть и вследствие влияния отдельных компонентов питательной среды: некоторых минеральных солей, сахарозы или другого источника углеродного питания, витаминов, растительных экстрактов, а также от режима выращивания. Длительное культивирование клеток *in vitro* также способствует повышению генетического разнообразия соматклонов. Причем для некоторых видов показано, что, несмотря на присутствие в культуре *in vitro* клеток разной ploидности, регенерировавшие растения были преимущественно диплоидными. Это явление было объяснено тем, что в процессе культивирования отбирались растения-регенеранты с более или менее нормальной морфологией, которые регенерировали, как правило, в первую очередь.

Различные типы морфогенеза — соматический эмбриогенез или органогенез — также могут по-разному сказываться на генетических изменениях и, соответственно, на фенотипе растений. Экспериментально установлено, что при соматическом эмбриогенезе время прохождения цикла «клетка — растение» значительно короче, чем при органогенезе, поэтому степень сходства получаемого материала и исходного родительского генотипа может быть значительно выше.

На примере растений-регенерантов кукурузы было показано многообразие природы соматклональной изменчивости¹. У растений-регенерантов, полученных из длительно культивируемых калусных тканей, обнаружены: 1) ненаследуемые модификации, нормализующиеся в процессе онтогенеза; 2) изменения экспрессии генов (как наследуемые, так и ненаследуемые); 3) истинные мутации, связанные с изменением первичной структуры ДНК. Относительная цитогенетическая стабильность растений-регенерантов позволяет сделать заключение, что причиной значительной вариабельности морфологических и физиологических признаков не являются крупные хромосомные нарушения. Напротив, высокая

¹ Долгих Ю. И. Соматклональная изменчивость растений ...

частота вариабельности ДНК-маркеров свидетельствует о наличии точковых мутаций или микрохромосомных перестроек. Проявление соматоклональных вариаций в гомозиготной форме, нестабильность наследования отдельных признаков указывают, возможно, на участие в становлении соматоклональной изменчивости процессов митотической и мейотической рекомбинации или активации мобильных генетических элементов.

Вероятность проявления различных соматоклональных вариаций неодинакова. Видимо, наиболее характерным типом соматоклональных изменений являются вариации, так или иначе связанные с дифференциацией и дедифференциацией. Возможно, не последнюю роль играют в этом случае изменения гормонального баланса. Процесс введения в культуру *in vitro* и последующая регенерация растений индуцируют множественные нарушения экспрессии генов. У соматоклонов это проявляется в виде аномалий развития, нарушений тканевой специфичности. Частота подобных изменений достигает у некоторых соматоклонов 100 %. Высокая вариабельность *in vitro* количественных полигенных признаков (десятки процентов), изменчивость большинства качественных признаков, не связанных с развитием, на несколько порядков ниже (Долгих, 2005). Таким образом, частота, природа изменчивости, стабильность и наследование в половом потомстве генетической и эпигенетической изменчивости различны (табл. 2.4).

Таблица 2.4

Генетическая и эпигенетическая изменчивость (по Р. Г. Бутенко, 1999)

Признак	Генетическая изменчивость	Эпигенетическая изменчивость
Частота	10^{-5} — 10^{-7} на регенерацию	10^{-3} на регенерацию
Природа изменений	Случайная	Направленная
Стабильность	Стабильна	Часты инверсии
Наследование в половом потомстве	Да	Возможно

Таким образом, имеющиеся данные свидетельствуют о том, что клетки растений, культивируемые в условиях *in vitro*, подвергаются ряду генетических, эпигенетических и морфофизиологических изменений. Сохранение клетками генетической стабильности может рассматриваться лишь как исключение. Прямые цитологические наблюдения за числом и структурой хромосом клеток растений свидетельствует о том, что кариотип культивируемых клеток легко подвергается модификации. Часть таких клеток погибает, часть может размножаться и вытеснять нормальные клетки. Установлено, что клетки с измененными кариотипами могут обладать морфогенетической

нетическими потенциями и давать начало растениям-регенерантам с измененными числом и структурой хромосом. Размер и частота хромосомных нарушений в клетках растений, культивируемых на искусственных питательных средах, довольно велики.

Установлено, что кроме изменений числа и структуры хромосом в клетках растений *in vitro* происходят и генные (точечные) мутации, частота которых достаточно велика и может быть использована для повышения генетического разнообразия культивируемых растений.

9.3. Практическое использование и перспективы применения соматоклональной изменчивости

Соматоклональные варианты имеют практическое применение в сельскохозяйственной практике в силу появления форм, отличающихся от родительских растений по различным биохимическим, качественным и количественным признакам, а также цитогенетическим характеристикам.

Мощным стимулом для изучения явления соматоклональной изменчивости явилась возможность практического применения спонтанной вариабельности *in vitro* как эффективного источника получения новых форм растений у важных сельскохозяйственных культур. В начале 1970-х гг. на Гавайских островах впервые из культуры клеток ткани сахарного тростника получены соматоклоны, различающиеся по морфологическим, цитогенетическим и изозимным признакам. Среди них отобраны растения, устойчивые к вирусам и ложной мучнистой росе. На Тайване идентифицированы соматоклональные варианты этой культуры с большим числом признаков, включая устойчивость к болезням и существенное увеличение урожая по сравнению с исходными формами. Первый сорт сахарного тростника Оно через культуру клеток *in vitro* получен от сорта Пиндар. Новый сорт был более урожайным и имел повышенную устойчивость к заболеваниям, в частности к болезни Fiji.

В настоящее время помимо традиционных методов селекции важной технологией селекционных программ, направленных на сортоулучшение ряда культур, становится применение индуцированной *in vitro* соматоклональной изменчивости. Это направление исследований широко применяется для кормовых, технических, декоративных, лекарственных и цветочных культур. Например, еще в середине 1970-х гг. на основе соматоклональной изменчивости применительно к декоративным растениям получен новый сорт пеларгонии Velvet Rose.

Значительное количество исследований выполнено на основных сельскохозяйственных культурах, таких как пшеница, ячмень, куку-

руза, рис, сорго, картофель, томаты и др. Например, Дж. Шепардом с соавторами в 1980 г. через культуру изолированных протопластов получены соматклоны картофеля, обладающие устойчивостью к *Alternaria solani*, разным расам *Phytophthora infestans*, с повышенной фертильностью и урожайностью. Из лучших соматклонов сорта Рассет Бербанк, которые сохраняли стабильность в течение однолетнего вегетативного размножения, получены сорта Кристалл и Норгольд Рассет. Сидоров с соавторами в 1985 г. выделили ценные соматклоны картофеля сорта Зарево, отличающиеся высокой урожайностью, повышенной устойчивостью к заболеваниям и более высоким содержанием в клубнях протеина и крахмала. Наследование важных признаков при размножении клубнями сохранялось в течение трехлетних полевых испытаний.

При регенерации растений табака из каллусной ткани, инфицированной вирусом табачной мозаики (ВТМ), выделены соматклоны, устойчивые к данному вирусу. У 90—95 % линий растений обнаружены типичные симптомы поражения ВТМ, тогда как 5—10 % растения обладали устойчивостью. Несмотря на то, что большинство устойчивых растений были стерильными, несколько из них дало потомство, которое также проявляло устойчивость к ВТМ при инокуляции растений данным вирусом.

При размножении растений через меристемную культуру также наблюдается соматклональная вариабельность растений. Например, в меристемной культуре сладкого картофеля обнаружен клон, клубни которого имели более темную и стабильную окраску. Этот клон дал начало сорту Scarlet.

Однако следует заметить, что спонтанная соматклональная вариабельность не всегда ведет к положительным результатам. Поэтому остается важным дальнейшее изучение регуляции изменчивости, выбор подходящих генотипов и исходных эксплантов, а также определение условий для увеличения спектра соматклональной вариабельности. При этом особенно важно проводить целенаправленные исследования по индукции конкретных признаков. Для этого необходимо более детальное изучение природы соматклональной изменчивости, а также наследования новых признаков. При получении практически ценных соматклонов необходимо учитывать изменчивость признаков, контролируемых как геномом, так и цитоплазмой.

Исследования соматклональной изменчивости перспективны в работах по клеточной селекции растений *in vitro*, клональному микроразмножению, по применению индуцированного мутагенеза на каллусные и соматические клетки растений *in vitro*, в технологиях по созданию трансгенных растений. В зависимости от целей и задач селекция в условиях *in vitro* позволяет проводить направленный отбор клеток, тканей, штаммов. Однако при этом необходимо

проводить дальнейшее изучение корреляции между устойчивостью на клеточном уровне и на уровне интактного растения. Мутагенез *in vitro* может значительно расширить спектр соматоклональной изменчивости и, соответственно, интенсифицировать исследования направленной селекции *in vitro*.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое соматоклональная изменчивость?
2. Какие факторы влияют на соматоклональную изменчивость в культуре *in vitro*?
3. Расскажите о естественном генетическом разнообразии клеток растений.
4. Что вы знаете о эпигенетической изменчивости?
5. Приведите примеры практического использования соматоклональной изменчивости.

Глава 10

КАЛЛУСНАЯ ТКАНЬ — ИСТОЧНИК ВЕЩЕСТВ ВТОРИЧНОГО МЕТАБОЛИЗМА

Характерной особенностью растений является удивительное многообразие синтетических процессов, в результате которых образуется большое количество соединений различного строения. Способность растений синтезировать столь сложные и разнообразные по своей структуре вещества нашло практическое применение в медицине, фармакологии, косметологии и других областях народного хозяйства.

В XX в. была выявлена уникальная способность большинства растений накапливать в повышенных количествах низкомолекулярные соединения, получившие название *вторичных метаболитов*, или веществ вторичного происхождения. Впервые о вторичных метаболитах сказал немецкий физиолог А. Коссель в 1891 г. Он писал: «В то время как первичные метаболиты присутствуют в каждой растительной клетке, способной к делению, то вторичные метаболиты присутствуют в клетках только “нечаянно” и не необходимы для жизни растения. Случайное распространение этих соединений, их нерегулярное нахождение в близких видах растений, вероятно, свидетельствует о том, что их синтез связан с процессами, не являющимися неотъемлемыми для каждой клетки, а имеющими скорее вторичный характер»¹. Способность растительной клетки к синтезу вторичных метаболитов, наряду с фотосинтезом, является отличительной чертой растений по сравнению с животными.

В настоящее время выявлено около 100 000 веществ вторичного происхождения, и их перечень постоянно расширяется. По современным данным, за вторичный метаболизм отвечает 15—25 % генов растительных организмов, что также свидетельствует о важности вторичного метаболизма в общем обмене растений.

Выделяют основные классы вторичных метаболитов:

- алкалоиды — примерно 12 000 структур;
- терпеноиды (изопреноиды) — примерно 35 000 структур;
- фенольные соединения — примерно 8000 структур;
- минорные группы — примерно 10 000 структур.

¹ Носов А. М. Функции вторичных метаболитов растений *in vivo* и *in vitro* // Физиология растений. 1994. Т. 41. № 6. С. 873—878.

Вторичные метаболиты издавна привлекали внимание специалистов-практиков в связи с исследованием пищевых, лекарственных и ядовитых свойств растений. Использование растений в качестве лекарств пришло в наш век из древности и до сих пор играет значительную роль в арсенале лекарственных средств современной медицины. Еще выдающийся врач Древней Греции Гиппократ (около 460—377 гг. до н. э.) дал научное обоснование применению более 230 видов лекарственных растений. Он писал «Путь к здоровью и долголетию лежит через ванны с ароматическими маслами и массаж с благовониями, применяемые ежедневно».

Развитие химии в XIX—XX вв. оказало значительное влияние на медицину. Она начала ориентироваться на химически чистые лекарственные препараты, многие из которых были получены из растений. Первым таким соединением оказался морфий, который в 1803 г. был выделен из высушенного сока коробочек мака. Это событие считается началом изучения вторичных метаболитов растений и вызвало повышенный интерес исследователей к извлечению химических веществ из растительного сырья. Поэтому начиная с конца XIX в. для официальной медицины приоритетным стал подход к выделению чистых веществ и синтезу новых, более активных производных.

В настоящее время ведется активный поиск сильнодействующих препаратов растительного происхождения. Для этой цели исследователи используют совокупность различных инструментальных методов выделения и анализа вторичных метаболитов. Широкие перспективы в расширении арсенала природных лекарственных средств открывает применение методов клеточной биотехнологии. Особенно большое значение это направление исследований имеет при введении в культуру *in vitro* редких и исчезающих видов растений.

Исследование вторичных метаболитов растений ведется в трех направлениях:

- 1) *фитохимия* — изучение строения метаболитов и их распространения в растениях;
- 2) *биохимия* — изучение путей синтеза, энзимологии и регуляции метаболизма;
- 3) *физиология* — исследование локализации вторичных соединений в клетках и тканях растений, ее изменений в процессе онтогенеза и роль этих веществ в жизнедеятельности растений.

10.1. Общая характеристика вторичных метаболитов

Несмотря на большое количество веществ вторичного происхождения и разнообразия их строения, выделяют четыре признака,

которые в совокупности достаточно четко раскрывают понятие вторичных метаболитов растений:

1) присутствуют не во всех растениях (видовая специфичность). Хотя есть вторичные метаболиты, которые найдены практически во всех растениях;

2) являются биологически активными веществами. Довольно много вторичных метаболитов без явно выраженной биологической активности (хотя не исключен вариант, что ее просто для конкретного метаболита пока не обнаружили);

3) относительно низкомолекулярные соединения. Известны высокомолекулярные вторичные метаболиты (например, каучук и гутта);

4) синтезируются из немногих первичных метаболитов. Например, терпены образуются из ацетил-КоА и мевалоновой кислоты или из основных продуктов гликолиза — 3-Р-глицериновой кислоты и (или) пирувата; фенольные соединения образуются из фосфоенолпирувата и эритрозо-4-Р; алкалоиды синтезируются в основном из аминокислот. В некоторых случаях образование вторичных метаболитов происходит при одновременном участии различных биосинтетических путей (например, синтез пренилированных флавоноидов связан с терпеноидным и фенольным метаболизмом) (рис. 2.17).

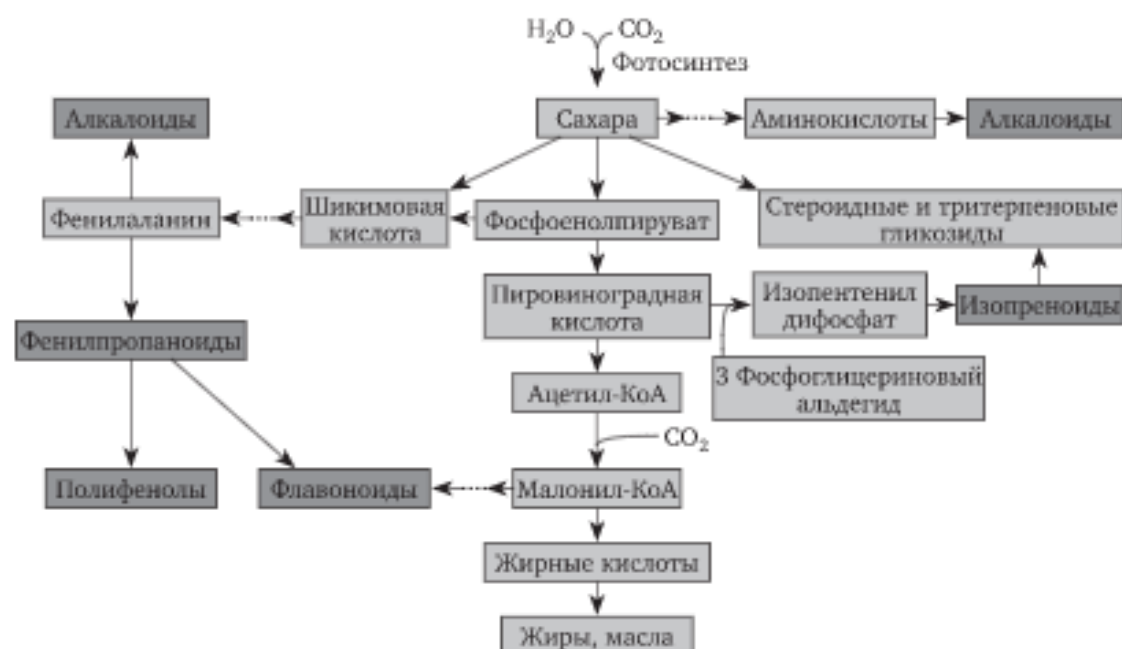


Рис. 2.17. Схема путей биосинтеза основных классов вторичных метаболитов из продуктов первичного обмена

Относительно функционального значения вторичных метаболитов существуют следующие точки зрения: продукты жизнедеятельности; запасные соединения; защитные соединения; «биохимические инструменты» взаимодействия растений с окружающей

средой. Например, некоторые вторичные метаболиты — это токсины, используемые для защиты от хищников, а другие — феромоны, привлекающие насекомых для опыления. Именно эти вторичные метаболиты могут оказывать терапевтические действия на людей; их можно выделить, чтобы сделать лекарственное средство.

Синтез вторичных метаболитов происходит преимущественно в пластидах и цитозоле, а локализация их осуществляется в вакуолях или в клеточной стенке. Равномерное распределение вторичных метаболитов в тканях и в интактном растении наблюдается редко. Например, дубильные вещества у травянистых растений накапливаются в основном в подземных органах; эфирные масла — в лепестках цветков, плодах, листьях, стеблях, корнях; алкалоиды — в листьях, плодах и семенах, корнях, коре. Локализация метаболитов зависит от вида растения, условий окружающей среды, типа вещества и его функции.

Многочисленные исследования показывают, что разные группы вторичных метаболитов находятся внутри растения в динамическом состоянии. Содержание их меняется от органа к органу в ходе онтогенеза и 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.

10.2. Клеточная биотехнология и получение веществ вторичного метаболизма

Существующие методы субкультивирования изолированных клеток в условиях *in vitro*, позволяют использовать их как для фундаментальных исследований, так и 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 зависящее от сезона, климатических и почвенных условий; 2) возможность оптимизировать условия культивирования суспензии клеток, позволяющих синтезировать в необходимом количестве нужные вещества; 3) автоматизация процесса.

Установлено, что каллусные клетки, культивируемые *in vitro*, так же, как и клетки интактного растения, могут синтезировать вторичные метаболиты. Причем по качественному и количественному составу они могут быть схожи. Так, в Институте физиологии растений РАН в отделе биологии клетки и биотехнологии собрана большая коллекция клеточных культур растений из различных семейств, синтезирующих вторичные метаболиты, широко используемые в промышленности. К ним относятся: женьшень дальневосточный — источник диосгенина, диоскорея дельтовидная — стероидные гликозиды, раувольфия змеиная — продуцент антиаритмического алкалоида аймалина, стевия — стевиозид и т. д. В последние годы особый интерес представляют исследования по культивированию в биореакторах изолированных клеток тиса ягодного. Установлено, что клетки данного растения синтезируют вещество таксол, которое является антираковым препаратом (рис. 2.18).

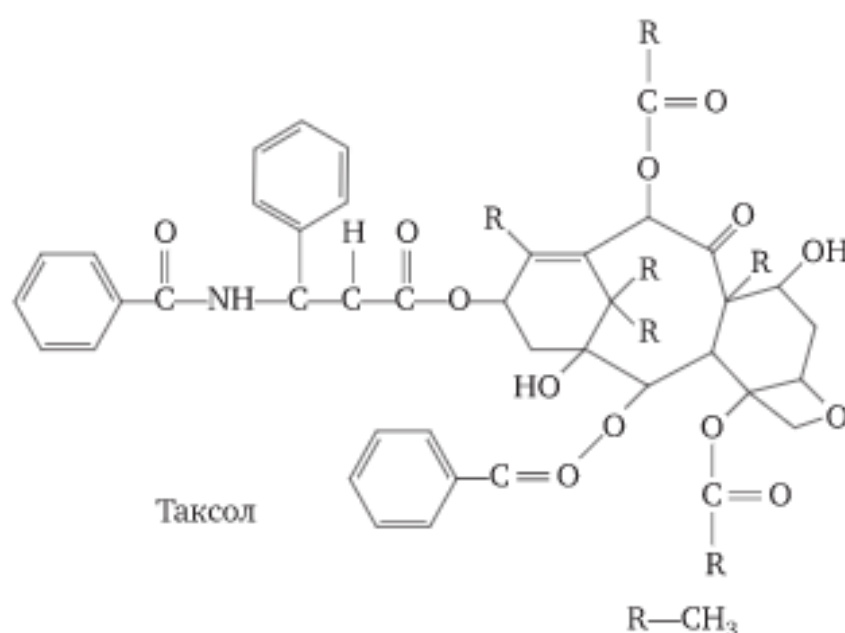


Рис. 2.18. Структурная формула таксола

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. При выращивании клеток корневого происхождения на агаре (*in vitro*) можно получать 0,4 г сухой массы на 1 л среды в день. Биомасса клеток женьшеня в суспензии при выращивании в 50-литровом ферментере увеличивается на 2,0 г в 1 л среды за сутки, что в 1000 раз больше, чем при выращивании на плантации. Учитывая высокую стоимость женьшеня (1 кг плантационного корня стоит 100—150 долл.; цена дикорастущего корня может доходить до нескольких тысяч долларов), биотехнологический способ получения биомассы культуры клеток женьшеня весьма привлекателен.

Вещества вторичного синтеза, как правило, получают из суспензионной культуры, которую выращивают в биореакторах или ферментерах (рис. 2.19).



Рис. 2.19. Ферментеры:
а — лабораторный; б — полупромышленный

По своей конструкции биореакторы бывают барботажные, в которых перемешивание осуществляется путем аэрирования воздухом за счет поднимающихся пузырьков воздуха, и с применением механических перемешивающих устройств (рис. 2.20)¹.

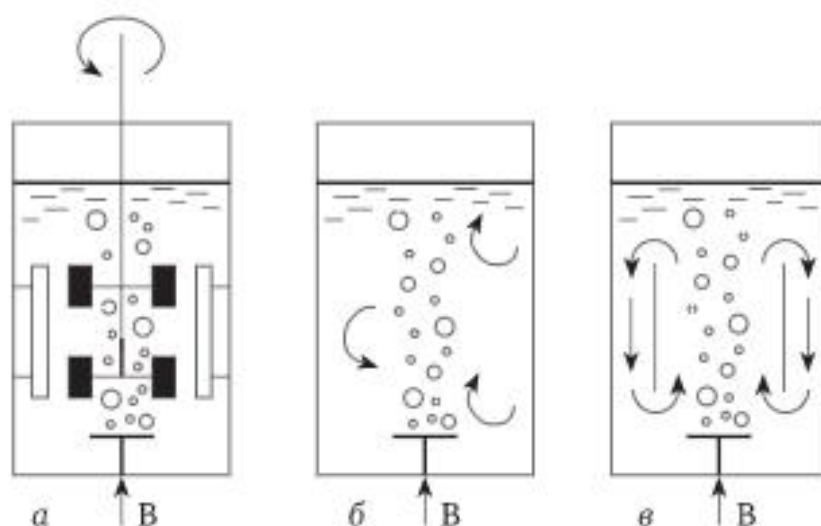


Рис. 2.20. Принципиальные схемы биореакторов, наиболее часто применяемых для культивирования суспензионных культур:
а — биореактор с механическим перемешивающим устройством; б — барботажный биореактор; в — аэролифтный биореактор; В — воздух

¹ Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений ...

Важной характеристикой клеток популяции является ее стабильность в отношении синтеза, транспорта и депонирования метаболитов¹. Стабильность может сохраняться в течение всего времени существования популяции, постепенно уменьшаться за счет постепенного увеличения числа клеток со сниженным синтезом метаболитов и быть нестабильной в случае быстрой потери способности клеток синтезировать вторичные метаболиты.

Исследования показали, что, как правило, синтез вторичных метаболитов происходит во внутриклеточных органеллах: пластидах, хлоропластах, митохондриях, эндоплазматическая ретикула, лейкопластах; транспорт в соседние клетки или питательную среду не происходит, а вакуоли и свободное пространство клетки часто используются для накопления (депонирования) метаболитов.

Количественный и качественный состав вторичных веществ можно менять за счет изменения состава питательной среды при выращивании клеток *in vitro*. Например, на культуре женьшеня было показано, что соотношение различных форм азота в питательной среде влияло на продуктивность стероидных сапонинов. Так, соотношение аммонийного и нитратного азота 1:3 приводило к увеличению биомассы, а соотношение 2:3 не оказывало влияния на продуктивность, но приводило к снижению накопления диосгенина. Повышенные концентрации сахарозы (5 %) в среде более эффективны для роста массы клеток, а пониженные концентрации (1,5 %) — для повышения продуктивности диосгенина. Фитогормоны не оказывают существенного влияния на продуктивность культур по биомассе.

Технология выращивания культур клеток в биореакторах является масштабным процессом, т. е. разрабатываются условия культивирования клеток в биореакторах большого объема. К настоящему времени накопилось много факторов об успешном масштабировании различных культур клеток в биореакторах объемом несколько кубометров. Например, специалисты немецкой фирмы *DIVERSA* (ныне — *FYTON*) осуществили выращивание ряда культур в биореакторах объемом до 75 000 л. В промышленном масштабе в России осуществлено получение биомассы женьшеня на Омутнинском биохимическом заводе в биореакторах объемом до 2,5 м³. В ТОО «Тэмбр» (г. Ярославль) осуществлено проточное культивирование клеток женьшеня в промышленных биореакторах объемом 7,5 м³². В Институте физиологии растений, А. М. Носов с сотрудниками оптимизировали 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.

¹ Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений

² Там же.

В последнее время интерес ученых вызывает получение паклитаксела — основы одного из самых эффективных, но и самых дорогих препаратов для лечения некоторых видов онкологических заболеваний, в том числе рака легкого, яичников и молочной железы. Высокая цена паклитаксела — это не прихоть фармацевтов, а следствие огромных затрат на его производство. В природе это вещество синтезируется клетками коры очень редкого и очень медленно растущего дерева — тихоокеанского тиса. Чтобы выделить количество, которое необходимо для лечения только одного пациента, нужно снять кору с 10—12 взрослых деревьев. В ОАО «БИОХИММАШ» совместно с учеными Института физиологии растений РАН разработана и применяется технология выращивания в ферментерах калусной ткани тиса тихоокеанского, клетки которой способны синтезировать паклитаксел.

10.3. Основные способы культивирования штаммов-продуцентов в биореакторе (ферментерах)

Изучение физиологии штамма-продуцента лежит в основе организации и планирования каждого биотехнологического процесса. Накопление информации о потребностях штамма-продуцента, влияние различных изменений, происходящих в системе культивирования — все эти факторы являются неотъемлемой частью исследований, направленных на оптимизацию условий культивирования.

По мере развития технологии производства, изучения физиологии и биохимии клеток методы их культивирования в лаборатории и в промышленности совершенствовались и видоизменялись. Многие технологические приемы проведения химических реакций оказались пригодными для биотехнологических процессов, прежде всего проведения их в ферментерах со всем необходимым для этого оснащением.

Существует ряд методов культивирования клеток, которые делятся на периодические и непрерывные, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

Преимущества:

- малая стоимость аппарата и системы управления;
- гибкость — возможность наработки в одном биореакторе разных продуктов;
- возможность варьирования временем культивирования клеток в условиях ферментера;
- процесс менее подвержен инфицированию и появлению мутаций клеток из-за отсутствия протока и притока, а также из-за относительно малого времени ферментации;
- процесс удобен для получения малых количеств продукта;

- условия культивирования можно поддерживать в оптимуме как в фазе роста биомассы, так и в фазе биосинтеза продукта. При этом оптимальные условия культивирования для наработки биомассы клеток и конечного продукта могут быть различны;

- процесс удобен для реализации биосинтеза вторичных метаболитов.

Недостатки:

- необходимость получения каллусных или суспензионных клеток;

- возможно продолжительное непродуктивное время ферментации;

- быстро изнашиваются измерительные приборы, особенно датчики величины рН, так как необходимо проводить частую стерилизацию ферментера;

- производительность по биомассе клеток и конечному продукту часто ниже, чем в непрерывном процессе;

- трудно поддерживать необходимые параметры культивирования из-за нестационарности периодического процесса.

Периодическое культивирование. Помещение клеточной биомассы в аппарат для проведения биосинтеза является начальным и очень важным моментом, который может определить успех проведения процесса. Количество засеваемой культуры в аппарат должно обеспечивать активную динамику роста и накопления биомассы в начальный период проведения биосинтеза. Задача заключается в подборе объема посевной культуры (плотность посева), способной быстро заполнить рабочий объем аппарата качественной, хорошо пролиферирующей и морфологически оптимальной культурой клеток. С этой операции начинается каждый периодический цикл ферментации. Для биотехнологических процессов объем засеваемой культуры составляет от 2 до 10 % от рабочего объема аппарата в зависимости от типа клеток.

Динамика роста и накопление биомассы клеточной культуры отслеживается по мере проведения ферментации. Периодические отборы проб позволяют анализировать динамику накопления биомассы, а также потребление компонентов питательной среды. Например, основываясь на динамике потребления углеводов, можно планировать стимулирующие добавки для исследования путей оптимизации процесса и увеличения выхода целевого продукта. По динамике роста и накоплению целевого продукта можно судить о типе процесса, т. е. определять, является ли рост культуры обязательным условием для активного синтеза вещества или культура может накапливать целевой продукт даже после остановки накопления биомассы, синтезируя так называемые вторичные метаболиты.

Эти метаболиты могут образовываться и в том случае, когда состав питательной среды не является оптимальным, однако клетки

в этих условиях способны синтезировать некоторые вещества за счет наличия в среде иных компонентов. Иногда вторичный биосинтез связан с видоизменением нормального роста клеток из-за лимитирования некоторого параметра или ингибирования. Среди вторичных продуктов встречаются вещества клеточной оболочки, производные аминокислот, пептидов, углеводов, нуклеотидов, а иногда их сложные комплексы. Типичными продуктами конструктивного метаболизма второй фазы роста культур являются антибиотики. Вторичными могут быть и продукты энергетического метаболизма. Например, у некоторых бродильных микроорганизмов продуктами первичного метаболизма углеводов часто являются органические кислоты, но при ингибировании роста создающимися экстремально кислыми условиями среды вместо них образуются нейтральные вещества — спирты, кетоны, которые часто и являются целевыми продуктами.

Во вторую фазу могут осуществляться и сверхсинтезы продуктов первой фазы роста культур. Способность к сверхсинтезам продуктов второй фазы особенно сильно выражена у специально полученных мутантов. Последние имеют изменения в генетическом аппарате, препятствующие нормальному метаболизму. В результате этого реакция отклоняется в сторону обильного накопления веществ, необходимых клетке лишь в небольшом количестве. Среди этих веществ могут встречаться ценные продукты.

Кроме генетического контроля вторичного синтеза и сверхсинтеза огромное значение имеет физиологический контроль, или управление метаболизмом популяции. Биохимические механизмы изменения метаболизма обусловлены репрессией и депрессией синтеза определенных ферментов. Эти изменения часто в наибольшей степени выражаются в условиях не оптимальных для роста клеток, но оптимальных для биосинтеза определенного продукта. Для этого некоторые компоненты питательной среды должны быть в недостатке, чтобы основное исходное сырье перерабатывалось биомассой в целевой продукт.

Факторы, лимитирующие рост клеток зачастую могут быть обнаружены случайно. Например, многие антибиотики, образуемые актиномицетами, синтезируются при лимитации роста продуцентов недостатком в среде фосфата, для биосинтеза пенициллина требуется лимитация роста культур глюкозой, а для полимиксина и грамицидина С — молекулярным кислородом. Целенаправленные поиски факторов, необходимых для каждого процесса, лимитирующего или ингибирующего рост продуцентов, значительно сокращают подбор оптимальных условий для их биосинтеза.

Большинство промышленных биотехнологических процессов ведут на сложных средах, часто используя отходы других производств или сельского хозяйства из-за их дешевизны. Естественно, что

и в лабораторных условиях процесс отрабатывается на тех же средах. На сложных средах можно определить фазу наиболее активного биосинтеза целевого продукта, его скорость, продуктивность процесса, выявить оптимальные температуру, pH и степень аэрации. Для оптимизации роста клеток и получения продуктов первой фазы этого достаточно. Однако на сложных средах невозможно выявить лимитирующие рост культур компоненты питания: источники углерода, азота, фосфора и др., недостаток которых приводит к синтезу вторичных метаболитов. Этот вопрос можно решить только на синтетических или полусинтетических средах. Если клеткам необходимы витамины или аминокислоты, то их вносят в среду в небольших количествах, например в виде автолизата или экстракта дрожжей, содержащих почти все витамины и аминокислоты. Если продуцент растет при небольших добавках дрожжевого автолизата, то его можно рассматривать как источник витаминов. Если же автолизат дрожжей требуется в больших количествах, а минеральные соединения азота не используются, то клеточные культуры нуждаются в готовых аминокислотах и (или) других органических веществах.

Если потребности клеток неизвестны, то оптимизация условий питания и понимание физиологии продуцента затруднены. В этом случае необходимо применять методы математического планирования эксперимента, которые ускоряют поиск оптимальных условий, но не заменяют собой изучение физиологии питания продуцента для понимания его потребностей в условиях роста и биосинтеза целевых продуктов.

Непрерывное культивирование. Данный метод основан на постоянной подаче питательной среды в ферментер при выгрузке культуральной жидкости, в которой накоплен целевой продукт. Ввиду того, что объем подаваемой питательной среды равен объему выгруженной культуральной жидкости, в ферментере сохраняется постоянный объем жидкости.

Непрерывное культивирование по принципу делится на две разновидности: процесс полного смешения и процесс полного вытеснения. Непрерывные процессы имеют значительные преимущества перед периодическими: возможность применения специальных аппаратов для каждой операции (стадии) непрерывного процесса, стабилизация его во времени, улучшение качества продукта, легкость регулировки и, главное, возможность автоматизации. Этими преимуществами объясняется тенденция к переходу от периодических процессов к непрерывному культивированию.

Процесс полного вытеснения. Сосуд для выращивания клеток (трубчатый ферментер) представляет собой трубку, расположенную горизонтально или вертикально, в которую поступают питательная среда и клеточная масса и из которой выходит культура клеток. Перемешивание при этом не производится. В этих условиях, напри-

мер, можно культивировать микроорганизмы, не требующие аэрации. С одного конца ферментера, откуда подаются среда и посевной материал, популяция находится в начале своего развития. По ходу трубки культура «стареет», питательные элементы субстрата расходуются, накапливаются продукты метаболизма и на выходе культуры находится в состоянии, аналогичном стационарной фазе роста периодической культуры. Таким образом, в ферментере воспроизводится полная кривая роста, только не во времени, а в пространстве.

Хемостатное культивирование. Это вариант гомогенного проточного культивирования с заданным желаемым коэффициентом разбавления, к которому подстраивается скорость роста культур. Она может быть минимальной или близкой к максимальной. При этом задается также фактор, который обуславливает ограничение концентрации биомассы клеток. Концентрация биомассы определяется определенным компонентом питательной среды. При низком коэффициенте разбавления лимитация, т. е. голодание, будет сильной, а при высоком коэффициенте разбавления — слабой. Однако при высокой скорости роста клетки могут быть более чувствительны к ингибитору. Хемостатный метод культивирования незаменим в лабораторных исследованиях физиологии клеток растений и микроорганизмов. В промышленности он используется при наращивании микробной биомассы, если известно, какой именно фактор ограничивает рост штамма.

Для деления клеток крайне необходимо наличие в питательном субстрате молекулярного кислорода. Он может включаться в процессы конструктивного метаболизма клеток, обеспечивая синтез ими некоторых соединений. Растворимость кислорода в питательной среде незначительна и составляет всего несколько граммов O_2 на m^3 при давлении воздуха, равном $1 \cdot 10^5$ Па. Потребность же клеток в кислороде может составлять десятки килограммов O_2 на кубический метр питательной среды в час. Поэтому при культивировании клеток необходимо непрерывно растворять в среде кислород, что достигается аэрацией ее в ферментере. Необходимость постоянного поддержания в среде концентрации O_2 , при которой не лимитируется аэробный процесс, определяет выбор конструкции и характеристики ферментера для каждого конкретного процесса.

10.4. Ферментеры для получения веществ вторичного метаболизма

Лабораторные ферментеры представляют собой сложную систему механизмов, измеряющих и контролирующую процесс биосинтеза культуры. Аппарат оснащается системой аэрации, осуществление

которой происходит за счет изменения интенсивности перемешивания, подачи воздуха и регулирования давления внутри аппарата, относительно измеряющего количество растворенного кислорода в культуральной жидкости электрода; системой термостатирования; системой измерения pH, а также автоматического поддержания его на заданном уровне с помощью подачи кислот и щелочей в питательную среду. Подача жидкостей в ферментер в основном осуществляется посредством перистальтических насосов. Вся информация по мере проведения процесса записывается на носители в управляющий компьютер, которыми оснащены все современные аппараты для культивирования клеток.

Стандартная комплектация современных ферментеров позволяет решать большинство задач по оптимизации условий культивирования. В зависимости от физических требований к проведению процесса аппараты могут быть модернизированы в более сложные системы для проведения нестандартных процессов вторичного биосинтеза клеток.

Требования к ферментерам. При выборе конструкции ферментера следует учитывать некоторые технические требования:

- ферментер должен быть максимально простым по конструкции и с минимальным числом штуцеров и переточных устройств;
- ферментеру необходимо обеспечить оптимальные гидродинамические и массообменные условия.

Стерилизация ферментера происходит либо в автоклаве, либо стационарно, с помощью подачи острого пара в рубашку аппарата. Время стерилизационного процесса зависит от объема стерилизуемой питательной среды. Коммуникации в этом случае тоже обрабатываются острым паром. После стерилизации происходит медленное остывание ферментера до заданной температуры. При достижении исходных параметров проведения процесса система измерения и контроля над процессом поддерживает параметры в автоматическом режиме. Как правило, после стерилизации ферментер работает в заданном режиме без засева культурой около суток. За это время показания O_2 и pH электродов выходят на стабильный режим измерения уровней. Перед засевом культуры, из ферментера отбирается проба для проведения анализов на стерильность. После теста на наличие посторонней микрофлоры культуру засевают в ферментер.

Помимо основных операций существуют и вспомогательные. В понятие «вспомогательные операции» входят операции, связанные с подготовкой к проведению биосинтеза в ферментере. Как правило, это получение хорошо пролиферирующей культуры, приготовление и стерилизация питательной среды, техническое обслуживание аппарата, калибровка измерительных систем аппарата. Каждую операцию выполняют строго по регламенту во избежание заражения питательной среды посторонней микрофлорой.

Обработка оборудования. При обработке предферментационного оборудования используют производные фенола: алкил-, арил- или хлорфенол. Можно применять водный раствор аммониевой соли первичных и вторичных алкисульфатов (анионактивное вещество) и хлорсодержащие соединения.

Обработка пеногасителей. Пеногасители или другие компоненты, вводимые периодически во время процесса культивирования, можно стерилизовать непосредственно перед подачей в аппарат (импульсный режим). Периодический процесс культивирования длится до 240 ч и более. За период между культивированиями (обычно 12 ч) ферментер и примыкающие трубопроводы промывают и стерилизуют паром с одновременной проверкой на герметичность.

Очистка и стерилизация воздуха. Очистка и стерилизация воздуха, подаваемого на аэрацию, является одним из важнейших факторов дыхания культуры и условия асептики. Воздух из компрессорных установок поступает в маслоотделитель, где и происходит первая ступень очистки, включающая в себя отделение воздуха от масла и механических частиц. Далее воздух, проходя через фильтрующие элементы, стерилизуется и поступает в аппарат с питательной средой. Фильтрующие элементы обычно представляют собой конструкции, наполненные волокнистым материалом, способным задерживать в порах микроорганизмы. Этот тип стерилизации используют в большинстве опытных и промышленных производств. Очистка и стерилизация воздуха осуществляется по принципу уничтожения микроорганизмов, которое достигается использованием высоких температур, ультрафиолетового или ионизирующего излучения, инфракрасного облучения, фенола, оксиэтилена, солей тяжелых металлов.

10.5. Растения — продуценты биологически активных веществ

Растения отличаются от бактерий и, особенно, от животных поразительным многообразием синтетических процессов, конечными продуктами которых является множество соединений самого разного химического строения (многие из них биологически активны). Известны тысячи представителей различных химических классов веществ, и каждый год благодаря прогрессу в методах выделения и физико-химического анализа число их увеличивается.

Биологически активные растительные соединения могут воздействовать различным образом на микроорганизмы, животных и человека. Это послужило основой их использования в медицине и создания из них лекарственных средств. Несомненными пре-

имуществами получения лекарств из растений являются широкий спектр их биологической активности и экологическая безопасность изготовления, что особенно ценно в наше время.

Целебное действие лекарственных растений обусловлено присутствием в них биологически активных веществ, относящихся обычно к продуктам специализированного (вторичного) обмена.

К настоящему времени разделение первичного и вторичного обменов стало достаточно условным. Так, некоторые фитогормоны, каротиноиды, стерины, пренилфосфаты, пренилхиноны, пренилированные белки имеют полностью или частично изопреноидное происхождение и участвуют в росте и развитии всех растительных организмов.

Изучению путей биосинтеза вторичных метаболитов способствовало применение в качестве возможных предшественников более простых соединений, меченных изотопами ^{14}C , ^{13}C , ^{15}N , ^2H . В последнее время особенно широко применяют в качестве метки стабильные, а не радиоактивные изотопы с последующим анализом продуктов методом спектроскопии ядерно-магнитного резонанса.

В современной медицине применяют жирные кислоты и масла, а также полисахариды растительного происхождения, не относящиеся ко вторичным метаболитам. В качестве примера можно упомянуть касторовое масло из семян клещевины, масло облепихи, обладающее ранозаживляющим действием.

Термин «алкалоиды» был предложен в 1819 г. фармакологом М. Майснером для обозначения веществ со щелочными свойствами, отличающихся от обычных щелочей. В настоящее время к алкалоидам относят природные гетероциклические соединения, содержащие в циклах помимо углерода один или более атомов азота, реже — кислорода. В подавляющем большинстве случаев предшественниками алкалоидов являются различные аминокислоты (традиционный строительный материал белков). Аминокислоты в процессе синтеза алкалоидов подвергаются разнообразным ферментативным преобразованиям: их молекулы могут окисляться (отдавая водород или присоединяя кислород), дегидратироваться (отдавать воду), восстанавливаться (присоединять водород), соединяться с различными функциональными группами. Обычно на конечных этапах синтеза происходит одно- или многократная циклизация. Поскольку предшественниками алкалоидов могут быть разные аминокислоты, чаще всего орнитин, лизин, триптофан, фенилаланин, то их биосинтез нельзя представить в виде единой общей схемы, как в случае изопреноидов или фенольных соединений (в этом случае на начальных этапах образуется единый специфичный предшественник — изопренил дифосфат или шикимовая кислота соответственно). Кроме классических путей синтеза алка-

лоидов известно значительное число алкалоидов, биосинтез которых происходит по изопреноидному пути.

Алкалоиды обладают высокой фармакологической активностью, поэтому большинство лекарственных растений относятся к алкалоидоносам. Содержание алкалоидов в растительном сырье обычно невелико — не превышает нескольких процентов, однако имеются исключения. Например, в коре хинного дерева может содержаться до 15—20 % алкалоидов. В растительной клетке алкалоиды могут накапливаться в вакуоли в виде солей широко распространенных органических кислот: яблочной, лимонной, щавелевой. Большинство алкалоидов не обладают горьким вкусом или запахом, некоторые из них окрашены. Алкалоиды могут концентрироваться в различных органах растения. Часто бывает так, что алкалоиды накапливаются не в тех тканях, в которых синтезируются. Примером тому может служить алкалоид никотин, который синтезируется в корнях табака, а оттуда поступает в листья, где и запасается.

Алкалоиды разнообразны по химическому строению и происхождению. К настоящему времени известно более 12 тыс. алкалоидов. По химическому строению гетероциклов в их молекулах алкалоиды делят на следующие основные группы: производные пирролидина и пиперидина, хинолина, изохинолина, индола, имидазола, пурина (так называются гетероциклы, содержащие один или более атомов азота); пептидные алкалоиды; алкалоиды изопреноидного происхождения, в том числе дитерпеновые и стероидные. Отдельные представители каждой из этих групп обладают разной биологической активностью и различным применением в современной медицине.

Среди наиболее известных алкалоидов можно назвать морфин и кодеин, каждый из которых состоит из пяти циклов. Они были выделены из коробочек снотворного мака (*Papaver somniferum* L.). В коробочках данного растения найдено более 20 различных алкалоидов изохинолинового ряда, в том числе морфин, тебаин, кодеин, папаверин и др. Как известно, морфин, обладая болеутоляющим и противошоковым действием, вызывает эйфорию: при его повторном применении развивается болезненное пристрастие к нему — наркомания. Кодеин уменьшает возбудимость кашлевого центра, входит в состав микстуры Бехтерева, пенталгина, седальгина. Папаверин применяется в качестве спазмолитического средства при гипертонии, стенокардии, мигрени.

В горных лесах Крыма, Кавказа, Карпат растет одно из самых ядовитых растений, которое в народе называют «сонная одурь», известное в науке как красавка белладонна (*Atropa belladonna* L.). К настоящему времени из листьев и корней красавки выделили семь различных алкалоидов, главными из которых являются гиосциамин и скополамин. Из красавки готовят медицинские препараты, кото-

рыми пользуются для снятия спазмов гладкой мускулатуры. Самые известные из них бесалол, беллалгин, беллатаминал, солутан, средства, которые применяются для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта.

В современной медицине применяют димерные индольные алкалоиды из барвинка (*Catharanthus roseus* L.) винбластин и винкристин, которые являются одним из наиболее эффективных средств борьбы с раком. Другие индольные алкалоиды резерпин и аймалин из корней растения раувольфии (*Rauwolfia serpentina* L.) широко используют в качестве гипотензивных (понижающих давление) и психотропных средств.

В средние века в Европе для лечения подагры и ревматизма употребляли клубнелуковицы безвременника (*Colchicum autumnale* L.). В 1820 г. из них был выделен алкалоид, названный впоследствии колхицином, а в XX в. из этого растения выделили около 20 различных алкалоидов. В настоящее время колхицин используют в основном не для медицинских целей, а в генетике и селекции растений. Этот алкалоид обладает уникальным свойством: он подавляет клеточное деление, клетки не делятся, но ДНК удваивается, что приводит к увеличению числа хромосом в ядре или полиплоидии клетки. Растения с удвоенным числом хромосом обычно отличаются большим размером и большей продуктивностью. С помощью колхицина были получены наиболее урожайные сорта кормовых трав, свеклы, ржи и других культур. В селекции декоративных, ароматических и лекарственных растений колхицин позволил добиться поразительных результатов.

Упомянутые алкалоиды — лишь незначительная часть представителей соединений данного класса, обладающих различной биологической активностью.

Изопреноиды. Под этим названием объединяются разные по строению соединения, которые по числу представителей превосходят все другие классы вторичных метаболитов, но по фармакологической активности они уступают алкалоидам. Большинство изопреноидов имеют полициклическое строение. Они построены из разветвленных пятиуглеродных изопреновых единиц: $H_2C = C(CH_3) - CH = CH_2$, число которых в молекуле может изменяться от 1 до 1000 и более (в каучуке). Общим специфическим предшественником изопреноидов является изопентенил дифосфат. Он образуется у животных, археобактерий, грибов и в цитоплазме растительной клетки из ацетил-КоА через промежуточную стадию мевалоновой кислоты. У зубактерий и в хлоропластах растений функционирует открытый недавно другой путь образования изопентенил дифосфата: с помощью конденсации глицеральдегид-3-фосфата с продуктом декарбоксилирования пирувиноградной кислоты.

В растениях часто встречаются также соединения, у которых только часть молекулы образуется изопреноидным путем, как, например, в пренилхинонах, хлорофиллах. Изопреноидная боковая цепь, гидрофобная по своим свойствам (имеющая сродство к липидам и растворяющаяся в них), помогает этим физиологически активным соединениям встраиваться в биологические мембраны.

Примером такого рода соединений является открытый в 1980-е гг. новый тип белков — пренилированные белки, у которых к остатку цистеина с С-конца молекулы белка присоединен C_{15} - или C_{20} -изопреноидный остаток. Этот остаток играет роль якоря, закрепляющего белок в мембране. К настоящему времени показано, что около 2 % всех белков пренилированы, причем в их число входят физиологически активные белки.

В последнее время в борьбе с раком возлагаются большие надежды на дитерпеноиды таксанового строения, которые выделяют из коры тисового дерева. Эти соединения — таксолы имеют сложное полициклическое строение, и их невозможно заменить синтетическими препаратами. Они являются чрезвычайно активными цитостатиками, действуя на раковые клетки в очень малых дозах.

Сердечные гликозиды, или карденолиды, образуют самую фармакологически важную группу изопреноидов. Их молекулы построены из стероидной части (агликона) и нескольких сахарных остатков. Наиболее значимыми для медицины растениями — продуцентами карденолидов являются наперстянка и строфант. Из наперстянки пурпуровой (*Digitalis purpurea* L.) и наперстянки шерстистой (*D. lanata* L.) выделено более 50 карденолидов — ланатозидов и пурпуреагликозидов, в том числе дигитоксин. Карденолиды отличаются друг от друга строением агликона и сахарной части, в состав которой кроме глюкозы входят сахара весьма необычного строения (дигитоксоза, цимароза).

Лиана *Strophanthus kombe* L. произрастает во влажных тропических лесах Африки. Местное население с давних времен использовало сок этого растения в качестве яда для стрел. Только в 1937 г. после длительных исследований из семян строфанта выделили природный гликозид К-строфантозид, который широко вошел в медицинскую практику и является незаменимым средством для оказания скорой помощи: он действует на сердце через 1—3 мин после внутривенного введения.

Сердечные гликозиды являются активным началом еще одного широко известного лекарственного растения — ландыша майского (*Convallaria majalis* L.). Его лекарственные свойства известны давно и не утратили своего значения до сих пор. Раньше из ландыша готовили лекарства от водянки, сердечных болезней, эпилепсии, лихорадки. Из ландыша были выделены карденолиды, причем некоторые из них, например конваллотоксин, по активности превосходят

другие сердечные гликозиды — дигитоксин, цимарин. Изучение механизма действия карденолидов на сердце показало, что они влияют на систолическое сокращение мышцы миокарда, воздействуя на транспорт ионов калия и натрия, осуществляемый мембранной АТФ-азой — ферментом, который обеспечивает миокард энергией.

Другие важные для медицины группы изопреноидов представляют собой стероидные и тритерпеновые гликозиды, или сапонины. Их название происходит от способности этих соединений к пенообразованию, вызванному высокой поверхностной активностью сапонинов. Большинство представителей этой группы имеют высокую биологическую активность, которая обуславливает лечебное действие и, соответственно, лекарственное применение таких известных биостимуляторов, как женьшень, солодка, аралия. Подобно сердечным гликозидам, эти соединения также состоят из агликона стероидного или тритерпеноидного строения и сахарной части. Чаще всего в ее состав входят такие сахара, как глюкоза, рамноза, ксилоза, арабиноза.

Женьшень (*Panax ginseng* C. A. Mey) называют корнем жизни. Он известен народной медицине Востока уже несколько тысячелетий. Настойка корней женьшеня обладает тонизирующими, стимулирующими и адаптогенными свойствами, повышает сопротивляемость организма к заболеваниям. Женьшень оказывает благотворный эффект при гипотонии, нервных заболеваниях и депрессиях. Эти свойства особенно важны в наше время, когда условия современной жизни требуют от человека чаще всего не физических, а умственных и эмоциональных усилий. Своим тонизирующим действием женьшень обязан не только комплексу тритерпеновых гликозидов — панаксозидов, а также содержащимся в нем витаминам С, В₁, В₂, пантотеновой, никотиновой и фолиевой кислотам.

Стероидные гликозиды по биологической активности несколько отличаются от тритерпеновых. Они обладают фунгицидными (противогрибковыми), бактерицидными, гемолитическими (разрушающими кровь) свойствами. В последнее время у некоторых представителей этой группы соединений выявлена заметная противораковая активность. Возможность их применения в медицине пока только исследуется, хотя уже сейчас у отдельных стероидных гликозидов отмечены заметная адаптогенная (антистрессовая), антиоксидантная, иммуностимулирующая активности и способность стимулировать овуляцию у животных.

Однако основное значение стероидных гликозидов для современной медицины заключается в том, что они служат исходным сырьем для синтеза многих гормональных и противозачаточных средств. Осуществлять химическим путем общий синтез стероидного ядра с определенными, важными для сохранения биологической активности особенностями стереохимической конфигурации молекулы

чрезвычайно дорого и нецелесообразно. Гораздо удобнее и дешевле использовать уже готовое стероидное ядро, присутствующее в агликоне этих гликозидов. Начиная с 1940-х гг. для получения стероидного сырья в основном используют агликон диосгенин, получаемый в результате кислотного гидролиза гликозидов, накапливающихся в корневищах различных видов лиан из рода *Dioscorea*. В настоящее время более 50 % всех стероидных лекарственных средств (главным образом аналогов кортикостероидов, мужских и женских половых гормонов, а также противозачаточных средств) получают из диосгенина, годовая потребность в котором составляет 1000 т.

Фенольные соединения. Фенольные соединения характеризуются присутствием в молекуле одного или нескольких ароматических циклов, к которым присоединена одна или более гидроксильных групп. Большинство фенольных соединений ведет начало от общего предшественника — шикимовой кислоты, в связи с этим говорят об общем шикиматном пути их биосинтеза.

Шикиматный путь биосинтеза фенольных соединений начинается с продуктов обмена сахаров, образованных в результате фотосинтеза, и проходит несколько стадий до этапа специфического предшественника шикимовой кислоты. Далее из нее образуются ароматические аминокислоты: L-фенилаланин, L-тирозин, L-триптофан. Из L-фенилаланина через промежуточную стадию оксикоричных кислот (фенилпропаноидов) образуются флавоноиды и катехины. В самой многочисленной и широко распространенной в растениях группе фенольных соединений — флавоноидах молекула содержит два ароматических кольца, причем одно из них образуется по шикиматному пути, а второе — из трех молекул активированного ацетата.

Флавоноиды накапливаются во многих лекарственных растениях: в корнях солодки (*Glycyrrhiza glabra* L.), траве пустырника (*Leonurus cardiaca* L.), цветках бессмертника (*Helichrysum arenarium* L.) — и отличаются широким спектром фармакологического действия. Они обладают желчегонным, бактерицидным, спазмолитическим, кардиотоническим действием. В медицине широко используют свойство многих флавоноидов, например рутина, накапливающегося во многих растениях (Р-витаминный эффект), уменьшать проницаемость и ломкость капилляров. У флавоноидов выявлено также противораковое и противолучевое действие, они связывают и выводят из организма радионуклиды.

Отсутствие токсических свойств и избирательность действия на организм человека увеличивает ценность флавоноидных соединений и открывает большое будущее для создания на их основе новых лекарственных препаратов.

Таким образом, мир вторичных растительных веществ богат и разнообразен. К настоящему времени обследовано не более 15 %

всех обитающих на Земле видов растений, а их насчитывается не менее 250 тыс. К сожалению, прогресс цивилизации на нашей планете носит техногенный характер, что неминуемо влечет за собой уничтожение дикорастущей флоры. Исчезают тропические леса Амазонии, тундровая растительность в Европе, почти не осталось таежных лесов. Все это приводит к безвозвратным потерям многих видов растений и присущих только им биологически активных соединений, которые могли бы принести большую пользу медицине будущего. Этих невосполнимых утрат можно избежать, только расширяя фронт исследований в области фитохимии, биохимии растений и биотехнологии.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое вещества вторичного синтеза?
2. Какие преимущества клеточной биотехнологии перед традиционными способами получения веществ вторичного метаболизма?
3. Приведите примеры растений — источника веществ вторичного метаболизма.
4. Как осуществляется культивирование растительных клеток в условиях *in vitro* с целью получения веществ вторичного метаболизма?
5. Какие типы ферментеров вам известны?
6. Что необходимо сделать, чтобы получать штаммы-суперпродуценты?
7. В каких отраслях народного хозяйства применяют вещества вторичного метаболизма?
8. Почему каллусная ткань является хорошим источником для получения веществ вторичного метаболизма?
9. Оцените себестоимость конечного продукта.
10. Приведите примеры промышленных технологий получения веществ вторичного метаболизма.

Ситуационные задачи

1. Назовите факторы, оказывающие влияние на формирование каллусной ткани рыхлого типа, средней плотности и плотного типа. Возможно ли из одного типа плотности каллусной ткани перевести ее в другой?

2. Для подсчета жизнеспособности, степени агрегированности и плотности суспензионной культуры используют камеру Фукса — Розенталя. Рассчитайте плотность суспензионной культуры, если известно, что в первой повторности число клеток в камере составило 125 шт., во второй — 128 шт. и в третьей — 130 шт. Разведение суспензии составляет 10, 15, 18.

3. Рассчитайте прирост суспензионной культуры по объему, массе и с использованием камеры Фукса — Розенталя. Какой из этих способов, по вашему мнению, является более эффективным и точным?

4. Известно, что масса каллусной ткани картофеля в количестве 12 шт. после трех пассажей составляет 3483 мг. Рассчитайте средний прирост одного каллуса, если в начале третьего пассажа масса каллусов составляла 671 мг.

5. Известно, что объем клеток суспензионной культуры моркови в начале пассажа составляет 8,3 мл³, а в конце пассажа — 19,1 мл³. Рассчитайте средний прирост суспензионной культуры и определите конечный объем клеток в конце четвертого пассажа.

6. Рассчитайте интенсивность роста каллусной ткани через 5 недель с начала культивирования, если в начале пассажа вес каллуса составил 112 мг, а в конце пассажа он увеличился в 2,7 раза.

7. Для чего в биотехнологии используют ферментеры? В чем разница между стационарным, проточным и полупроточным ферментером?

Лабораторный практикум

Работа 1. Получение каллусной ткани из листьев табака

Объяснение. Табак является модельным объектом в биотехнологии растений. Это связано с тем, что клетки растений табака обладают высоким морфогенетическим потенциалом, а также хорошо отзывчивы на изменения условий культивирования. Поэтому из листьев табака легко получить хорошо пролиферирующую каллусную ткань.

Каллусную ткань получают из сердцевидной паренхимы, листовых, черешковых и корневых эксплантов. Очень хорошо процесс каллусообразования происходит при поранении листьев. Для получения каллусной ткани можно изолировать листья как с интактных растений, так и с растений *in vitro*. Каллусообразование происходит с разной интенсивностью на средах с 2,4-Д и с НУК. Типы образовавшихся каллусов различаются также по внешнему виду и по способности к регенерации.

Материалы и оборудование: растения табака; этанол, 0,1%-ный раствор сулемы, колбы со стерильной водой (2 шт.), стерильные матрасики, стерильный скальпель, пинцет, пробирки со стерильной питательной средой МС.

Ход работы. Простерилизованные листья табака кладут на стерильный матрасик в ламинар-боксе, стерильным скальпелем вырезают сегменты длиной 1—1,5 см. Для лучшего каллусообразования делают поранения на вырезанных сегментах, после чего их переносят на питательную среду МС, содержащую 2,4-Д или НУК, и помещают в световую комнату или климатическую камеру. Через три недели рассматривают полученные результаты и записывают их в тетрадь.

Работа 2. Культивирование каллусной ткани из зародышей пшеницы

Объяснение. Каллусную ткань, полученную из зародышей пшеницы, применяют для исследований по клеточной селекции. Она может быть использована для получения суспензионной культуры, изолированных протопластов, растений-регенерантов, а также для количественного и качественного исследования вторичных метаболитов.

Материалы и оборудование: замоченные в течение суток зрелые семена пшеницы, пинцет, препаровальные иглы (4 шт.), скаль-

пель, пробирки или чашки Петри со средой МС с добавлением 2,4-Д 3 мг/л — для зрелых зародышей и 2 мг/л — для незрелых; спиртовка, спички, стерильные матрасики или чашки Петри.

Ход работы. Для получения каллуса из зрелых зародышей пшеницы семена, замоченные за сутки до начала работы, стерилизуют в течение 25 мин в 0,1%-ном растворе сулемы или диацита, после чего их тщательно промывают 5 раз стерильной дистиллированной водой, кладут на стерильный матрасик и скальпелем изолируют зародыш. Все операции проводят в ламинар-боксе. Изолированные зародыши помещают на агаризованную питательную среду МС в пробирки или чашки Петри. Культивируют зародыши в климатической камере или световой комнате при температуре 25 °С. Через 3 недели рассматривают и зарисовывают образовавшийся каллус.

При получении каллусной ткани из незрелых зародышей их изолируют на 12-е сутки от начала цветения пшеницы. Семена стерилизуют 0,1%-ным раствором сулемы или диацита 7 мин с последующей пятикратной промывкой стерильной дистиллированной водой. С помощью препаровальной иглы и скальпеля изолируют асептически зародыши на стерильном матрасике или в чашке Петри. Зародыш переносят на питательную среду МС с добавлением 2 мг/л 2,4-Д. Пробирки или чашки Петри со стерильными зародышами помещают в климатическую камеру или световую комнату, где поддерживается температура 25 °С. Через 3 недели рассматривают и зарисовывают результаты.

Работа 3. Пассирование каллусной ткани и снятие ее ростовых характеристик (на примере картофеля)

Объяснение. Пассирование (пересадка) каллусной ткани проводится (в зависимости от интенсивности роста) по истечении 4—6 недель. Обычно цикл выращивания равняется 4 неделям. За это время для построения кривой роста каллус взвешивают 4 раза (через 7 суток), повторность трехкратная. Кроме снятия ростовых характеристик необходимо отмечать цвет и консистенцию каллусной ткани. Каллусная ткань картофеля в зависимости от сорта, применяемых гормонов и условий культивирования имеет белый, желтый, серый, светло-коричневый цвет, по мере старения он темнеет. Консистенция ткани бывает рыхлой и плотной. Для образования суспензии предпочтительнее использовать хорошо пролиферирующий, рыхлый каллус. Плотная каллусная ткань обычно применяется для морфогенеза.

Материалы и оборудование: каллусная ткань в чашках Петри; стерильные инструменты (скальпель, пинцет), стерильная бумага, фольга, чашки Петри со средой МС для культивирования каллусной ткани (3 шт.), аналитические весы, спирт в фарфоровом стаканчике, спиртовка, спички.

Ход работы. Открыть чашку Петри, пинцетом извлечь из нее каллусную ткань и перенести ее на пустую стерильную чашку Петри для деления на кусочки. Разделить каллусную ткань примерно по 100—150 мг. Аналитические весы протирают спиртом изнутри. На стерильной фольге осуществляют взвешивание каллусной ткани, которую затем помещают в чашки Петри на питательную среду. Чашки закрывают пищевой пленкой и помещают в световую комнату. Через 4 недели каллусную ткань стерильно взвешивают. Интенсивность роста (ИР) каллусной ткани рассчитывают по формуле

$$\text{ИР} = \frac{\text{Сырая масса 2} - \text{сырая масса 1}}{\text{Сырая масса 1}} \cdot 100,$$

где сырая масса 1 — масса каллусной ткани в начале пассажа, мг; сырая масса 2 — масса каллусной ткани в конце пассажа, мг.

Работа 4. Индукция стеблевого органогенеза в культуре каллусной ткани картофеля

Объяснение. Для индукции органогенеза каллусную ткань, полученную из стеблевого или листового экспланта стерильного растения картофеля (второй и последующие пассажи), пересаживают на среду с высоким содержанием цитокининов, а для укоренения образовавшихся побегов используют среду с повышенным содержанием ауксинов. Индукция морфогенеза и регенерация растений — сложный, многоступенчатый процесс. У картофеля его можно подразделить на несколько стадий: индукция зеленых меристематических зон, появление почек *de novo*, формирование микропобегов с последующим их укоренением. Чем моложе каллусная культура (т. е. чем меньше времени прошло с момента ее получения), тем больше ее регенерационная способность. Состав сред для индукции морфогенеза и регенерации растения разных сортов картофеля неодинаковый, но общим правилом является повышенное содержание цитокининов (зеатина или БАП).

Материалы и оборудование: стерильные чашки Петри или пробирки, колба со средой для морфогенеза, длинный или короткий пинцет, стерильный матрасик, каллус картофеля в пробирке или чашки Петри, спиртовка, спички, вата.

Ход работы. Каллус вынимают из пробирки или чашки Петри, помещают на стерильный матрасик, разделяют ткань на кусочки размером 5×5 мм, после чего стерильным пинцетом переносят их на агаризованную питательную среду для индукции морфогенеза. Пробирку закрывают пробкой (в случае использования чашек Петри их закрывают парафилмом) и ставят в световую комнату с температурой 20—25 °С, освещенностью 3 тыс. лк и влажностью воздуха 70 %. Через 1 неделю отмечают появление структурированных очагов, а через 3—5 недель — меристематических зон ярко-

зеленого цвета. Через следующие 1—2 недели отмечают появление апексов. Записывают количество апексов на каждом каллусе. При дальнейшем культивировании апексы превращаются в микропобеги. На одном экспланте может дифференцироваться до нескольких десятков побегов. Когда они достигнут высоты 10 мм, их отделяют от каллусной ткани и переносят на среду для укоренения. Через 5—10 дней отмечают появление корней.

Раздел III

СОХРАНЕНИЕ

БИОРАЗНООБРАЗИЯ

РАСТЕНИЙ *IN VITRO*

В результате изучения учебного материала данного раздела обучающиеся должны:

знать

- этапы и методы клонального микроразмножения растений;
- факторы, влияющие на эффективность клонального микроразмножения;
- особенности размножения *in vitro* двудольных и однодольных растений;
- методические и теоретические аспекты тестирования растений на содержание вирусов;
- методы математического планирования эксперимента;

уметь

- составлять питательные среды для клонального микроразмножения однодольных и двудольных растений;
- подбирать условия для клонирования растений;
- размножать растения в условиях *in vitro*;
- получать генетически однородный, безвирусный посадочный материал;
- управлять процессом клонирования растений;

владеть

- технологиями производства безвирусного посадочного материала;
 - технологиями размножения растений в условиях *in vitro*.
-

Глава 11

ЭТАПЫ И МЕТОДЫ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ

Для семенных растений характерны два способа размножения: семенной и вегетативный. Оба эти способа имеют как преимущества, так и недостатки. К недостаткам семенного размножения следует отнести, в первую очередь, генетическую пестроту получаемого посадочного материала и длительность ювенильного периода. При вегетативном размножении сохраняется генотип материнского растения и сокращается продолжительность ювенильного периода. Однако для большинства видов (в первую очередь для древесных пород) проблема вегетативного размножения остается до конца не решенной. Это обусловлено следующими причинами: 1) не все породы, даже на ювенильной стадии, могут размножаться вегетативным способом с требуемой эффективностью (дуб, сосна, ель, орехоплодные и др.); 2) практически невозможно с помощью черенкования размножать многие виды древесных пород в возрасте старше 10—15 лет; 3) не всегда удается получать стандартный посадочный материал (возможность накопления и передачи инфекции); 4) операции при размножении взрослых (древесных) растений с помощью прививок трудоемки и сложны; 5) разработанные технологии неэффективны для получения достаточного количества генетически однородного материала в течение года.

Недостатки семенного и вегетативного способов размножения возможно устранить путем применения метода *клонального микро-размножения* — размножения растений генетически идентичных исходному экземпляру неполовым путем в условиях *in vitro*. Данный метод позволяет получать генетически однородный посадочный материал, свободный от вирусов, и иметь высокий коэффициент размножения. В настоящее время данное направление исследований имеет практическое применение при размножении декоративных цветов, а также плодовых и сельскохозяйственных культур.

В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, т. е. под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму. Этот метод, несомненно, имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- получение генетически однородного посадочного материала;

- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
- высокий коэффициент размножения (10^5 — 10^6 — для травянистых, цветочных растений, 10^4 — 10^5 — для кустарниковых древесных, 10^4 — для хвойных);
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- возможность автоматизации процесса выращивания (рис. 3.1).

Первые достижения в области клонального микроразмножения были получены в конце 1950-х гг. французским ученым Ж. Морелем, которому удалось получить первые растения — регенеранты орхидей. Успеху Мореля в микроразмножении способствовала уже разработанная к тому времени техника культивирования апикальной меристемы растений в условиях *in vitro*. Как правило, исследователи в качестве первичного экспланта использовали верхушечные меристемы травянистых растений: гвоздики, хризантемы, подсолнечника, гороха, кукурузы, одуванчика, салата — и изучали влияние состава питательной среды на процессы регенерации и формирования растений. Ж. Морель в своих работах также использовал верхушку цимбидиума (сем. Орхидные) состоящую из конуса нарастания и двух-трех листовых зачатков, из которой при определенных условиях наблюдал образование сферических сфер — протокормов. Сформировавшиеся протокормы можно было делить и затем культивировать самостоятельно на вновь приготовленной питательной среде до образования листовых примордиев и корней. В результате он обнаружил, что этот процесс бесконечен и можно получать в большом количестве высококачественный и генетически однородный, безвирусный посадочный материал.

В нашей стране работы по клональному микроразмножению были начаты в 1960-х гг. в лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН. Под руководством профессора Р. Г. Бутенко были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы, фрезии и некоторых других растений и предложены промышленные технологии.

Однако область применения микроразмножения разнообразна и имеет тенденцию к постоянному расширению. Это в первую очередь относится к размножению *in vitro* взрослых древесных пород, особенно хвойных, и использование техники *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов лекарственных растений. В настоящее время в этом направлении наметился положительный сдвиг.

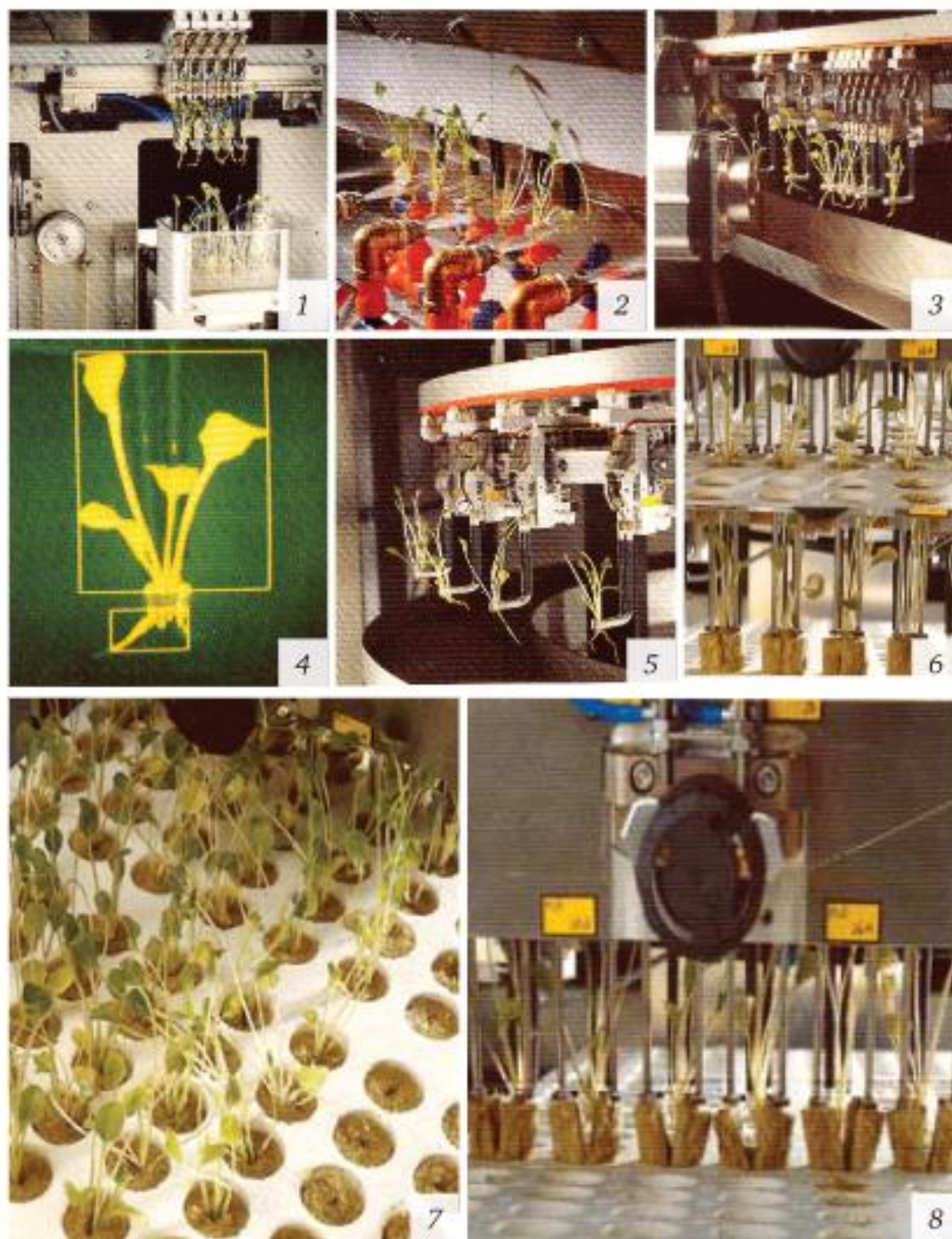


Рис. 3.1. Автоматизация процесса клонального микроразмножения растений:
 1 — выемка микрорастений из сосуда с питательной средой; 2 — отмывка остатков питательной среды; 3, 4 — автоматическая оценка качества микрорастений; 5 — транспортировка микрорастений; 6 — процесс посадки в кассеты с торфяным субстратом; 7 — вид кассеты с микрорастениями; 8 — вид посадочной головки агрегата сбоку

Таким образом, первые успехи в клональном микроразмножении связаны с культивированием апикальных меристем травянистых растений на соответствующих питательных средах, обеспечивающих в конечном счете получение растений-регенерантов.

Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 1920-х гг. и связаны с именем французского ученого Р. Готре. В них сообщалось о способности камбиальных тканей некоторых видов вяза и сосны к каллусогенезу *in vitro*. В последующих работах 1940-х гг. была обнаружена способность различных тканей вяза листового к образованию адвентивных почек. Однако дальнейший рост и формирование побегов авторами получены не были. Лишь к середине 1960-х гг. А. Матесу удалось получить первые растения-регенеранты осины, которые были доведены до почвенной культуры. Культивирование тканей хвойных пород *in vitro* долгое время использовалось как объект исследования. Это было связано со специфическими трудностями культивирования ювенильных и тем более взрослых тканей, изолированных с растения. Известно, что древесные, особенно хвойные, характеризуются медленным ростом, трудно укореняются, содержат большое количество вторичных соединений (фенолы, терпены и другие вещества), которые в изолированных тканях окисляются различными фенолазами. В свою очередь, продукты окисления фенолов обычно ингибируют деление и рост клеток, что ведет к гибели первичного экспланта или к уменьшению способности тканей древесных пород к регенерации адвентивных почек, которая с возрастом растения-донора постепенно исчезает полностью. Однако несмотря на все трудности ученые все чаще используют в качестве объектов исследований различные ткани и органы древесных растений. В настоящее время насчитывается более 200 видов древесных растений из 40 семейств, которые были размножены *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, осина, гибриды тополей с осинкой, сосна, ель, секвойя и др.), а работы в этом направлении ведутся в научных учреждениях Москвы, Санкт-Петербурга, Воронежа, Уфы, Новосибирска, Архангельска, Ялты и др.

11.1. Этапы клонального микроразмножения растений

Независимо от того, какая цель поставлена перед исследователем — научная или коммерческая, весь процесс клонального микроразмножения можно разделить на четыре этапа: 1) выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры; 2) собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества мериклонов; 3) укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2, +10 °C); 4) выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле (рис. 3.2).

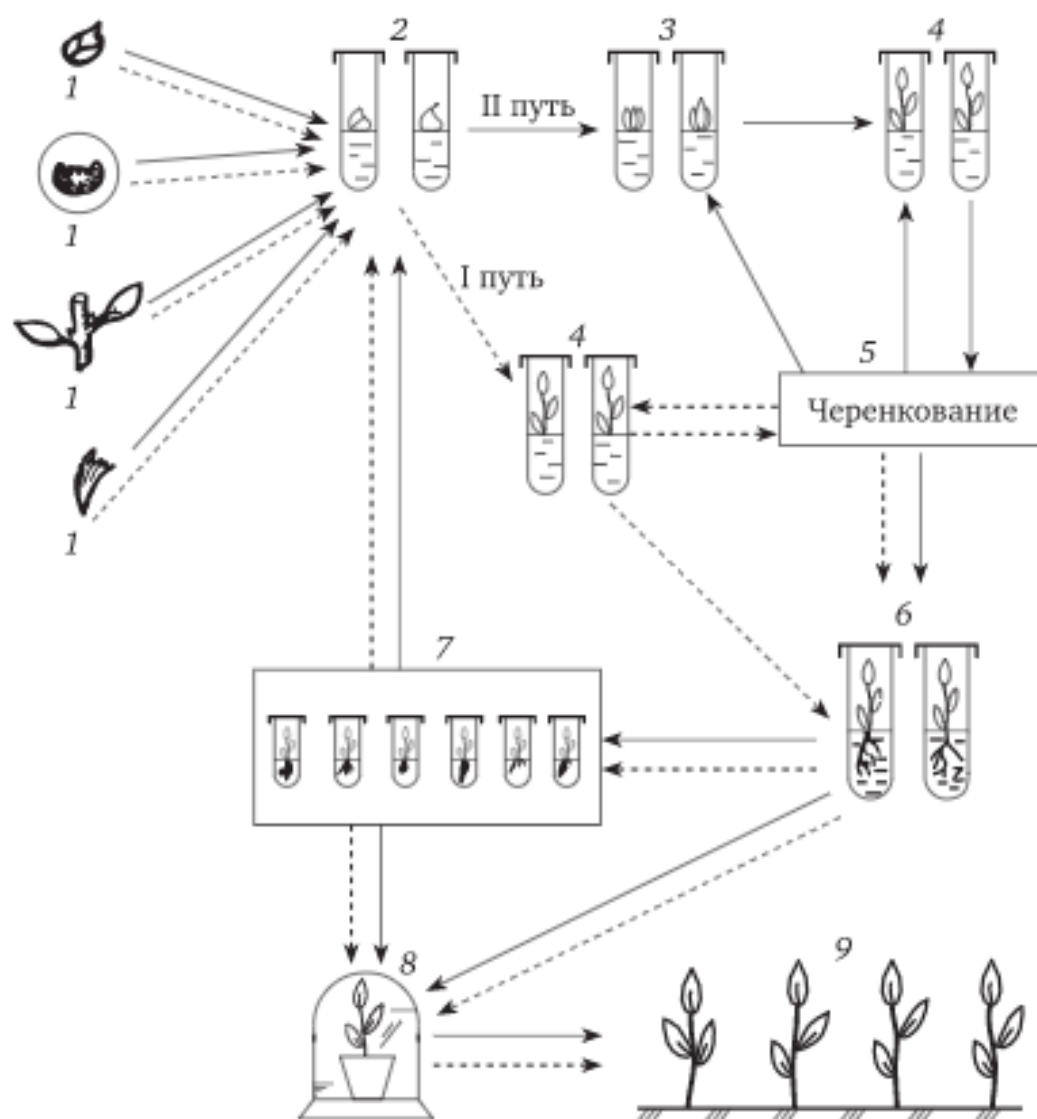


Рис. 3.2. Схема клонального микроразмножения растений методом активации развития существующих меристем (I путь), индукция образования адвентивных почек на первичном экспланте (II путь):

1 — выбор исходного экспланта; 2 — получение стерильной культуры; 3 — образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте; 4 — рост почек и формирование микропобегов; 5 — размножение микропобегов (микрочеренкование); 6 — укоренение микропобегов; 7 — депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2 °C); 8 — перевод растений в тепличные условия; 9 — высадка растений-регенерантов в поле

11.2. Методы клонального микроразмножения растений

Существует много методов клонального микроразмножения. Различные авторы, проводя индивидуальные исследования по влиянию условий культивирования эксплантов на процессы морфогенеза, наблюдали разные ответные морфогенетические реакции на изменение условий выращивания, что в свою очередь привело

к созданию новых классификаций методов клонального микроразмножения. Исходя из предложенных в литературе методов микроразмножения растений этот процесс возможно осуществлять следующими путями:

- активация развития уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные или спящие почки);
- индукция образования адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;
- индукция соматического эмбриогенеза;
- дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Основной метод — первый, используемый при клональном микроразмножении растений, — это активация развития уже существующих в растении меристем, основывающаяся на снятии апикального доминирования (рис. 3.3). Это может быть достигнуто двумя путями: а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде; б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин), а также 2-изопентениладенин (2iP) и зеатин. Полученные таким образом побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.

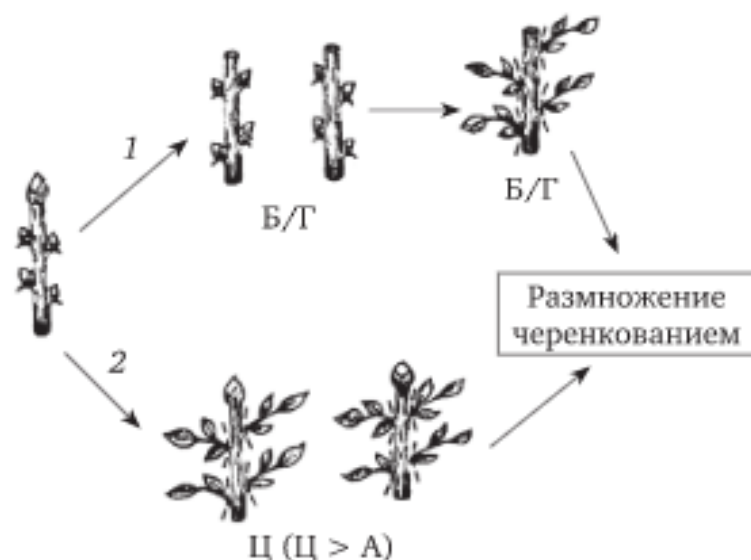


Рис. 3.3. Схема размножения растений методом активации развития существующих меристем:

- 1 — удаление верхушечной меристемы;
 2 — добавление в питательную среду цитокининов
 (Б/Г — безгормональная среда, Ц — цитокинины, А — ауксины)

В настоящее время этот метод широко используется в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур — как технических (сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стахис), так и овощных (томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.); а также для размножения культур промышленного цветоводства (гвоздика, хризантема, роза, гербера), тропических и субтропических растений (рододендрон, азалия, камелия, чай и др.), плодовых и ягодных культур (яблоня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, крыжовник и др.) и древесных растений (тополь, ива, ольха, береза, рябина, секвойя, туя, можжевельник и др.). Для некоторых сельскохозяйственных культур, таких как картофель, технология клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. Применение метода активации развития существующих в растении меристем позволяет получать из одной меристемы картофеля более 10^5 растений в год, причем технология предусматривает выращивание в пробирках микроклубней — ценного, безвирусного семенного материала (рис. 3.4).

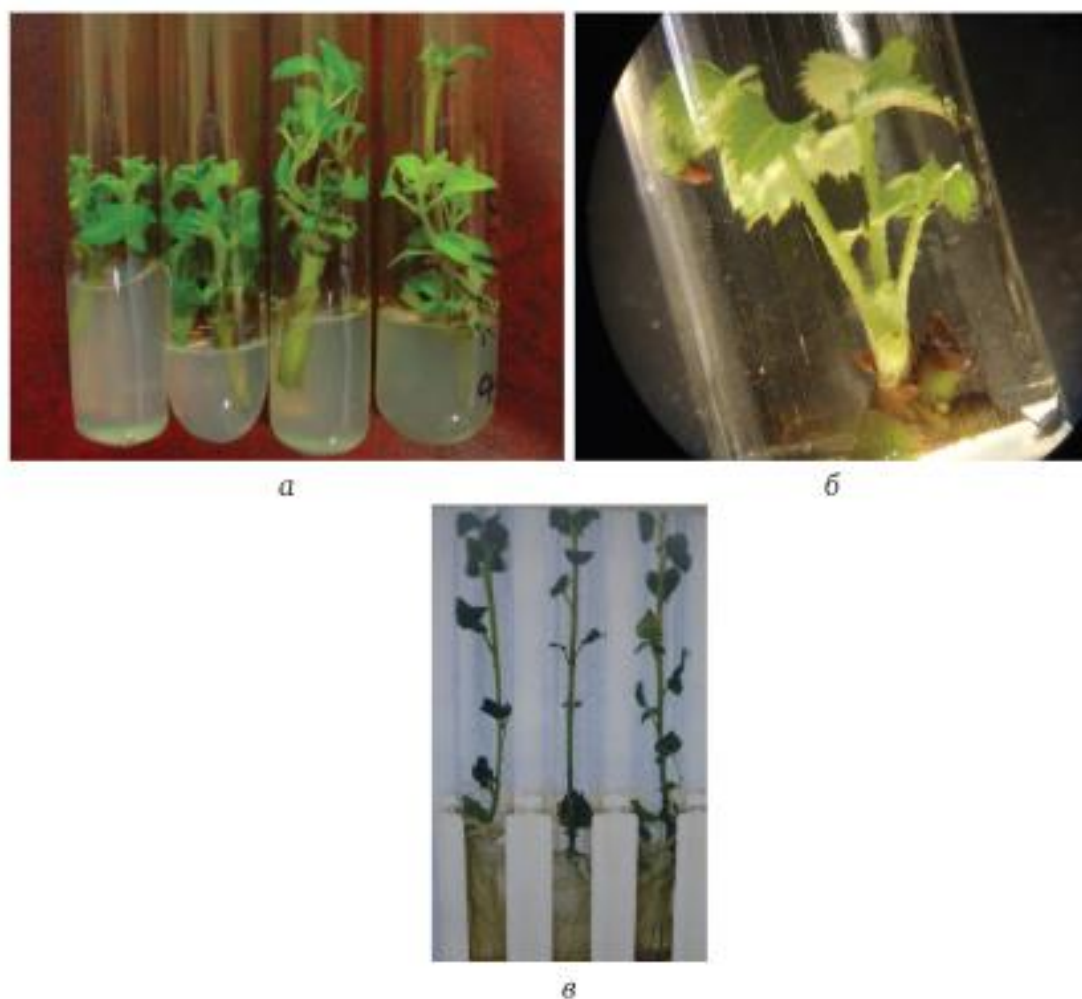


Рис. 3.4. Размножение растений *in vitro* методом активации развития существующих меристем:

а — фуксия; б — роза; в — картофель

Второй метод — это индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта. Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и, таким образом, регенерировать целые растения. Образования адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий), если их удастся получить свободными от инфекции. Этот процесс, как правило, происходит на питательных средах, содержащих один цитокинин или в сочетании с ауксином, находящихся в соотношении 10:1 или 100:1. В качестве ауксина в этом случае наиболее часто используют β -индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) или α -нафтилуксусную кислоту (НУК). Это наиболее распространенный метод микроразмножения высших растений, которым были размножены многие луковичные цветочные растения (нарциссы, лилии, гиацинт, гладиолусы, тюльпаны) из луковичных чешуи, сегментов базальной части донца луковиц, эксплантов листьев; представители рода *Brassica* (капуста цветная, кочанная, брюссельская, листовая, брокколи) — из сегментов гипокотыля, семядолей, листьев; лук, чеснок — из верхушечной меристемы, ткани донца луковиц; томаты — из апикальных или пазушных меристем; салат цикорный — из сегментов листовых пластинок; петуния — из сегментов корней; глоксиния, фиалки — из сегментов листовых пластинок, а также некоторые представители древесных растений — из изолированных зрелых и незрелых зародышей (рис. 3.5).

Довольно хорошо разработана технология клонального микроразмножения земляники, основанная на культивировании апикальных меристем (рис. 3.6). Меристематические верхушки изолируют из молодых, свободных от вирусных болезней, растений и выращивают на модифицированной питательной среде Мурасига и Скуга, содержащей БАП в концентрации 0,1—0,5 мг/л. Через 3—4 недели культивирования меристема развивается в проросток, в основании которого формируются адвентивные почки, которые быстро растут и дают начало новым почкам. В течение 6—8 недель образуется конгломерат почек, связанных между собой соединительной тканью и находящихся на разной стадии развития. Появляются листья на коротких черешках, в нижней части которых формируются новые адвентивные почки. Эти почки разделяют и пересаживают на свежую питательную среду. На среде с цитокинином продолжается пролиферация придаточных побегов, а на среде без регуляторов роста в течение 4—6 недель формируются нормальные растения с корнями и листьями. Морфогенетическая активность экспланта сохраняется в течение 3—4 лет. Таким образом, от одного материнского растения можно получать несколько миллионов растений-регенерантов в год.

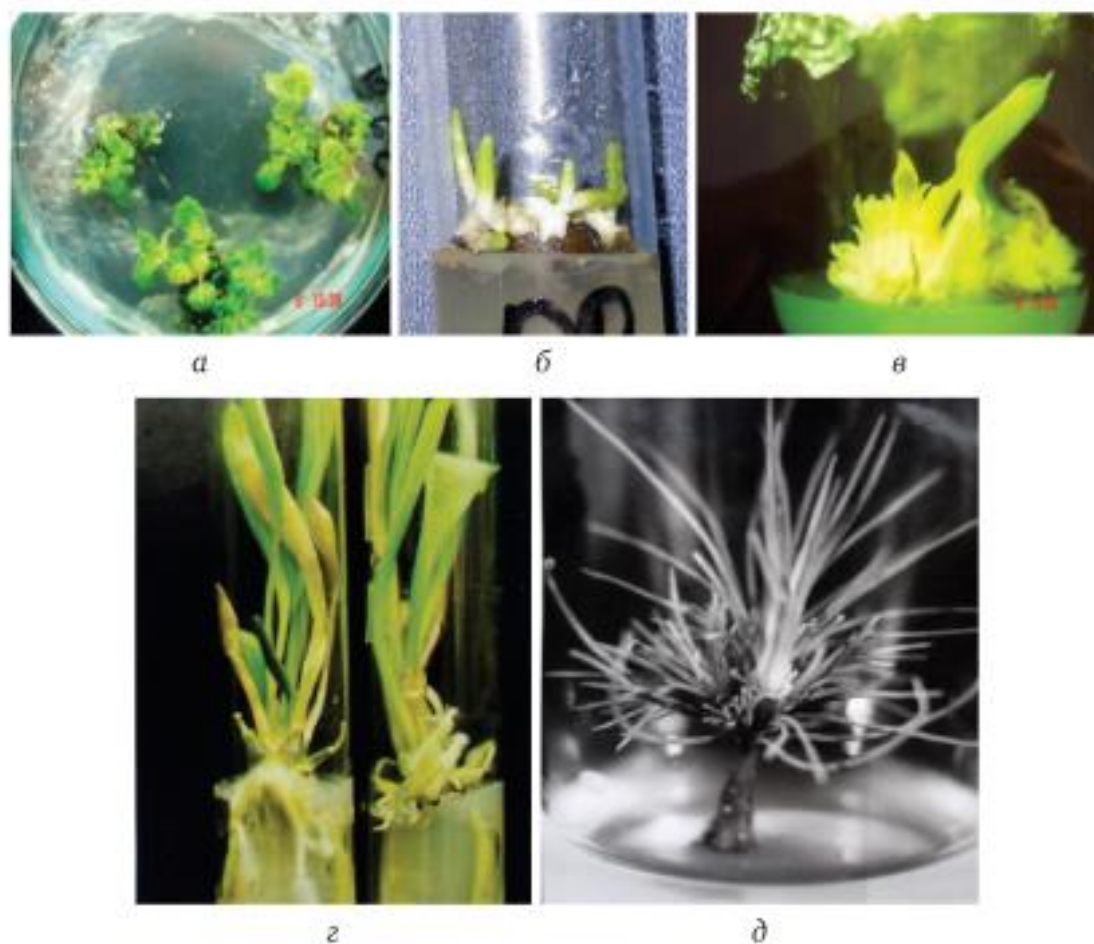


Рис. 3.5. Размножение растений *in vitro* методом индукции образования адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте:
 а — сенполии; б — гиацинты; в — фритиллярии; г — лилии; д — сосна

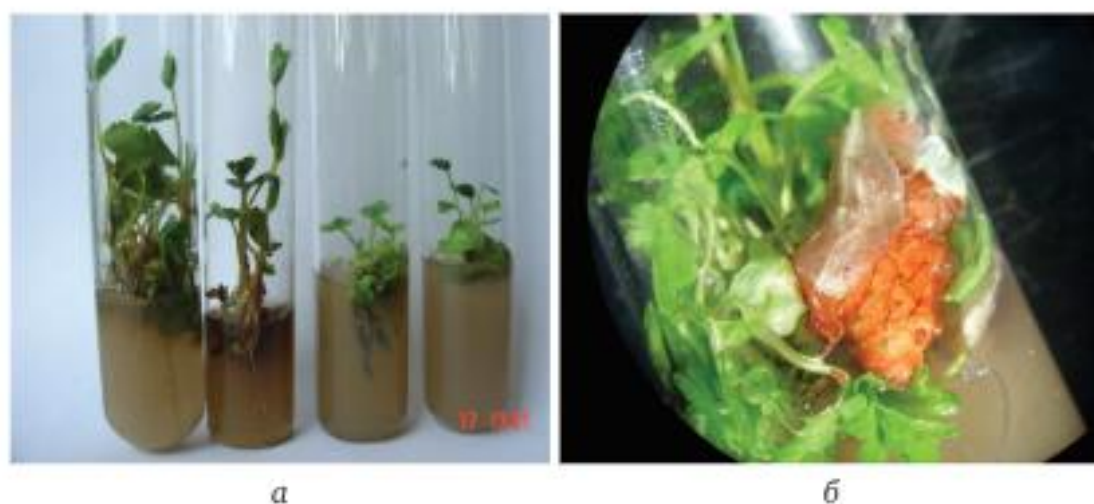


Рис. 3.6. Клональное микроразмножение земляники:
 а — пробирочные растения земляники; б — формирование ягод *in vitro*

Несомненный интерес у исследователей вызывает вопрос, связанный с происхождением адвентивных почек, в частности — какие

клеточные слои участвуют в дифференциации меристем. Единого мнения по этому вопросу пока нет. Так, Тран Тан Ван в своих работах с тканями табака показала, что именно эпидермис является наиболее активной тканью, способной образовывать почки, каллус или корни в зависимости от гормонального баланса питательной среды. Цитологические исследования, проведенные на сегментах базальной части донца луковиц тюльпанов и нарциссов, показали, что адвентивные побеги формируются из поверхностных слоев меристематических клеток, прилегающих к донцу, а для растений глоксии процесс формирования адвентивных почек, как правило, происходит в субэпидермальных клеточных слоях листовых пластинок. Единого мнения по этому вопросу также нет и среди исследователей, работающих с древесными растениями. Так, было показано, что образование почек на изолированной хвое ели обыкновенной происходит в эпидермальном слое культивируемого экспланта, для псевдотсуги — в субэпидермальных слоях, а при культивировании семян сосны замечательной на среде, содержащей один цитокинин (БАП), этот процесс происходит одновременно как в эпидермальном, так и в субэпидермальном слоях. Для сосны обыкновенной также было отмечено образование адвентивных почек в эпидермальном и субэпидермальном слоях семян зародыша (рис. 3.7), и этот процесс для сосны не зависит от применяемых цитокининов.



Рис. 3.7. Образование адвентивных почек в эпидермальном и субэпидермальном клеточных слоях экспланта

Третий метод, практикуемый при клональном микроразмножении, основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему внешнему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название «соматический эмбриогенез». Основное отличие образования зародышей *in vitro* от *in vivo* (в естественных условиях) заключа-

ется в том, что соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по своему внешнему виду напоминают биополярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апикальных меристем стебля и корня. В настоящее время используется для размножения большинства растений из семейства *Orchidaceae* и *Rutaceae*, некоторых представителей злаковых (пшеница, ячмень), люцерны, редиса, винограда, а также некоторых видов древесных пород (осина, эвкалипт, дуб, ель обыкновенная).

Формирование эмбриоидов в культуре тканей происходит в два этапа. На первом этапе клетки экспланта дифференцируются за счет добавления в питательную среду ауксинов, как правило, 2,4-Д, и превращаются в эмбриональные. На следующей стадии необходимо заставить сформировавшиеся клетки развиваться в эмбриониды, что достигается путем уменьшения концентрации ауксина или полного его исключения из состава питательной среды. Соматический эмбриогенез возможно наблюдать непосредственно в тканях первичного экспланта, а также в каллусной культуре. Причем последний способ менее пригоден при клональном микроразмножении, так как посадочный материал, полученный таким методом, будет генетически нестабилен по отношению к растению-донору. Как правило, соматический эмбриогенез происходит при культивировании каллусных клеток в жидкой питательной среде (суспензия) и является наиболее трудоемкой операцией, так как не всегда удается реализовывать свойственную клеткам тотипотентность. Однако этот метод размножения имеет свои преимущества, связанные с сокращением последнего (третьего) этапа клонального микроразмножения, не требующего подбора специальных условий укоренения и адаптации пробирочных растений, так как соматические зародыши представляют собой полностью сформированные растеньица. При использовании соответствующей техники их капсулирования из этих эмбриоидов можно получать искусственные семена (рис. 3.8).

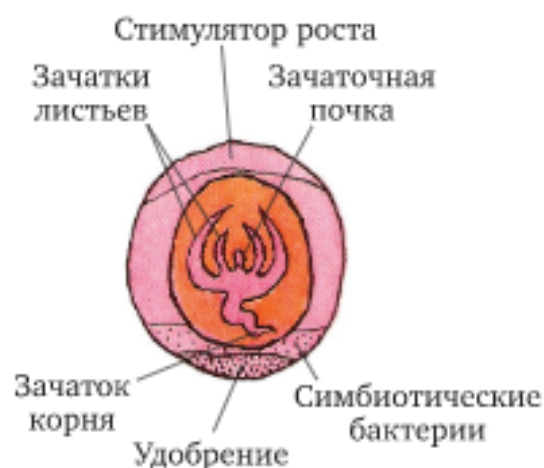


Рис. 3.8. Схематическое изображение искусственных семян

Четвертый метод клонального микроразмножения — дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани (рис. 3.9). Он мало используется для получения посадочного материала *in vitro*. Это связано с тем, что при периодическом пересаживании каллусной ткани на свежую питательную среду часто наблюдаются явления, нежелательные при микроразмножении: изменение ploидности культивируемых клеток, структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций, потеря морфогенетического потенциала культивируемыми клетками. Наряду с генетическими изменениями растений наблюдаются и морфологические: низкорослость; неправильное жилкование листьев и их расположение по стеблю; образование укороченных, утолщенных междоузлий; уродливость; пониженная устойчивость к болезням и вредителям. Причем длительное культивирование каллусных клеток усугубляет эти изменения, поэтому период неорганизованного роста при микроразмножении должен быть сведен к минимуму.

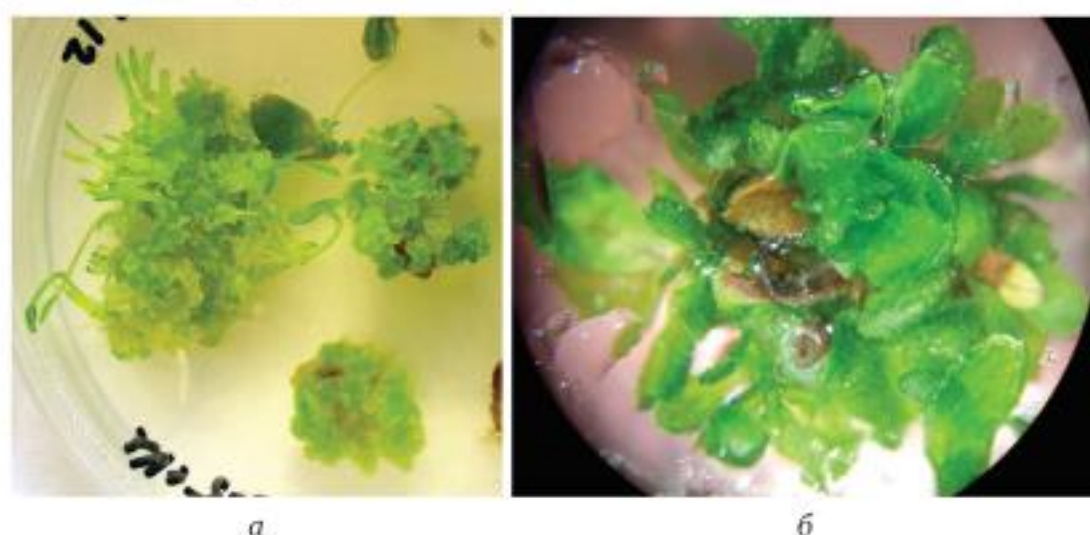


Рис. 3.9. Регенерация растений из первичной каллусной ткани:
а — морковь; б — хризантема

Однако несмотря на некоторые недостатки, данный метод имеет положительные стороны и преимущества. Во-первых, он является эффективным и экономически выгодным, так как в процессе размножения из каждой индивидуальной каллусной клетки при благоприятных условиях культивирования может сформироваться адвентивная почка, дающая начало новому растению. Во-вторых, в ряде случаев он является единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. В-третьих, он представляет большой интерес для селекционеров, так как растения, полученные таким методом, различаются генетически и морфофизиологически. Это дает возможность селекционерам проводить отбор растений по хозяйственно важным признакам и оценивать их поведение

в полевых условиях. Этот метод целесообразно применять лишь к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, а вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. К таким растениям можно отнести амариллис, томаты, спаржу, некоторые древесные породы и другие культуры. Через каллусную культуру были размножены: сахарная свекла, некоторые представители рода *Brassica*, кукуруза, рис, пшеница и другие злаковые, подсолнечник, лен, разработаны условия, способствующие регенерации растений из каллуса огурца, картофеля, томатов.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое клональное микроразмножение растений?
2. Назовите основные преимущества клонального микроразмножения растений.
3. Из каких этапов складывается процесс клонального микроразмножения?
4. Перечислите основные методы клонального микроразмножения.
5. В чем отличие метода индукции развития существующих меристем от метода индукции образования адвентивных почек?
6. Какой из методов клонального микроразмножения всегда гарантирует вам получение генетически однородного посадочного материала?
7. Какой этап клонального микроразмножения отсутствует при соматическом эмбриогенезе?
8. Какие клеточные слои участвуют в процессе дифференциации меристематических тканей адвентивных почек?
9. Приведите примеры размножения растений в условиях *in vitro* в промышленных масштабах.
10. Каково практическое применение клонального микроразмножения в растениеводстве?

Глава 12

ТЕХНИКА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ЭКСПЛАНТОВ НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ

Для культивирования тканей на каждом из четырех этапов требуется применение определенного состава питательной среды.

I этап. На этом этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Это осуществляется путем стерилизации растительных тканей ртутьсодержащими растворами (сулема или диацид, 0,1—0,2 %) или хлорсодержащими (хлорамин, 10—15 %, гипохлорит натрия или кальция, 5—10 %) в течение 5—10 мин для нежных, легко повреждаемых тканей растений и 10—12 мин — для тканей, имеющих более плотную оболочку. После этого растительные ткани необходимо тщательно промыть в стерильной дистиллированной воде, как правило, в трех порциях и перенести на заранее приготовленную стерильную питательную среду. Если исходную стерильную культуру экспланта получить трудно, то рекомендуется вводить в состав питательной среды антибиотики (тетрациклин, бензилпенициллин и др.) в концентрации 100—200 мг/л. Это в первую очередь относится к древесным растениям, у которых наблюдается тенденция к накоплению внутренней инфекции.

На первом этапе, как правило, используют среду, содержащую минеральные соли по прописи МС, а также различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. В случае когда наблюдается ингибирование роста первичного экспланта за счет выделения им в питательную среду токсичных веществ (фенолов, терпенов и других вторичных соединений), усилить его рост можно, используя антиоксиданты. Это возможно двумя способами: выдерживание эксплантов в слабом растворе антиоксиданта в течение 6—24 ч; непосредственное добавление антиоксиданта в питательную среду. В качестве антиоксидантов используют: аскорбиновую кислоту (1—60 мг/л), глутатион (4—5 мг/л), дитиотреитол (1—3 мг/л), диэтилдитиокарбамат (2—5 мг/л), поливинилпирролидон (5000—10 000 мг/л). В некоторых случаях целесообразно добавлять в питательную среду адсорбент — древесный активирован-

ный уголь в концентрации 0,5—1 %. Продолжительность первого этапа — от 1 до 2 месяцев, в результате которого наблюдается рост меристематических тканей и формирование первичных побегов.

II этап — собственно микроразмножение. На этом этапе необходимо добиться получения максимального количества мериклонов, учитывая при этом, что с увеличением субкультивирований увеличивается число растений-регенерантов с ненормальной морфологией и возможно образование растений-мутантов. Как и на первом этапе, используют питательную среду по прописи МС, содержащую различные биологически активные вещества, а также регуляторы роста. Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. Из цитокининов наиболее часто используют БАП в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов — ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л. При долгом культивировании растительных тканей на питательных средах с повышенным содержанием цитокининов (5—10 мг/л) происходит постепенное накопление их в тканях выше необходимого физиологического уровня, что приводит к появлению токсического действия и формированию растений с измененной морфологией. Вместе с тем можно наблюдать такие нежелательные для клонального микроразмножения эффекты, как подавление пролиферации пазушных меристем, образование витрифицированных (оводненных) побегов и уменьшение способности растений к укоренению. Отрицательное действие цитокининов возможно преодолеть, по данным Н. В. Катавой и Р. Г. Бутенко, используя питательные среды с минимальной концентрацией цитокининов, обеспечивающих стабильный коэффициент микроразмножения, или чередованием циклов культивирования на средах с низким и высоким уровнем фитогормонов.

III—IV этапы — укоренение микропобегов, их последующая адаптация к почвенным условиям и высадка в поле являются наиболее трудоемкими этапами, от которых зависит успех клонального микроразмножения. На третьем этапе, как правило, меняют основной состав среды: уменьшают в два, а иногда и в четыре раза концентрацию минеральных солей по рецепту МС или заменяют ее средой Уайта, уменьшают количество сахара до 0,5—1 % и полностью исключают цитокинины, оставляя один лишь ауксин. В качестве стимулятора корнеобразования используют ИМК, ИУК или НУК. Укоренение микропобегов проводят двумя способами: 1) выдерживание микропобегов в течение нескольких часов (2—24 ч) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20—50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка); 2) непосредственное культивирование микропобегов

в течение 3—4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1—5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта).

В последнее время предложен пока мало практикуемый метод укоренения пробирочных растений — в условиях гидропоники. Этот метод позволяет значительно упростить этап укоренения и одновременно получать растения, адаптированные к естественным условиям. Для картофеля возможно использовать бессубстратную гидропонику для получения мини-клубней. Затенение нижней части культуральных сосудов плотной черной материей или добавление в питательную среду активированного угля способствует укоренению микропобегов.

Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений — весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом с длинными концами или специальным крючком. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85—90 °С в течение 1—2 ч. Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1). Исключение составляют семейство орхидных, для которых готовят субстрат, состоящий из сфагнового мха, смеси торфа, листьев бука или дуба, сосновой коры (1:1:1). Приготовленным заранее почвенным субстратом заполняют пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20—22 °С), освещенностью не более 5 тыс. лк и влажностью 65—90 %. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают до полной адаптации растений.

Через 20—30 суток после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают растворами минеральных солей Кнудсона, Мурасига и Скуга, Чеснокова, Кнопа (в зависимости от вида растений) или комплексным минеральным удобрением. По мере роста растений их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений соответствует принятой агротехнике выращивания для каждого индивидуального вида растений.

Процесс адаптации пробирочных растений к почвенным условиям является наиболее дорогостоящей и трудоемкой операцией.

Нередко после пересадки растений в почву наблюдаются остановка в росте, опадение листьев и гибель растений. В первую очередь это связано с тем, что у растений-регенерантов нарушена деятельность устьичного аппарата, вследствие чего происходит потеря большого количества воды. Во-вторых, у некоторых растений в условиях *in vitro* не происходит образования корневых волосков, что приводит, в свою очередь, к нарушению поглощения воды и минеральных солей из почвы. Поэтому целесообразно на третьем или четвертом этапах клонального микроразмножения применять искусственную микоризацию (для микотрофных) растений.

Повышенный интерес к данному вопросу не случаен, так как еще в первой половине XX в. Р. Хатч показал, что микоризные грибы способствуют развитию корневой системы и повышают жизнеспособность растений.

Как известно, в природе широко распространена микотрофность растений. Этим термином называют устойчивые в нормальных условиях ассоциации поглощающих органов растений и микоризных грибов. Из 3449 изученных видов растений микориза не была обнаружена лишь у 750 видов (21 %).

Голосемянные деревья являются классическими микотрофными растениями, у которых встречаются три типа микориз: 1) микомодации (клубеньки), 2) зигомицетная везикулярно-арбускулярная эндотрофная микориза, 3) хальмофаговая эктотрофная микориза. Эндотрофные микоризы характеризуются отсутствием грибного чехла и внутриклеточным расположением гиф, эктотрофные микоризы — наличием грибного чехла. 62 % всех исследуемых голосемянных являются эктомикоризными.

К микоризообразователям эктотрофного типа относятся преимущественно базидиальные грибы — гименомицеты и гастеромицеты, а также некоторые сумчатые и несовершенные грибы. Строгой специфики у эктомикоризных грибов нет, одна и та же древесная порода способна вступать в симбиотические отношения с несколькими грибами.

Как правило, растения с микоризой более устойчивы к неблагоприятным условиям произрастания. Примером тому может служить ель, которая хорошо растет в искусственных посадках до 20 лет, но часто гибнет от заражения корней патогенными грибами, в частности корневой губкой. Такая картина наблюдается в тех условиях, когда в почве отсутствовали микоризные грибы.

Положительная роль микоризообразующих грибов проявляется в снабжении растений минеральными и органическими питательными веществами, водой, биологически активными веществами, а также в защите растений от патогенов. Однако вопрос о том, каким же образом микоризообразующие грибы осуществляют свою полезную деятельность, до конца остается невыясненным. В на-

стоящее время существует три гипотезы. Согласно первой, полезное действие микоризообразующих грибов осуществляется за счет не избирательного, а простого увеличения физической адсорбционной поверхности благодаря росту микоризных окончаний. Сторонники второй гипотезы видят значение микоризообразующих грибов в метаболических процессах обмена между грибом и клетками корня хозяина, а сторонники третьей считают, что функции микоризообразующих грибов заключаются лишь в упрощении сложных трудноусвояемых для растения веществ почвы с помощью выделения ими соответствующих энзимов. Большинство авторов до настоящего времени придерживаются второй гипотезы.

Помимо изучения положительной роли микоризных грибов в жизнедеятельности растений большое внимание исследователи уделяют вопросу о том, при каких условиях возникает симбиоз микоризообразующих грибов с корнями растений. Было показано, что интенсивность развития микориз в естественных условиях зависит, прежде всего, от содержания в почве доступных для растений форм азота, фосфора и калия, а также от интенсивности освещения. Максимальное развитие микоризы наблюдалось при низких концентрациях этих элементов или при недостатке одного из них и освещенности не ниже 12 % от открытого места. При высокой концентрации в почве растворимых соединений азота и фосфора микоризообразование могло не происходить.

Существует два способа заражения растений микоризообразующими грибами: 1) *in vitro* (в стерильных условиях); 2) *in vivo* (в естественных условиях). Первый способ более благоприятен, так как в этом случае исключается возможность загрязнений почвы другими микроорганизмами. Кроме того, в условиях *in vitro* есть возможность контролировать условия культивирования (свет, температура, влажность) и подбирать субстрат (рН, аэрация), обеспечивающий нормальное формирование микоризы. Растения, размноженные *in vitro*, развиваются значительно лучше, если их корневая система находилась в контакте с микоризообразующими грибами. В этом случае улучшалось снабжение их азотом, увеличилась в 1,5—2 раза приживаемость растений при их пересадке в почву, а также повышался прирост надземной биомассы. Такие работы были проведены с березой, эвкалиптом, каштаном, сосной, лохом и разными клонами ольхи (рис. 3.10).

Индийские ученые предложили простой метод предотвращения быстрого обезвоживания листьев растений, выращенных *in vitro*, во время их пересадки в полевые условия. Метод заключается в том, что листья в течение всего акклиматизационного периода следует опрыскивать 50%-ным водным раствором глицерина или смесью парафина и жира в диэтиловом эфире (1:1). Применение этого метода помогает избежать длинных и затруднительных процессов закаливания пробирочных растений и обеспечивает 100%-ную приживаемость.

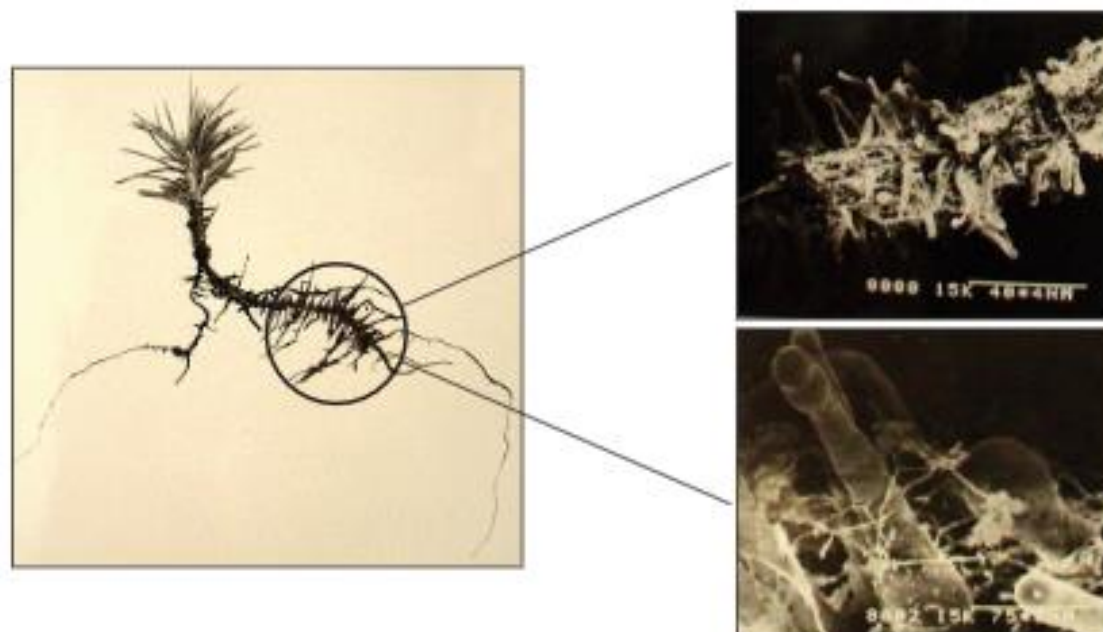


Рис. 3.10. Искусственное микоризообразование на корнях пробирочных растений ели обыкновенной в условиях *in vitro*

В Институте физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН разработан упрощенный способ адаптации пробирочных растений винограда (рис. 3.11). Он состоит в том, что адаптацию растения безболезненно проходят в пробирках — для этого достаточно снять пробки с тех пробирок, в которых растения достигают пробки. В таком состоянии растения оставляют на 1,5—2 недели. К концу этого периода верхушка растения и два развитых листочка появляются над пробиркой, и такое растение готово к пересадке в почву. Растения пересаживают в стерильный почвенный субстрат вместе с агаром для предотвращения механических повреждений корневой системы. Побег заглубляют в почвенный субстрат так, чтобы над поверхностью оставался стебель с одним-двумя развитыми листочками, не более. Применение этого способа для адаптации растений винограда к почвенным условиям позволяет упростить и удешевить технику акклиматизации растений. Это достигается вследствие того, что в данном случае туманообразующая установка не используется¹.

Еще один способ, который в последнее время широко применяется для адаптации пробирочных растений, — это применение аэропонных установок. Аэропоника — самые высокотехнологичные системы из всех существующих. Корни растения свободно свисают в емкость. Питательный раствор подается на корни микрокаплями или туманом, тем самым обволакивая корни растения воздушно-питательной средой. Такой подход обеспечивает максимальный

¹ Бургутин А. Б. Микрклональное размножение винограда // Сб. статей. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М. : Наука, 1991.

приток кислорода к корням. Поскольку субстрат отсутствует, во избежание пересыхания распыление раствора проводят обычно круглосуточно или по несколько секунд каждые несколько минут. Культуры, выращенные на аэропонике, отличаются особенно быстрой скоростью роста и созревания.



Рис. 3.11. Укоренение и адаптация пробирочных растений винограда *in vitro*

Ученые ВНИИ сельскохозяйственной биотехнологии разработали и сконструировали серию универсальных аэрогидропонных и аэропонных установок «Урожай». Эти установки используются для адаптации оздоровленных методом апикальных меристем пробирочных растений, для размножения и укоренения, а также последующего доращивания различных растений, в том числе и сельскохозяйственного значения (рис. 3.12).

Культивирование в аэропонных установках позволяет плавно переходить из условий *in vitro* к культивированию в условиях *in vivo*, доводя приживаемость растений до 100 %. Предлагаемый способ позволяет на ограниченных посадочных площадях выращивать значительно большее количество растений, чем в открытом грунте или в теплице. Успех культивирования растений достигается за счет более точного и быстрого регулирования параметров корнеобитаемой среды (рН питательного раствора, содержание макро- и микроэлементов, влажность, температура питательного раствора, аэрация корней, электропроводимость питательного раствора).

Например, легко контролируемые параметры минерального питания дают возможность регулировать развитие разных видов. Отсутствие конкуренции за питание и свет позволяют загущать

посадки — на 1 м² высаживают до 600 пробирочных растений для адаптации и дальнейшего доращивания. Кроме того, отсутствие почвы исключает стерилизацию субстрата, борьбу с соответствующими болезнями и упрощает уход за растениями.



Рис. 3.12. Аэропонная установка «Урожай» (ВНИИСБ)

Применение современных питательных растворов позволяет значительно увеличивать урожайность культур и сокращать площади под их посев. Разработки в области проектирования систем выращивания позволяют выращивать растения не только компактно, на одном уровне, но и заполнять объем используемых под данный процесс помещений. Таким образом, рационально используется рабочая площадь и повышается выход готовой продукции.

Наиболее широко аэропонные установки применяются для получения безвирусных мини-клубней картофеля. В аэропонной установке растения картофеля проходят три этапа выращивания: 1 этап — укоренение и интенсивный рост надземной биомассы растений; 2 этап — рост надземной биомассы и индукция клубнеобразования растений; 3 этап — интенсивное клубнеобразование, сбор мини-клубней кондиционного размера. На каждом этапе культивирования необходимо проводить подбор оптимальных параметров культивирования (рис. 3.13).



а



б



в



г



д

Рис. 3.13. Высадка пробирочных растений картофеля и их рост в аэропонной установке:
 а — рост вегетативной массы; б — рост корневой системы; в — индукция клубнеобразования; г — активный рост мини-клубней; д — мини-клубни картофеля, выращенные на аэропонной установке

Растения, выращиваемые в условиях аэропоники, быстро формируют мощную вегетативную массу, с хорошо развитым не только главным побегом, но и боковыми. Кроме того, формирование микроклубней, как правило, происходит на 30-е сутки с начала высадки растений на аэропонную установку. Данное направление ис-

следований имеет практическое применение в семеноводстве картофеля.

Для получения безвирусного семенного материала картофеля необходимо придерживаться следующего регламента работы:

1) термотерапия клубней, отобранных для изолирования меристем, в течение 3 недель при 37 °С в климатической камере. Проращивание после термотерапии клубней для получения проростков;

2) изолирование апикальных меристем на среду для культивирования меристемных тканей с добавлением макро-, микросолей, витаминов, фитогормонов;

3) культивирование апикальных меристем в течение 30—90 суток *in vitro* до формирования пробирочных меристемных растений. Микрочеренкование меристемных растений картофеля;

4) тестирование меристемных линий на вирусы методом полимеразной цепной реакции или иммуноферментного анализа. Выбраковка меристемных линий, зараженных вирусами;

5) клональное микроразмножение безвирусных пробирочных растений картофеля;

6) высадка безвирусных пробирочных растений на аэропонную установку и теплицу. Уход за высаженными растениями в соответствии с этапами выращивания в аэропонной установке: поддержание в теплице температурного, светового и питательного режимов в зависимости от этапа развития растений;

7) сбор миниклубней картофеля в аэропонной установке, в теплице;

8) хранение миниклубней в компьютеризированном хранилище с регулируемыми режимами температуры и вентиляции до высадки в полевых условиях.

Контрольные вопросы и задания

1. Назовите особенности техники культивирования изолированных эксплантов на первом этапе клонального микроразмножения.

2. Назовите особенности техники культивирования изолированных эксплантов на втором этапе клонального микроразмножения.

3. Назовите особенности техники культивирования изолированных эксплантов на третьем этапе клонального микроразмножения.

4. С какой целью применяют искусственную микоризацию растений *in vitro*?

5. Расскажите о способах и приемах акклиматизации растений-регенерантов к условиям *in vivo*.

6. С какой целью применяют гидро- и аэропонные установки?

7. Что такое витрифицированные растения?

8. Какие существуют приемы, чтобы избежать появления витрифицированных растений?

Глава 13

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

При разработке методов клонального микроразмножения растений необходимо учитывать влияние генетических, физиологических, гормональных и физических факторов. Это связано с тем, что разработанная методика для определенного клона одного вида не всегда может быть применена для размножения других представителей этого вида и тем более растений другого вида. На микроразмножение влияют генотип, возраст исходного растения, сезонность изоляции, а также размер первичного экспланта. Из гормональных факторов — соотношение цитокининов и ауксинов, состав питательной среды по минеральным веществам, витаминам, сахарозы, а из физических — консистенция среды (жидкая или агаризованная), ее кислотность, условия освещения, а также температурный режим и относительная влажность воздуха.

13.1. Генетические и физиологические факторы

Из факторов, определяющих успех клонального микроразмножения, наибольшее значение имеет генотип исходного растения. Экспериментально доказано, что двудольные травянистые растения обладают большими морфогенетическими потенциями, т. е. имеют более выраженную способность к индукции заложения адвентивных почек, росту побегов, укоренению и, в конечном счете, получению более высокого коэффициента размножения, чем ткани и органы однодольных травянистых и, тем более, древесных растений. На примере сахарной свеклы было показано, что наибольшее число регенерантов получено от тетраплоидных форм, меньше всего — от диплоидных, а триплоидные гибриды занимают промежуточное положение. Аналогичные результаты были получены с 11 генотипами перуанского картофеля (работы были проведены на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева).

Существенное влияние на реализацию морфогенетического потенциала в процессе микроразмножения оказывают сортовая и ро-

довая специфика исходного экспланта. Известно, что виды растений, хорошо размножающихся вегетативно, обычно проявляют высокую регенерационную способность в культуре *in vitro*. Среди видов, обладающих значительным морфогенетическим потенциалом, представители семейств *Solanaceae*, *Umbelliferae*, *Cruciferae*, *Compositae*; трудно регенерируют растения из семейства *Gramineae*. Генотип материнского растения значительно влияет на ход клонального микроразмножения. В пределах вида некоторые генотипы размножаются легче, чем другие.

Для растений хмеля было показано, что изолированные апексы различных сортов по-разному реагируют на присутствие в питательной среде регуляторов роста: для сорта Смолистый оптимальной была концентрация БАП 1 мг/л, для сорта Истринский-15 — 0,5—1,5 мг/л БАП и 0,05 мг/л ИУК. Апексы сорта Смолистый не реагировали на добавление в питательную среду ИУК и 2,4-Д, а у сорта Истринский-15 увеличивался рост побегов на среде с 0,05 мг/л ИУК и 0,05 мг/л 2,4-Д. Для изолированных апексов крыжовника также были отмечены сортовые различия в морфогенетических реакциях на условия культивирования. Так, апексы, культивируемые на питательной среде, содержащей минеральные соли по Т. Мурасиге и Ф. Скугу, БАП 0,5 мг/л сорта Финик пролиферировали каллус, из которого затем формировались побеги, а апексы сортов Русский, Колобок, Розовый обладали способностью к прямой регенерации побегов.

Зависимость морфогенетического потенциала от родовой специфики растений была обнаружена на злаковых травах, таких, как ежа сборная, житняк гребенчатый, овсяница луговая и бороздчатая, колосняки гигантский, узколистый, мягкий, пырейник ситниковый, пшеница Саратовская 29, Палестинка 6, неполные пшенично-колосняковые амфидиплоиды 98, 99, 101. В результате экспериментов были отмечены различные потребности в макро- и микроэлементах, органических компонентах (аминокислотах, гидролизате казеина, дрожжевом экстракте, биотине), регуляторах роста. Установлено, что гибриды обладают более высокой морфогенетической активностью, чем исходные родительские формы.

Среди древесных растений примером родовой специфики могут служить хвойные. Например, культивирование изолированных зародышей сосны замечательной, сосны желтой, сосны приморской, ели обыкновенной, ели колючей на модифицированной питательной среде Мурасиге и Скуга, содержащей цитокинин (БАП), наблюдается образование почек *de novo*. Причем в одних и тех же условиях выращивания процент образования адвентивных почек для перечисленных выше представителей рода *Pinus* колебался от 20 до 35 %, в то время как для *Picea* это значение не превышало 10 %.

Сортовая специфика может проявляться и при укоренении микропобегов. Так, для микропобегов вишни было отмечено, что сорт Шубинка после обработки ИМК (50 мг/л) укоренялись на 52 %, сорт Владимирская — на 18 %, а сорт Любская — на 13 %. Для разных сортов черной смородины также наблюдается достоверное различие в корнеобразовательной способности изолированных верхушек побегов.

Физиологический возраст исходного экспланта имеет несомненное значение в проявлении способности к морфогенезу. Зрелые зародыши, 20—30-дневные проростки или различные их части (ювенильный материал) обладают высокими морфогенетическими потенциями по сравнению с тканями взрослых растений и способны образовывать в большом количестве адвентивные почки, стимулировать развитие пазушных меристем, которые в дальнейшем формируют хорошо растущие побеги, способные к укоренению. В этом случае, например, из одного изолированного зародыша лиственных пород возможно получить до 10—100 тыс. растений в год, в то время как при культивировании пазушных или апикальных почек взрослых растений коэффициент размножения уменьшается на 1—2 порядка.

Возраст первичного экспланта оказывает существенное влияние и на укоренение микропобегов, размноженных *in vitro*. С увеличением возраста исходного материала, как правило, снижается способность побегов и черенков к укоренению. Так, при работе с восемью видами яблонь было получено 80—90%-ное укоренение микропобегов из ювенильного материала, 50 % — из апикальных почек, изолированных с 2—3-летних растений, и 20—30 % — из растений более старшего возраста.

Несомненно, с практической точки зрения целесообразно размножать растения, в частности древесные, в возрасте старше 20 лет, т. е. после проведения оценки по хозяйственно важным признакам. Однако размножение их *in vitro* в таком возрасте представляет большие трудности. Во-первых, все типы тканей и органов у взрослых растений эндогенно заражены грибами и бактериями, что значительно затрудняет получение асептической культуры. Во-вторых, почки или другие органы одного и того же взрослого дерева различаются между собой по поведению в условиях *in vitro* гораздо больше, чем имеет место у травянистых растений. Это приводит к проведению специальных экспериментов, по подбору оптимальных условий культивирования, обеспечивающих нормальный рост и развитие вновь введенных эксплантов в культуру.

В настоящее время преодоление возрастного барьера осуществляется путем реювенилизации — сочетанием работ *in vivo* и *in vitro*. Реювенилизацию (омоложение) можно проводить несколькими способами, среди которых: 1) многократная обработка растущего

дерева или отдельных ветвей раствором цитокинина перед эксплантацией; 2) повторное черенкование; 3) частая подрезка деревьев для индукции роста побегов непосредственно из ствола дерева или для стимуляции корневых отпрысков; 4) проведение повторных прививок; 5) серия субкультивирований (*in vitro*); 6) создание густых насаждений, обеспечивающих боковое затенение, которое будет стимулировать развитие спящих почек.

Або Эл Нил предложил технологию реювенилизации, первый этап которой состоит в многократной обработке цитокинином деревьев, находящихся в состоянии покоя. Однако могут использовать и другие — кинетин, 2iP. Выбор цитокинина зависит от реакции обрабатываемого вида, которую устанавливают экспериментально.

В сочетании с цитокинином можно использовать и другие регуляторы роста. Например, у некоторых видов отмечается повышенная реакция, когда с БАП применяют N-диметиламиноянтарную кислоту в небольшой концентрации. Обрабатывают *in vivo* все растущее дерево или его отдельные ветви. Срезанные ветви погружают в раствор цитокинина или его вводят непосредственно в сосудистую систему дерева, например через конец срезанной ветки путем инъекции. Обработку проводят через 4—5 дней, так как более частые обработки гормонами могут вызвать отравление растений. Такие обработки индуцируют образование почек или побегов, которые приобретают морфологию, сходную с морфологией молодых особей. Побеги или короткие отрезки стебля, содержащие почки, затем помещают на питательную среду (*in vitro*) для индукции роста почек и побегов. Впоследствии сформировавшиеся побеги переносят либо на среду для размножения, либо на среду для укоренения. Промежуточной стадией при этом является среда, способствующая раскрытию вновь образовавшихся почек и развитию их в побеги.

К физиологическим факторам также относится и время (сезонность) изоляции экспланта. Ткани и органы, изолированные в момент вегетации растений, обладают более высокой чувствительностью к составу питательной среды и способны с высокой частотой образовывать адвентивные почки, формировать побеги и укореняться, чем ткани, изолированные в период глубокого и вынужденного покоя. Например, весенняя посадка апексов крыжовника сорта Финик на питательную среду МС, содержащей БАП 0,5 мг/л, способствовала пролиферации каллуса, из которого затем индуцировались с высокой частотой побеги, в то время как летняя изоляция апексов стимулировала более интенсивную пролиферацию каллуса, но при этом уменьшался процент регенерации побегов.

Размер экспланта является еще одним фактором, определяющим успех микроразмножения. Чем меньше эксплант, тем меньшей регенерационной способностью он обладает, и наоборот. С одной стороны, экспланты большего размера, состоящие из паренхимы,

проводящей ткани и камбия, могут независимо от соотношения фитогормонов в питательной среде спонтанно образовывать почки. С другой стороны, в крупном экспланте увеличивается возможность появления в его клетках вирусов и других патогенов, что препятствует оздоровлению размноженных в культуре тканей растений. Оптимальная величина экспланта зависит от видовых особенностей растения-донора и свойств органа, служащего источником первичного экспланта. Так, для малины был установлен размер первичного экспланта 2 мм, при котором 60 % апикальных верхушек растения регенерировали на среде Мореля. Для хмеля этот показатель колеблется от 0,1 до 0,2 мм, а для лука и чеснока оптимальный размер меристемы составляет 0,5—0,8 мм.

У многих растений морфогенетическая способность изолированных тканей, в частности меристематических, зависит от расположения почек на побегах. Так, исследуя регенерационную способность терминальных и латеральных почек побегов крыжовника сорта Русский, показали, что наибольшим морфогенетическим потенциалом обладают три верхние почки (45—65 %), а для растений спаржи было установлено, что почки нижней части побега обладают большей регенерационной способностью, чем почки средней и апикальной частей.

При клональном микроразмножении древесных растений и кустарников, как правило, в качестве первичного экспланта, обычно используют вегетативные органы — пазушную или апикальную меристему. Экспериментально, на примере разных видов рода *Rhododendron* (Васильева, 2009), было доказано, что регенерационный потенциал изолированных почек зависит от морфологических особенностей вегетативных почек. Основным показателем при морфологических исследованиях служит емкость почек, которая определяется как число листовых зачатков всех возрастов, заключенных в почке от первого видимого примордия до вполне сформированного растущего листа, согласно терминологии, предложенной Т. И. Серебряковой (1971) (рис. 3.14).

Из каждого зачатка пазушной почки при благоприятных условиях внешней среды может сформироваться побег. Например, у рододендронов в условиях г. Москвы рост побегов заканчивается примерно к середине июля. К этому времени аксиллярные почки содержат 2—6 (в зависимости от вида) ясно различимых зачатков листьев, в пазухах которых заметны почки второго порядка. В течение лета число зачатков листьев увеличивается, и к осени на побегах возобновления терминальная вегетативная почка при моноподиальном нарастании содержит от 3 до 10 (в зависимости от вида) ясно различимых зачатков листьев. Морфологический анализ показал, что наибольшие показатели емкости почек были отмечены у полувечнозеленого *Rh. ledebourii* (10,0) и листопадного *Rh. roseum* (9,6) — видов, в свою очередь характеризующихся и наибольшим

коэффициентом размножения в культуре *in vitro* — 12,0 и 11,8, соответственно. Вечнозеленые *Rh. brachycarpum* и *Rh. catawbiense* характеризуются средними показателями емкости почек по сравнению с листопадными и полувечнозелеными рододендронами. Наименьшее значение емкости почек отмечено у листопадного *Rh. schlippenbachii* (4,0) отличающегося и невысоким коэффициентом размножения *in vitro* (6,7 шт.).

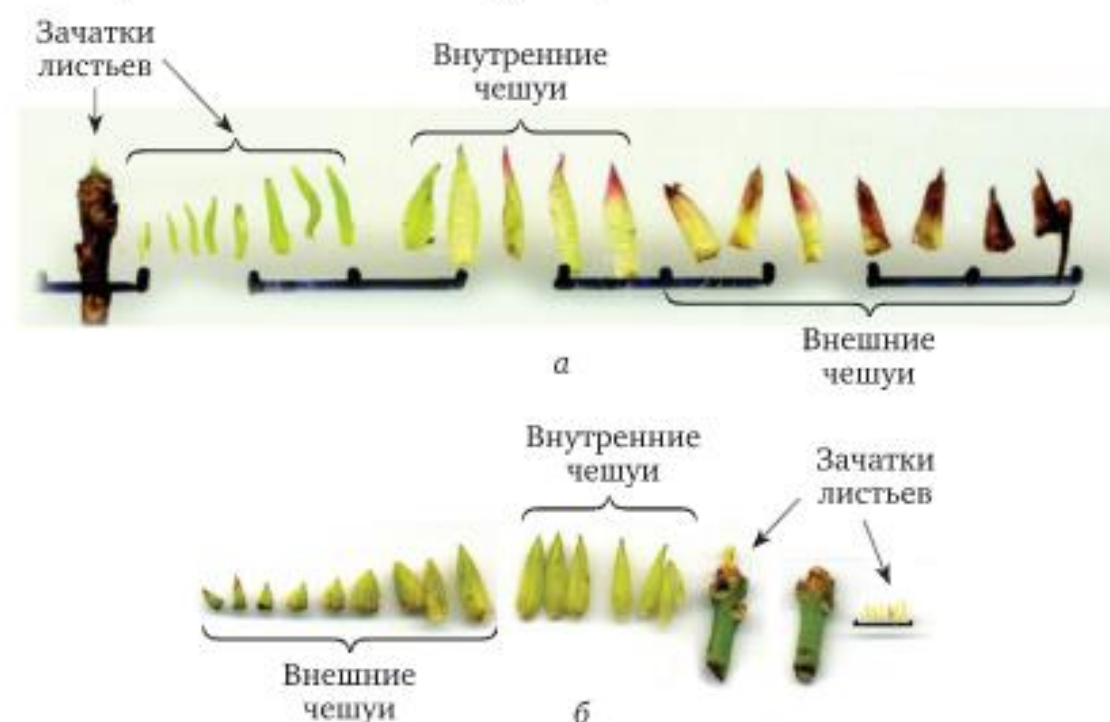


Рис. 3.14. Строение вегетативных почек *Rh. japonicum* (а) и *Rh. brachycarpum* (б)

Для всех изученных видов на 99%-ном уровне значимости выявлена положительная корреляция между емкостью почек и коэффициентом размножения в культуре *in vitro*. Наибольший коэффициент корреляции отмечен у *Rh. japonicum* ($r = 0,95$) и у *Rh. catawbiense* ($r = 0,90$). Таким образом, количество зачатков метамеров в почках интактных растений в значительной мере определяет коэффициент размножения в искусственных условиях.

Все это свидетельствует о возможности использования предварительного морфологического анализа вегетативных почек, перспективных для размножения видов, форм и сортов растений для оценки их регенерационного потенциала в условиях *in vitro*.

13.2. Факторы гормональной и негормональной природы

Немаловажный фактор, влияющий на успех клонального микро-размножения, — гормональный баланс питательной среды. При высоком соотношении гормонов (цитокинин — ауксин) происходит

развитие пазушных меристем или образование адвентивных почек, при низком — индуцируется корнеобразование, а при среднем — наблюдается образование и пролиферация каллуса. Наиболее часто при клональном микроразмножении используют ИУК, реже НУК в качестве ауксиновых компонентов, кинетин и БАП представляют при этом цитокинины. Кроме перечисленных цитокининов используются и другие, у которых активность в стимуляции образования побегов выше. Цитокинины, используемые в микроразмножении растений, по своей активности можно расположить в следующем порядке: кинетин < 6-бензиламинопурин (БАП) < 2iP < зеатин.

Кроме цитокининов и ауксинов в питательную среду иногда добавляют гибберелловую кислоту, которая стимулирует рост и вытягивание (элонгацию) сформировавшихся почек и способствует получению растений с хорошо развитой надземной частью.

Принципиально возможны индукция и стимуляция различных морфогенетических реакций в культуре тканей с помощью низких концентраций экзогенных фитогормонов и угнетение общей активности вплоть до гибели растительных тканей при высокой гормональной насыщенности питательной среды. Эту специфику реакций культивируемых тканей и органов растений на введение фитогормонов следует учитывать при использовании регуляторов роста с целью размножения растений.

На клональное микроразмножение, наряду с гормонами, влияют минеральные соли, витамины и углеводы. При микроразмножении растений *in vitro* часто используют среды Мурасиге и Скуга, Линсмаера и Скуга, Гресхоффа и Доу, Нича, Хеллера, Шенка и Хильдебрандта и др., отличающиеся друг от друга соотношением аммонийного и нитратного азота. В большинстве случаев исследователи отдают предпочтение среде Мурасиге и Скуга с более высоким содержанием неорганического азота. Использование сред, обогащенных азотом, не только ведет к неорганизованному росту каллусной ткани, но и стимулирует процессы органогенеза и особенно соматического эмбриогенеза. Например, NH_4NO_3 влияет на морфогенетический потенциал зародышей разных видов *Brassica*. Процент выживания зародышей и частота образования побегов увеличиваются при уменьшении концентрации NH_4NO_3 в среде, а максимальное число побегов на зародышах формируются в случае полного исключения NH_4NO_3 из среды. Снижение содержания KNO_3 и NH_4NO_3 до 6,7 мМ улучшало морфогенез крыжовника сортов Инвикта и Карлз. Для томатов экспериментально было установлено, что среды с повышенным содержанием минерального азота ингибируют пролиферацию каллуса и приводят к гибели эксплантов. Для глоксинии была отмечена зависимость образования вегетативных или репродуктивных структур от концентрации компонентов питательной среды. Так, при высокой концентрации KNO_3 (20 мМ) и сахаро-

зы (100 мМ) преимущественно развиваются вегетативные почки, а цветочные — только у 28 % эксплантов. При низком содержании KNO_3 (2 мМ) и сахарозы (15 мМ) на всех эксплантах образуются только цветочные почки.

Значительное влияние на процесс микроразмножения оказывают биологически активные вещества негормональной природы, а также углеродное питание. Как правило, присутствие в составе питательной среды витаминов, аминокислот, растительных экстрактов, гидролизата казеина необходимо для индукции пролиферации каллуса и регенерации из него побегов или эмбриоидов. Когда же развитие побегов происходит за счет существующих пазушных меристем или сформировавшихся почек и эмбриоидов, то обычно влияние биологически активных добавок становится несущественным, ибо побеги сами способны к синтезу нужных для их жизнедеятельности веществ. Замечено, что высокие концентрации биологически активных веществ приводят к гипervитаминозу, что проявляется в угнетении роста, побурении и высыхании листьев, в изменении морфологии растений.

На всех этапах клонального микроразмножения в качестве источника углеродного питания используют 3%-ную сахарозу. Однако эта концентрация не является оптимальной для всех вводимых в культуру *in vitro* растений. Например, экспериментально доказано, что сахароза является фактором, способным направить развитие побегов каперса *in vitro*, и что можно получать либо вегетирующие побеги, либо пурпурные почки возобновления. При культивировании апикальных и боковых почек на среде, содержащей сахарозу в концентрации 3 % и более, наблюдается появление антоциановой окраски почек, что является первым признаком перехода почек в состояние зимнего покоя. При использовании же пониженных концентраций (менее 3 %) происходит формирование зеленых почек, способных в дальнейшем к размножению.

В работах с изолированными зародышами ели обыкновенной было также выявлено отрицательное влияние высокой концентрации сахарозы (2—3 %) на процесс образования адвентивных почек. Показано, что уже на втором пассаже этот процесс практически не происходит, а к четвертому пассажу наблюдается гибель всех эксплантов. Пониженное содержание сахарозы в среде стимулировало не только образование адвентивных почек, но и дальнейшее их развитие в побеги. При 0,5—1%-ной концентрации сахарозы побеги через 2—3 месяца культивирования имели высоту 1—1,5 см и затем использовались для дальнейшего размножения или укоренения.

Помимо сахарозы в качестве источника углеродного питания можно использовать глюкозу, фруктозу, галактозу и др. Известно, что после сахарозы наиболее употребляемым источником углеродного питания для культивирования *in vitro* тканей растений явля-

ется глюкоза. Из 38 исследованных культур (травянистых и древесных) 85 % имели отличный и хороший рост на среде с глюкозой. На третьем месте по эффективности использования культурами тканей растений стоит фруктоза. По мнению С. Миноха, 2/3 культур успешно использовали для своего роста фруктозу. Галактоза заметно отличается от глюкозы и фруктозы по действию на рост изолированных тканей растений. Более половины изученных культур слабо или почти не используют галактозу для роста. Однако есть данные, отмечающие положительную роль галактозы для культивирования тканей и органов растений.

Таким образом, проблема использования гормонов, биологически активных веществ и минеральных солей не должна сводиться к простому включению этих соединений в состав питательной, среды по готовым стандартным рецептам, а должна решаться с учетом конкретных морфогенетических реакций, используемых для микро-размножения того или иного вида растений.

13.3. Физические факторы

Консистенция среды является важным фактором, влияющим на процессы роста эксплантов и образование адвентивных почек. Известно, что при культивировании эксплантов верхушки побегов в жидких питательных средах на аппаратах роллерного типа значительно стимулируется их рост, не наблюдается ярко выраженного апикального доминирования побегов, сокращается период выращивания и количество пересадок, что обусловливается хорошим снабжением растений питательными веществами. В то же время в этих условиях возрастает возможность образования аномальных, витрифицированных побегов. Использование твердых агаризованных сред способствует преодолению витрификации, но вместе с тем этот способ выращивания ухудшает условия питания эксплантов и препятствует удалению продуктов метаболизма.

На клональное микроразмножение и рост растений также влияет и кислотность среды, определяющая доступность для растений питательных веществ. Известно, что сильно кислые или щелочные среды лимитируют поступление некоторых элементов, например фосфора и железа, делая их относительно нерастворимыми и этим ограничивая рост растений. В то же время при высокой кислотности большое количество этих элементов переходит в растворенное состояние и становится токсичным для эксплантов.

Как правило, ткани и органы растений культивируют на питательной среде с pH 5,6—5,8. Однако эти условия не всегда могут быть оптимальными. Например, для культуры зародышей сосны обыкновенной было показано, что изменение кислотности пи-

тательной среды от 4,7 до 5,2 позволяет увеличить в 2,5—3 раза способность зародышей образовывать адвентивные почки, а для культуры ели обыкновенной наиболее благоприятный pH среды находился в пределах 5,2—5,6. Эти данные полностью совпадают с кислотностью почвы, на которых успешно произрастают данные породы в естественных условиях. Поэтому биотехнологи должны учитывать в экспериментах по культуре ткани кислотность почв естественного произрастания исследуемых растений.

Обычно изолированные ткани растений выращивают при освещении люминесцентными лампами с учетом требований материнского растения к интенсивности света и фотопериоду. Т. Мурасиге рекомендует на первом и втором этапах клонального микроразмножения растений культивировать ткани при 1—5 тыс. лк и 14—16-часовом фотопериоде, такие условия освещения способствуют инициации побегов и корней у большинства растений.

Многие исследования свидетельствуют, что интенсивность освещения играет важную роль в индукции органогенеза. Увеличение освещенности с 3 до 6 тыс. лк способствовало интенсивному побегообразованию в культуре бегонии. Максимальное образование побегов и корней в культуре тканей аспарагуса отмечено при 1 тыс. лк (16-часовой фотопериод), снижение или увеличение интенсивности освещения, угнетало органогенез тканей.

Интенсивность и характер роста изолированных тканей зависят и от спектрального состава света. Так, белый, красный и голубой свет более интенсивно индуцируют образование почек у ткани *Heloniopsis orientalis*, чем зеленый. Красный свет стимулирует образование цветочных почек у ткани табака, а темнота — образование корней. Адвентивные почки в каллусе табака индуцируются ультрафиолетовым, голубым и фиолетовым светом. У эксплантов салата красный свет вызывает образование побегов. Для пробирочных растений картофеля было установлено, что присутствие в среде НУК или ИУК значительно сильнее стимулировали клубнеобразование на красном, чем на синем свету, тогда как БАП или кинетин стимулировали клубнеобразование активнее на синем по сравнению с красным светом. Наиболее благоприятное действие на укоренение побегов березы, активацию существующих меристем оказывает красный свет, при котором практически 100 % микрочеренков образуют корни. При белом свете этот процесс идет менее активно, при синем — корни образуются только у половины черенков, а в темноте — у еще меньшего числа. Сочетание красного света с введением в среду ИУК значительно ускоряет процесс корнеобразования и повышает интенсивность роста побегов. Синий свет увеличивает содержание цитокининов в тканях растений и тем самым стимулирует образование побегов.

Температура оказывает значительное влияние на рост и регенерацию изолированных тканей растений, способствуя активации метаболических процессов. Для большинства растительных тканей температурный оптимум составляет 23—25 °С. Однако существуют различия между растениями в отношении их требований к температуре. Так, образование луковичек у *Lilium auratum* наиболее эффективно при 20 °С. Охлаждение эксплантов, предшествующее культивированию ткани гладиолуса, улучшает ее регенерационную способность. Низкие температуры (15—18 °С) в течение двух недель необходимы для индукции образования побегов в культуре черешков бегонии. Для почек цветоносов фаленопсиса отмечается влияние температуры на тип морфогенеза: при +28 °С из почек регенерируют вегетативные побеги, а при +20 °С — генеративные.

Температурный режим зависит, главным образом, от вида растений. Так, для тропических растений оптимальная температура выращивания приближается к 27 °С, для растений альпийских лугов — 18—20 °С, для большинства других — 25 °С. При клональном микроразмножении пробирочные растения выращивают в климатических камерах, где поддерживаются 16-часовой фотопериод и 70%-ная относительная влажность воздуха.

Таким образом, для повышения коэффициента размножения растений необходимо каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания подбирать индивидуальные условия культивирования. Следовательно, клональное микроразмножение является новым перспективным способом вегетативного размножения растений, позволяющим получать генетически однородный, оздоровленный посадочный материал, иметь высокий коэффициент размножения, сокращать селекционный процесс, проводить работы в течение круглого года, экономя при этом площади, необходимые для выращивания растений.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие вы знаете факторы, влияющие на клональное микроразмножение растений?
2. Каким образом размер и возраст первичного экспланта, а также сезонность его изоляции оказывают влияние на эффективность клонального микроразмножения растений?
3. В чем особенности клонального микроразмножения однолетних травянистых растений от многолетних древесных?
4. Что такое гипервитаминоз клеток растений *in vitro*?
5. Какая существует зависимость клонального микроразмножения растений от физических факторов выращивания?

Глава 14

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ ДЕКОРАТИВНЫХ, ПЛОДОВО-ЯГОДНЫХ И ХВОЙНЫХ РАСТЕНИЙ

Цветочные, плодово-ягодные культуры. Необходимость использования здорового посадочного материала в промышленном садоводстве, цветоводстве и лесном хозяйстве не вызывает сомнений. В настоящее время существует несколько методов получения оздоровленных растений: тестирование большого количества исходного растительного материала; размножение в условиях *in vitro* с последующим их тестированием; термо- или хемитерапия, тестирование, размножение *in vitro* и снова тестирование.

Выбор метода зависит от вида вирусной инфекции, а также от генотипических особенностей исследуемых объектов. Трудоемкость проведения таких работ обусловила разработку индивидуальных методов размножения растений в условиях *in vitro* для каждого конкретного растения, относящегося к разным таксономическим группам. Основным методом, применяемым для сохранения и размножения ценных экземпляров, остается метод, основанный на снятии апикального доминирования. Из плодовых и ягодных культур подобным образом в промышленных масштабах размножают землянику, ежевику, малину, яблоню, сливу, вишню, подвой и скелетообразователи груши, а также некоторые декоративные культуры, такие как сирень, жимолость, кизильник, роза, хризантема и др. Данный метод считается универсальным и имеет хорошую воспроизводимость результатов в пределах вида и рода растений; минимальную степень риска в отношении получения генетически неоднородного посадочного материала.

Второй распространенный метод клонального микроразмножения для практических целей цветочно-декоративных культур и некоторых плодовых — развитие адвентивных почек/побегов. Как правило, в качестве первичного экспланта используют чешуи или сегменты базальной части донца луковиц, сегменты листовой пластинки и междоузлий побегов. Таким методом размножают, главным образом, луковичные цветочные культуры (гиацинты, лилии, гладиолусы, тюльпаны, нарциссы и др.).

В настоящее время в коммерческих целях метод клонального микроразмножения применяется для растений семейства Орхидных, для которых размножаемые растения являются сложными гибридами. Некоторые из них сочетают геномы трех-четырех разных родов. В обычных условиях осуществить вегетативное размножение этих растений сложно, а в случае завязываемости семян и их прорастания растение достигает фазы цветения лишь через 3—5 лет.

В последние годы резко возрос спрос на многие цветочные и декоративные культуры. Вместе с тем некоторые ценные виды находятся на грани исчезновения и занесены в Красную книгу. Сокращение и размножение редких, исчезающих и декоративных видов растений возможно с помощью методов клеточной инженерии, в частности клонального микроразмножения. На кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева разработаны технологии быстрого размножения цветочных и декоративных растений в условиях *in vitro*. Создан банк редких, декоративных, цветочных и исчезающих видов растений, разработаны лабораторные технологии размножения декоративно-лиственных и красивоцветущих бегоний (16 сортов), хризантем (10 сортов), гиацинтов (8 сортов), фиалок (12 сортов), эписций (6 сортов), лилий (20 сортов), гладиолусов, фритиллярий и других растений.

Как правило, первичным эксплантом служат сегменты чешуи (луковичные культуры), листья (розеточные культуры) и пазушные почки (для растений с вертикальным ростом). Разработанные технологии позволяют в течение 1,5—2 месяцев получать на одном экспланте от 8 (гиацинты) до 70 шт. (бегонии) адвентивных почек, способных впоследствии развиваться в нормальные растения. По предварительным расчетам, можно получить в течение 6 месяцев 1250 микролуковиц фритиллярии (рябчик императорский) из 15 сегментов луковиц, до 7 тыс. растений из одного листа бегоний и до 15 тыс. хризантем из одной пазушной почки. В течение года из одной луковицы можно вырастить до 8 тыс. лилий. Эти технологии основываются на микрочеренковании или на индукции образования дополнительных почек или луковиц непосредственно на первичном экспланте.

Коммерческое микроразмножение растений становится быстро-растущим промышленным производством (табл. 3.1). Однако созданию коммерческих фирм-лабораторий должно предшествовать прогнозирование рентабельности и социальной необходимости производства данного вида продукции. Перед принятием решения по организации коммерческих лабораторий должны быть учтены такие факторы, как стоимость продукции, рыночная цена, емкость рынка, сезонность поставки, выбор сортов.

Практический интерес представляют исследования, объектами которых являются зародыши плодовых растений раннего срока

созревания. Объясняется это тем, что селекционно-генетическая работа с такими сортами затрудняется из-за формирования у них неполноценных семян с недоразвитыми зародышами, которые в обычных условиях не образуют всходы. Поэтому среди значительного числа сортов разных плодовых культур очень мало раннеспелых. Во многих научно-исследовательских институтах по плодовым культурам разрабатываются методические приемы культивирования зародышей *in vitro* (например, для преодоления покоя семян черешни и персика), в результате чего из изолированных зародышей получают стерильные проростки (груша, миндаль, хурма, персик, черешня и др.), а также их межвидовые гибриды (например, миндаль и хурма), которые в дальнейшем размножают *in vitro*. Размноженные формы и ультра ранние и ранние по срокам созревания сорта, урожайные, с плодами хорошего качества, включаются в государственное сортоиспытание и районировются (например, персик сорт Пламенный).

Таблица 3.1

Промышленные культуры (млн шт.), выращенные *in vitro* в США, странах Азии и Европы в 2000 г.

Культура	США	Европа	Азия
Цимбидиум гибридный (орхидея)	0,5	0,2	0,2
Бегония	2,5	10	—
Рододендрон	—	3,5	—
Гербера	2,5	—	0,5
Ирис гибридный	5,0	2,8	2,5
Папоротник	15	15	—
Фигус	1,7	4,5	—
Диффенбахия	6,0	—	—
Земляника	4,0	—	2,0
Картофель	7,0	—	—
Роза	—	5,7	—

Хвойные породы. Интерес к работе с хвойными породами вызван главным образом необходимостью сохранения генофонда некоторых пород, их декоративными свойствами и трудностью размножения черенками. Для можжевельника, например, применение клонального микроразмножения является наиболее перспективным способом, так как семена данной породы обладают низкой всхожестью, наблюдается дегенерация зародышей, а при черенковании процент укорененных черенков не превышает 5—8 %. Введение в культуру криптомерии и ее последующее размножение необходи-

мы с целью получения достаточного количества посадочного материала, который используется главным образом для посадки в садах и парках, где она ценится из-за декоративных свойств. Хвоя криптомерии очень густая, обладает способностью изменять окраску в зимний период, что делает эту породу еще более привлекательной. Что же касается остальных пород, за исключением некоторых видов семейства сосновых, размноженный посадочный материал в основном используется при озеленении городов.

В настоящее время работы по размножению в условиях *in vitro* ведутся с представителями всех семейств класса хвойных. В табл. 3.2 представлены не все виды хвойных, с которыми начаты разработки технологий клонального микроразмножения, и этот перечень постоянно увеличивается.

Таблица 3.2

Применение культуры тканей для размножения хвойных пород

Семейство, вид	Фаза развития первичного экспланта	Происхождение экспланта	Метод размножения	Укоренение
<i>Семейство Сосновые</i>				
Пихта бальзамическая	Взрослая	Побеги	1	
Лиственница: европейская	Ювенильная	Незрелые и зрелые зародыши, гипокотиль	1, 4	
	Взрослая	Почки	3	
Сукачева	Взрослая	Апикальные почки	1	+
даурская	Взрослая	Почки	1, 2	+
Псевдотсуга тисолистная	Ювенильная	Зародыши, семядоли, апекс проростка, гипокотиль	1, 4	+
	Взрослая	Почки, стебли	1, 2	+
Тсуга западная	Ювенильная	Семядоли	1	
<i>Семейство Кипарисовые</i>				
Биота восточная	Ювенильная	Апекс проростка, гипокотиль	1	
Кипарис лузитанский	Ювенильная	Зародыши, семядоли, апекс проростка	1	+
Можжевельник многоплодный	Взрослая	Верхушка побега, стебель	1, 3	

Семейство, вид	Фаза развития первичного экспланта	Происхождение экспланта	Метод размножения	Укоренение
Туя: гигантская	Ювенильная	Апекс проростка	1, 2	+
	Взрослая	Верхушка побега	1, 2	
западная	Ювенильная	Зародыш	1	+
	Взрослая	Верхушка побега	1	
<i>Семейство Араукариевые</i>				
Араукария: чилийская	Ювенильная	Гипокотиль	1, 3	+
	Взрослая	Стебель	1	
узколистная	Ювенильная	Гипокотиль	1	
кунихами	Ювенильная	Гипокотиль	1	
<i>Семейство Таксодиевые</i>				
Секвойя вечнозеленая	Ювенильная	Зародыш, апекс проростка	1, 3	+
Криптомерия японская	Ювенильная	Семядоли, гипокотиль	1, 3	+
	Взрослая	Почки, стебли	1, 3	

Примечание: 1 — образование адвентивных почек; 2 — клонирование древесных пород с применением методов микрочеренкования; 3 — дифференциация почек в каллусе; 4 — соматический эмбриогенез в каллусе.

В качестве экспланта используют онтогенетически молодые ткани: зародыши, верхушки проростков, семядоли и сегменты гипокотилей проростков, так как они обладают большими способностями к размножению, чем ткани взрослых растений. Клональное микро-размножение хвойных чаще происходит путем индукции образования адвентивных почек непосредственно в тканях первичного экспланта под воздействием гормонов группы цитокининов. Образовавшиеся почки после отделения от материнского экспланта и самостоятельного культивирования на среде без гормонов развиваются и формируют побеги, способные к укоренению (см. табл. 3.2).

Другой способ, применяемый при размножении хвойных пород, — размножение клеток, образование каллуса и последующая регенерация из него растений. Пока работы в этом направлении носят поисковый характер и не имеют практического выхода, так как каллусы часто не способны к регенерации почек, что связано либо со спецификой самой породы, либо с трудностями подбора условий

культивирования, обеспечивающих полное восстановление целого растения.

Наряду с названными методами для хвойных пород существует возможность регенерации растений через соматический эмбриогенез. Еще в середине 1980-х гг. соматические зародыши и растения-регенеранты были получены для лжетсуги Мензиса и лиственницы европейской. В настоящее время американский ученый П. К. Гупта с соавторами разработали метод размножения древесных растений через соматический эмбриогенез, который был широко апробирован на большом количестве хвойных пород.

Литературные данные свидетельствуют о возрастающем интересе исследователей к методам культуры тканей, примененным для хвойных пород, которые могут использоваться как с практической целью, так и для научных исследований.

Клональное микроразмножение некоторых видов сосны и ели. В табл. 3.3. приведены данные о способах клонального микроразмножения некоторых видов сосны и ели и полученных результатах.

Наибольшее распространение для перечисленных в табл. 3.3 пород получило использование в качестве первичного экспланта изолированных зародышей или разных частей молодых проростков (семядолей, верхушек проростков, сегментов гипокотилия). При культивировании их на соответствующих питательных средах наблюдалось массовое образование адвентивных почек, из которых формируются побеги и целые растения. В качестве регуляторов роста при этом используют только цитокинин или цитокинин в сочетании с ауксином. Причем процесс дифференциации почек, по мнению некоторых авторов, зависит от многих факторов, а именно от вида растения, применяемых фитогормонов и их концентраций, а также от продолжительности культивирования на среде с гормонами.

Таблица 3.3

Применение культуры *in vitro* для клонирования растений представителей рода сосна и ель

Род, вид	Фаза развития первичного экспланта	Происхождение экспланта	Метод размножения*	Укоренение
<i>Сосна</i>				
Банкса	Ювенильная	Зародыши	3	
калабрийская	Ювенильная	Зародыши, семядоли	1, 3	
канарская	Ювенильная	Семядоли	Каллус	
скрученная	Ювенильная	Зародыши	1	
карибская	Ювенильная	Зародыши	1	

Род, вид	Фаза развития первичного экспланта	Происхождение экспланта	Метод размножения*	Укоренение
Культера	Ювенильная	Зародыши	1, 3	
короткохвойная	Ювенильная	Семядоли, гипокотиль	3	
замечательная	Ювенильная	Зародыши	1	
яйцеплодная	Ювенильная	Зародыши, семядоли	1	+
приморская	Ювенильная	Семядоли, гипокотиль, корень	1 Каллус	
	Взрослая	Почки	1, 2	
пицундская	Ювенильная	Апекс проростка	1	
желтая	Ювенильная	Зародыши	1, 3	
	Взрослая	Пучок хвои	1, 2	
лучистая	Ювенильная	Зародыши, семядоли	1, 3	+
красная	Ювенильная	Зародыши, апекс проростка	3	+
обыкновенная	Ювенильная	Зародыши, семядоли, апекс проростка, гипокотиль	1, 3	
	Взрослая	Пучок хвои	1, 2	
веймутова	Ювенильная	Зародыши, семядоли, апекс проростка, гипокотиль	1, 3	+
	Взрослая	Стебель	Каллус	
ладанная	Ювенильная	Семядоли	1	+
	Взрослая	Стебель	Каллус	
<i>Ель</i>				
обыкновенная	Ювенильная	Незрелые и зрелые зародыши, гипокотиль	1, 3, 4	
	Взрослая	Почки, хвоя, стебель	1 Каллус	

Род, вид	Фаза развития первичного экспланта	Происхождение экспланта	Метод размножения*	Укоренение
канадская	Ювенильная	Гипокотиль	1	
белая	Ювенильная	Незрелые и зрелые зародыши, гипокотиль	1, 4	
черная	Ювенильная	Зародыши, гипокотиль	1, 4	+
колючая	Ювенильная	Почки	1	

Примечание: 1 — образование адвентивных почек; 2 — клонирование древесных пород с применением методов микрочеренкования; 3 — дифференциация почек в каллусе; 4 — соматический эмбриогенез в каллусе.

Так, в одних и тех же условиях выращивания у 20—34,5 % зародышей перечисленных выше видов сосен наблюдается образование адвентивных почек, в то время как для ели это значение не превышало 10 %. Сравнивая естественные условия произрастания перечисленных видов сосен с условиями роста ели обыкновенной, можно заключить, что для данных видов сосен характерно произрастание, как правило, в субтропическом поясе, их ареал находится в восточной части Северной Америки, на побережье Черного моря к югу от г. Сочи. Они отличаются исключительной способностью формировать поросль от пня или корневую поросль. Эти данные еще раз подтверждают мнение некоторых авторов о том, что южные виды хвойных пород обладают большими способностями к размножению, чем ткани и органы растений северных популяций, к которым относится и ель обыкновенная. Поэтому методика, разработанная для особей одного вида, не всегда приемлема для других особей этого же вида и тем более для другого и требует порой значительных модификаций.

Важную роль в процессе клонального микроразмножения играют не только видовые и генотипические особенности культивируемых тканей, но и гормональный баланс, соотношение концентраций цитокининов и ауксинов в питательной среде. Так А. Арнольд и Н. Эриксон при изучении морфогенетических процессов зародышей ели обыкновенной отметили, что добавление в среду 2-изопентениладенина значительно стимулировало процесс образования адвентивных почек по сравнению с действием БАП, в то время как добавление в среду кинетина приводило к нормальному развитию зародышей в проросток. Одновременно с этим авторы показали, что время культивирования зародышей на среде с цитокинином также оказывало существенное влияние на формирование почек

de novo. Так, на среде с оптимальной, по их мнению, концентрацией 2-изопентениладенина (5,0 мкМ) культивирование первичного экспланта в течение 4—5 недель было наиболее эффективным (45 %), в то время как уменьшение этого периода до 1—2 недель или его увеличение до 6 недель значительно снижало способность эксплантов к дифференциации адвентивных почек. Применение зеатина, кинетина или 2-изопентениладенина для индукции образования адвентивных почек было малоэффективно для зародышей некоторых представителей сосен, для которых БАП оказался наиболее эффективным цитокинином.

С целью индукции образования адвентивных почек непосредственно на зародышах, культивируемых в условиях *in vitro*, применяют три схемы: 1) культивирование эксплантов на среде, содержащей цитокинин в небольшой концентрации в течение 1—1,5 месяцев; 2) выдерживание зародышей в концентрированном растворе цитокининов в течение короткой экспозиции (1—5 ч); 3) культивирование их на среде с повышенной концентрацией цитокинина (более 88,0 мкМ) в течение 5—8 суток с последующей пересадкой их на безгормональную среду. Два последних способа получили название *импульсной обработки*. Чаще применяемым из этих способов при клональном микроразмножении хвойных пород оказался первый. Констатируется, что культивирование изолированных зародышей на питательной среде, содержащей повышенные концентрации гормонов в течение 1 недели, приводит к формированию витрифицированных адвентивных почек, которые в дальнейшем не способны образовывать нормальные побеги.

Адвентивные почки можно индуцировать не только на изолированных зародышах, но и при культивировании на соответствующих питательных средах семядолей, апексов, а также сегментов гипокотилия проростков. Так, при культивировании апикальных меристем проростков различных представителей сосен и елей на питательных средах, содержащих различные цитокинины (БАП, кинетин, зеатин) в сочетании с ИМК или НУК, происходило формирование адвентивных почек непосредственно из тканей экспланта. Впоследствии на средах с пониженным содержанием гормонов почки развивались в побеги. Однако интенсивность роста сформировавшихся побегов была невысокой и не всем авторам удалось получить в достаточном количестве побеги, которые в дальнейшем можно было использовать для укоренения. По мере культивирования таких побегов на безгормональной среде были отмечены опадение хвоинок, некротизация базальной части или полное побурение сформировавшихся побегов. Все эти негативные явления вели к уменьшению коэффициента размножения и к получению посадочного материала низкого качества.

Для сосны обыкновенной Т. Транван и Д. Томас провели специальные эксперименты, целью которых было изучение образования адвентивных почек на апикальной части проростка. Они показали, что полное или частичное удаление семядолей проростка резко уменьшало количество образующихся вблизи апекса почек. При культивировании апекса с хвоей образование почек *de novo* было максимально и составило 45 %. Однако последующее размножение сформировавшихся побегов и особенно их укоренение было очень затруднено, и положительные результаты не были получены. Лишь Н. Борнману с соавторами и Х. Хуангу удалось добиться 20 % укоренения побегов сосны обыкновенной на среде, содержащей кумарин в сочетании с ИУК.

Использование семядолей и сегментов гипокотилей проростков сосны веймутовой, сосны канарской, сосны короткохвойной, сосны скрученной, сосны лучистой и ели белой в качестве первичного экспланта и культивирование их на питательной среде, содержащей в качестве добавки только цитокинин, способствовало образованию адвентивных почек лишь для сосны канарской, сосны лучистой и ели белой, которые на безгормональной среде вытягивались, формировали побеги и через 3 месяца роста укоренялись.

В Институте физиологии растений имени К. А. Тимирязева (г. Москва) РАН РФ получены интересные результаты с елью обыкновенной, касающиеся влияния форм деревьев по степени выраженности мутовчатости на способность к размножению их потомства в культуре ткани. Все особи ели были разделены в зависимости от степени выраженности мутовчатости: четко выражена, слабо выражена, отсутствует. Изолированные из семян зародыши культивировали на питательной среде, содержащей различные цитокинины (БАП, зеатин, тиадиазурон) в различных концентрациях, в течение 1—2 месяцев, после чего переносили на безгормональную среду и определяли процент эксплантов, образующих адвентивные почки. Установлено, что на среде с зеатином в среднем 62 % эксплантов, изолированных с деревьев с четко выраженной мутовчатостью, образовывали адвентивные почки, а от деревьев без признака мутовчатости — только 28 %. Во всех вариантах была отмечена следующая закономерность: чем отчетливее выражена мутовчатость, тем выше способность к размножению. Таким образом, применяя для клонального микроразмножения ели обыкновенной семена, собранные с деревьев с четко выраженной мутовчатостью, можно значительно повысить процент эксплантов, образующих адвентивные почки.

Принципиально иной метод клонального микроразмножения хвойных пород заключается в получении растений через каллусную культуру. В литературе по этому поводу существует два мнения. Одни исследователи считают, что для хвойных пород данный метод размножения перспективен, так как каллусная ткань хвойных характеризуется генетической стабильностью, которая сохраняется

при многократном переносе на свежую питательную среду, а следовательно, полученные растения-регенеранты будут идентичны исходному клону.

В то же время имеются сведения и о генетической изменчивости почек, образовавшихся из каллусных клеток хвойных. Это было доказано, например, на побегах, образованных из каллусной ткани зародышей сосны ладанной. Побеги отличались разной интенсивностью роста, высотой стволика, а также охвоением и длиной молодой хвои. Данный метод микроразмножения связан также с большими трудностями получения растений-регенерантов из каллуса по сравнению с травянистыми и лиственными древесными растениями. Поэтому работ в этом направлении мало.

Исследования по изучению влияния комбинаций ауксинов и цитокининов, состава основной питательной среды и углеродного питания на образование каллуса и последующую регенерацию растений были проведены Г. А. Тусканом с соавторами при работе с семядолями проростков сосны желтой. Во всех сериях опытов отмечено, что со временем скорость роста каллусной ткани снижается, а регенерация растений происходит лишь к 120 дням культивирования каллусов на среде, содержащей цитокинин и ауксин в соотношении 100:1.

Более многочисленные работы связаны с изучением влияния гормонов и их соотношения на процесс каллусообразования. Была исследована также зависимость этого процесса от освещения. Работа проводилась с зародышами и гипокотильями проростка ели обыкновенной. Авторы отметили, что зародыши, выращенные в темноте, в 30 % случаев формировали каллус, из которого возможно получить соматические зародыши, и в редких случаях — адвентивные почки, в то время как на свету 50 % зародышей были способны образовывать в каллусе адвентивные почки и только незначительный процент — зародыши, развитие которых было затруднено.

Третий, мало практикуемый пока способ размножения древесных растений *in vitro*, — *соматический эмбриогенез*. В данном случае первичным эксплантом служат незрелые зародыши. Основная часть работ проведена с некоторыми представителями рода ель, для которых удалось разработать методику получения зародышей лишь до ранней стадии развития.

Интересные результаты по соматическому эмбриогенезу и регенерации растений из зародышей ели белой получены Ф. М. Тремблай. В экспериментах использовали зародыши, изолированные из хранившихся от 3 до 11 лет семян. Отмечено, что процент образования каллуса с зачатками эмбриоподобных структур зависит от географического происхождения семян, способности к прорастанию, времени и условий их хранения. Каждый дополнительный год хранения семян снижал процент формирования соматических зародышей в каллусной ткани в среднем на 4,7 %. Растения, полу-

ченные из соматических зародышей и высаженные в теплицу, морфологически не отличались от контрольных растений, полученных из семян. Соматический эмбриогенез также был получен для ели белой и обыкновенной, а для гибрида ели белой и ели Энгельмана впервые продемонстрировано высокоэффективное микроразмножение этим способом. При сравнении соматических проростков и контрольных сеянцев не обнаружено значительных различий в соотношениях длины корня и побега. Для большинства видов приживаемость регенерантов в почвенных условиях составила 80—100 %. К концу первого вегетационного периода высота их составила 6—12 см и не уступала высоте контрольных сеянцев. Для сосны исследования по соматическому эмбриогенезу в настоящее время носят поисковый характер.

В настоящее время в США соматический эмбриогенез хвойных пород широко применяется при производстве искусственных семян. Этот процесс уже поставлен на промышленную основу в *Weyerhaeuser Company* (рис. 3.15).

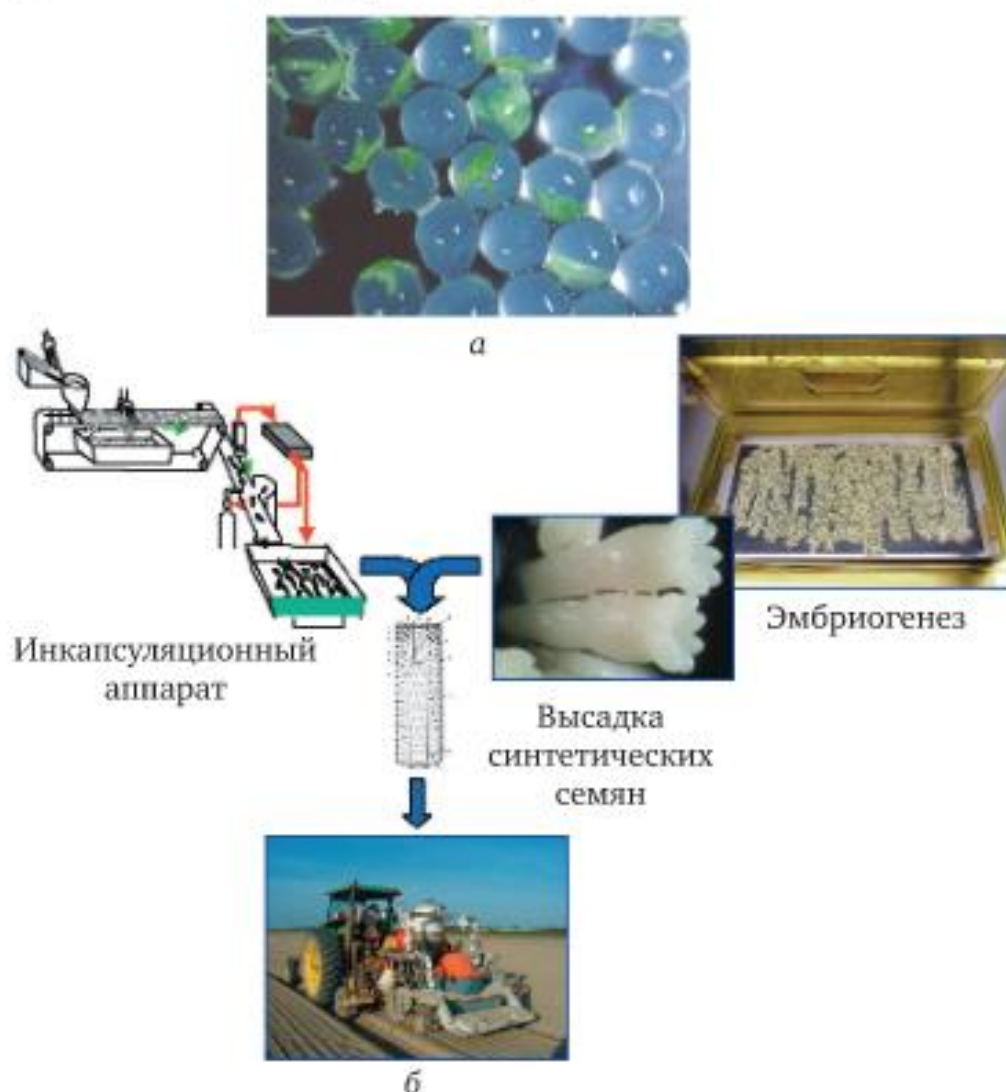


Рис. 3.15. Автоматизированная система производства искусственных семян (а), с последующей высадкой клоновой рассады на поля (б) (Шестибратов, 2008)

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о возможности размножения хвойных древесных растений путем соматического эмбриогенеза. Однако массовое размножение данным способом пока невозможно, так как контролируемый морфогенез и соматический эмбриогенез в каллусных культурах древесных растений, особенно хвойных, трудно осуществим и малоэффективен. Кроме того, разработанные методики несовершенны.

В настоящее время использование изолированных зародышей и различных частей молодого проростка — единственный реальный путь ускоренного клонального микроразмножения хвойных древесных растений.

Для основных лесообразующих пород России, прежде всего сосны обыкновенной и ели европейской, в перспективе возможно включение способа культуры изолированных зародышей в систему селекции. В данном случае сокращается примерно в 3,5—4 раза срок получения посадочного материала (рис. 3.16). Так, в Онтарио (Канада) ежегодно высаживают на лесокультурную площадь более 60 млн саженцев ели черной, выращенных из изолированных зародышей в стерильных условиях.



Рис. 3.16. Практическое применение способа клонального микроразмножения в системе селекции хвойных пород

Таким образом, учитывая сортовые особенности, необходимо для каждого конкретного растения подбирать определенные условия культивирования с целью разработки эффективных технологий клонального микроразмножения.

Контрольные вопросы и задания

1. Расскажите о применении клонального микроразмножения в цветоводстве и плодоводстве.
2. Что такое лесная биотехнология?
3. Какое существует преимущество включения клонального микроразмножения в селекционный процесс хвойных пород?
4. Что вы знаете о практическом применении клонального микроразмножения в сохранении биоразнообразия растений, занесенных в Красную книгу?
5. Назовите основные учреждения, занимающиеся размножением растений в условиях *in vitro*.

Глава 15

ОЗДОРОВЛЕНИЕ ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ОТ ВИРУСОВ. МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ

Одним из лимитирующих факторов получения высокопродуктивных растений являются вирусные заболевания. Именно они становятся причиной потери от 10 до 50 % урожая сельскохозяйственных культур, размножающихся вегетативно. Например, установлено, что соя и некоторые другие важные бобовые растения передают вирусы потомству даже при семенном размножении, в результате чего сорта постепенно отягощаются грузом вирусных инфекций. Кроме того, особое значение производства безвирусного посадочного материала имеет для плодовых, ягодных и декоративных культур. Вирусы являются внутриклеточными микроскопическими паразитами, использующими для своего воспроизводства биосинтетические системы и строительный материал клеток хозяина. Поэтому борьба с ними — острая проблема растениеводства. Для решения данной проблемы применяют различные приемы: например, для снижения вредоносности вирусных и фитоплазменных заболеваний растений производят закладку насаждений сертифицированным безвирусным посадочным материалом, который получают в специализированных лабораториях и научных центрах.

Основное преимущество клонального микроразмножения — получение генетически однородного и безвирусного посадочного материала. Этого возможно достичь, используя меристемные ткани апексов и пазушных почек органов стеблевого происхождения, а также применяя термо- и хемотерапию.

15.1. Вирусы, их структура, механизм инфицирования.

Классификация вирусов

Вирусы (от лат. *virus* — яд) — это мельчайшие организмы (не более 200—300 нм), невидимые в световой микроскоп, не имеющие

клеточного строения, лишённые собственных систем энергообеспечения, отличающиеся паразитическим способом существования, т. е. являющиеся внутриклеточными паразитами. Детальное изучение вирусов стало возможным с развитием электронной микроскопии, биохимии, молекулярной биологии.

Вирусные частицы (вирионы) имеют белковую капсулу — капсид, содержащий геном вируса, представленный одной или несколькими молекулами ДНК или РНК (рис. 3.17).

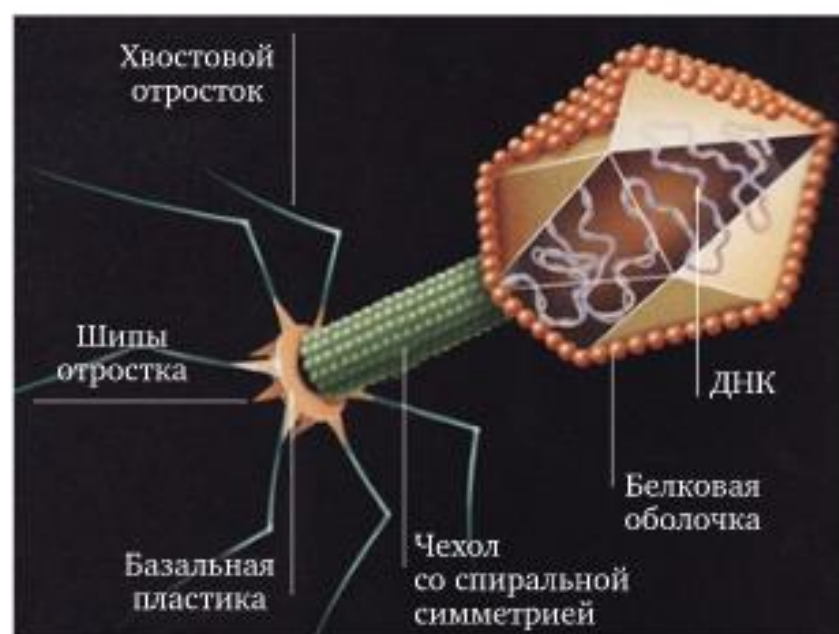


Рис. 3.17. Строение вируса

Капсид построен из капсомеров — белковых комплексов, состоящих, в свою очередь, из протомеров. Вирионы часто имеют правильную геометрическую форму (икосаэдр, цилиндр). Такая структура капсида предусматривает идентичность связей между составляющими ее белками и, следовательно, может быть построена из стандартных белков одного или нескольких видов, что позволяет вирусу «экономить» место в геноме. Белки капсида комплементарны определенным молекулярным структурам в клетке хозяина и вступают с ними во взаимодействие, необходимое для проникновения и существования вируса. Капсид защищает вирус только вне живой клетки. Вне клетки-хозяина вирусы ведут себя как вещество (могут быть получены в кристаллической форме); попав в живую клетку, они вновь проявляют активность.

Условно процесс вирусного инфицирования в масштабах одной клетки можно разбить на следующие этапы.

Присоединение к клеточной мембране — так называемая адсорбция. Обычно, для того чтобы вирус адсорбировался на поверхности клетки, она должна иметь в составе своей плазматической мембраны специфический белок (часто гликопротеин) — рецептор,

специфичный для данного вируса. Наличие рецептора нередко определяет круг хозяев данного вируса, а также его тканеспецифичность.

Проникновение в клетку. На этом этапе вирусу необходимо доставить внутрь клетки свою генетическую информацию. Некоторые вирусы приносят также собственные белки, необходимые для ее реализации. Различные вирусы для проникновения в клетку используют разные стратегии. Вирусы также различаются по локализации их репликации: часть вирусов размножается в цитоплазме клетки, а часть — в ее ядре.

Перепрограммирование клетки. При заражении вирусом в клетке активируются специальные механизмы противовирусной защиты. Зараженные клетки начинают синтезировать сигнальные молекулы, например интерфероны, переводящие окружающие здоровые клетки в противовирусное состояние и активирующие системы иммунитета. Повреждения, вызываемые размножением вируса в клетке, могут быть обнаружены системами внутреннего клеточного контроля, и такая клетка должна будет «покончить жизнь самоубийством» в ходе процесса, называемого апоптозом (или программируемой клеточной гибелью). От способности вируса преодолевать системы противовирусной защиты напрямую зависит его выживание. Неудивительно, что многие вирусы, эволюционируя, приобрели способность подавлять синтез интерферонов, апоптозную программу и т. д. Кроме подавления противовирусной защиты, вирусы стремятся создать в клетке максимально благоприятные условия для развития своего потомства.

Персистенция. Некоторые вирусы могут переходить в латентное состояние (так называемая персистенция), слабо вмешиваясь в процессы, происходящие в клетке, и активироваться лишь при определенных условиях. На этом построена, например, стратегия размножения некоторых бактериофагов: до тех пор пока зараженная клетка находится в благоприятной среде, фаг не убивает ее, наследуется дочерними клетками и нередко интегрируется в клеточный геном. Однако при попадании зараженной фагом бактерии в неблагоприятную среду возбудитель захватывает контроль над клеточными процессами так, что клетка начинает производить материалы, из которых строятся новые фаги. Клетка превращается в «фабрику», способную производить многие тысячи фагов. Зрелые частицы, выходя из клетки, разрывают клеточную мембрану, тем самым убивая клетку. С персистенцией вирусов связаны некоторые онкологические заболевания.

Создание новых вирусных компонентов. Размножение вирусов в самом общем случае предусматривает три процесса:

- 1) транскрипцию вирусного генома, т. е. синтез вирусной матричной РНК (мРНК);
- 2) трансляцию мРНК, т. е. синтез вирусных белков;
- 3) репликацию вирусного генома.

У многих вирусов существуют системы контроля, обеспечивающие оптимальное расходование биоматериалов клетки-хозяина. Например, когда вирусной мРНК накоплено достаточно, транскрипция вирусного генома подавляется, а репликация, напротив, активируется.

Созревание вирионов и выход из клетки. В конце концов новосинтезированные геномные РНК или ДНК «одеваются» соответствующими белками и выходят из клетки. Следует отметить, что активно размножающийся вирус не всегда убивает клетку-хозяина. В некоторых случаях дочерние вирусы отпочковываются от плазматической мембраны, не вызывая ее разрыва. Таким образом, клетка может продолжать жить и продуцировать вирус.

Классификация вирусов. Систематику и таксономию вирусов кодифицирует и поддерживает Международный комитет по таксономии вирусов (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV), поддерживающий также и таксономическую базу *The Universal Virus Database ICTVdB*.

Форма представления генетической информации лежит в основе современной классификации вирусов. В настоящее время их подразделяют на ДНК- и РНК-содержащие вирусы.

К вирусам относятся *бактериофаги* — паразиты микроорганизмов. Они состоят из двух частей: призматической головки и хвостового отростка. Если добавить к микробам бактериофаг, действующий именно на данный вид микробов, то через несколько минут его можно обнаружить на поверхности микробной клетки, к которой он прикрепляется отростком. Затем бактериофаг выделяет фермент, растворяющий оболочку бактерии в месте прикрепления отростка. Сквозь это отверстие ДНК, находящаяся в головке, попадает в клетку. Капсид остается снаружи. Под влиянием ДНК фага обмен веществ бактерии перестраивается, белоксинтезирующие системы бактерии образуют белки фага, происходит репликация фаговой ДНК. Через 15—30 мин оболочка клетки разрывается, и огромное количество фагов выходит в окружающую среду. Фаги заражают новые клетки, вызывая их лизис.

15.2. Оздоровление посадочного материала от вирусов

Освобождения растений от вирусов возможно достичь, применяя культуру изолированных меристем, а также приемы термотерапии и хемотерапии.

Культура изолированных меристем. Меристемы, или образовательные ткани, или меристематические ткани (от др.-греч. *μερίστος* — делимый) — обобщающее название для тканей растений, состоящих из интенсивно делящихся и сохраняющих физиологиче-

скую активность на протяжении всей жизни клеток, обеспечивающих непрерывное нарастание массы растения и предоставляющих материал для образования различных специализированных тканей (проводящих, механических и т. п.). Как правило, меристема состоит из конуса нарастания, а также одного или двух листовых зачатков (примордиев) и является свободной от вируса.

В составе меристем различают: 1) инициальные клетки, или инициали; 2) производные от инициалей. Инициали сохраняют способность к делению в течение всей жизни растения и всегда остаются в составе меристем. Производные от инициалей делятся некоторое число раз и затем превращаются в постоянные ткани.

По происхождению различают: 1) первичные меристемы, которые берут начало непосредственно от меристем зародыша; 2) вторичные меристемы, образующиеся на более поздних этапах развития растения, либо из первичных меристем, либо в результате дедифференциации постоянных тканей. Постоянные ткани, образовавшиеся из первичных меристем, называются первичными, из них складывается первичная структура тела растения. Из вторичных меристем образуются вторичные ткани, которые определяют вторичный рост растения.

В зависимости от местоположения выделяют четыре типа меристем: 1) верхушечные, или апикальные; 2) боковые, или латеральные; 3) вставочные, или интеркалярные; 4) раневые, или травматические.

Верхушечные (апикальные) меристемы закладываются с первых стадий развития зародыша на верхушке побега и на кончике зародышевого корешка. По мере роста и ветвления на каждом боковом побеге и каждом корне образуются свои верхушечные (апикальные) меристемы. Они обеспечивают рост этих органов в длину. Апикальные меристемы всегда первичны, они образуют конусы нарастания корня и побега (рис. 3.18).

Боковые (латеральные) меристемы располагаются по окружности осевых органов (корней, стеблей) в виде цилиндров, которые на поперечных срезах выглядят, как кольца. Первичные боковые меристемы — прокамбий, перицикл — возникают под апексами и в непосредственной связи с ними. Вторичные латеральные меристемы: камбий (возникает из прокамбия) и пробковый камбий — феллоген (образуется из клеток постоянных тканей). Боковые меристемы обеспечивают рост корня и стебля в толщину. Из прокамбия и камбия образуются проводящие ткани, из феллогена — перидерма.

Вставочные (интеркалярные) меристемы находятся в основаниях междоузлий побегов и молодых листьев. Они первичны, поскольку являются остатками верхушечных меристем, их дифференциация задерживается по сравнению с остальными тканями. Вставочные меристемы не имеют в своем составе инициалей и со временем

полностью превращаются в постоянные ткани. В их составе могут присутствовать некоторые дифференцированные элементы, например проводящие. Интеркалярный рост характерен для стеблей злаков, наблюдается также в основании луковиц, завязей.

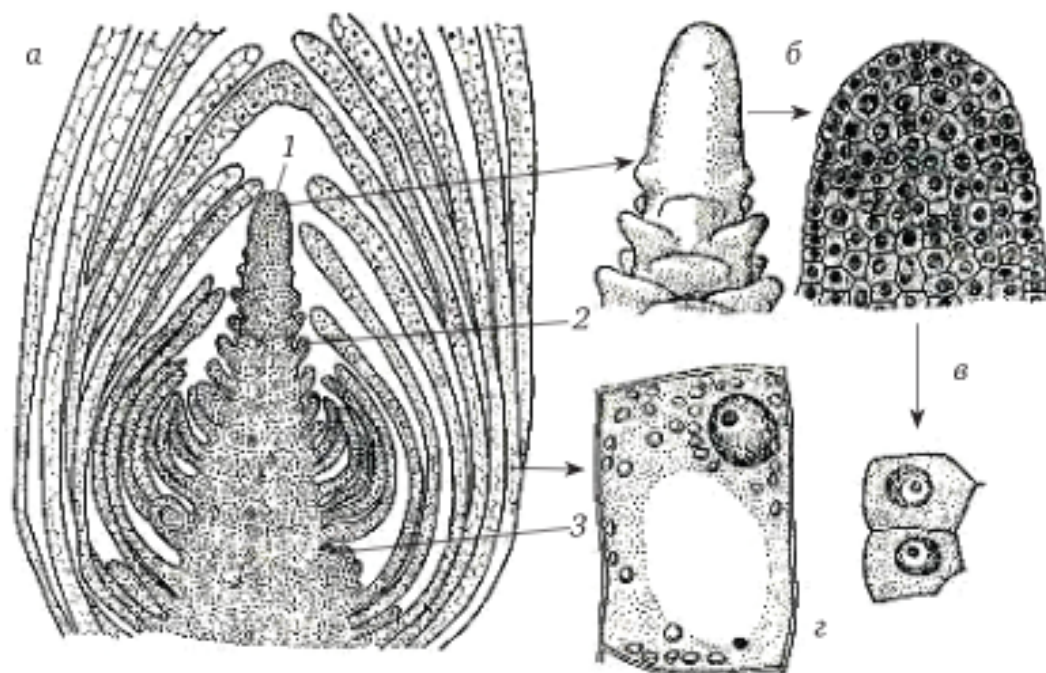


Рис. 3.18. Верхушечная меристема побега элодеи:

а — продольный разрез; *б* — внешний вид и продольный разрез конуса нарастания; *в* — клетки первичной меристемы; *г* — паренхимная клетка листа, закончившая дифференцировку; 1 — конус нарастания; 2 — зачаток листа; 3 — зачаток бокового побега

Раневые (травматические) меристемы обычно образуются при повреждении тканей и органов. Живые клетки постоянных тканей, окружающие пораженные участки, дедифференцируются и начинают делиться, т. е. превращаются во вторичную меристему.

Предположение о возможности отсутствия вирусов в меристематических тканях больных растений впервые высказано Д. Чунгом (1938) и П. Р. Уайтом (1943). Начиная с 1950-х гг. были поставлены первые успешные опыты по получению свободных от вирусов растений георгина из точки роста. Авторы этого метода Ж. Морель и С. Мартин полагали, что в больном растении вирус распространяется с отставанием от быстро растущих молодых органов, особенно в молодых недифференцированных тканях, где концентрация вируса может снижаться вплоть до полного отсутствия. Теоретические концепции, положенные в основу этого метода, стали проявляться в последнее время.

Структурной основой используемого на практике явления служит специфика строения точки роста растений; дистальная ее часть, представленная апикальной меристемой, у разных растений имеет

средний диаметр до 200 мкм и высоту от 20 до 150 мкм. В более нижних слоях дифференцирующиеся клетки меристемы образуют прокамбий, дающий начало пучкам проводящей системы. Такая особенность строения апикальной меристемы исключает проникновение в нее вируса за счет быстрого транспортирования по проводящей системе, но допускает возможность медленного распространения через плазмодесмы, соединяющие меристематические клетки.

Известно, что успех клонального микроразмножения зависит от размера меристематического экспланта: чем больше листовых зачатков и тканей стебля, тем легче происходит процесс морфогенеза, заканчивающийся получением целого, нормального растения. Вместе с тем зона, свободная от вирусных частиц, очень различается для разных вирусов. Это зависит также от вида и сорта растения. Например, в coleoptile злаков размеры участка верхушки, не содержащей сосуды, могут достигать 250 мкм. Такая особенность строения апикальной меристемы исключает проникновение в нее вируса путем быстрого транспортирования по проводящей системе, но допускает возможность медленного распространения через плазмодесмы, соединяющие меристематические клетки. Культивирование апикальной меристемы картофеля величиной 200 мкм на питательной среде и дальнейшее получение из нее растений-регенерантов показали, что среди этих растений только 10 % были свободны от X-вируса, но 70 % — от Y-вируса.

Применение электронной микроскопии часто обнаруживает наличие вирусов в меристеме пораженных ими растений. Это, впрочем, подтверждает общеизвестный факт: число лишенных вируса растений после подобной операции чрезвычайно мало, и многие меристемы пораженных растений инфицированы.

Таким образом, эффективность применения апикальной меристемы в качестве метода оздоровления зараженных вирусами растений оказывается низкой. Это было доказано результатами, полученными рядом меристемных лабораторий РФ, показывающими, что из апикальных меристем растений гвоздики, цимбидиума, пораженных вирусами CarMV и CarVMV, в условиях *in vitro* получают инфицированные мериклоны.

В принципе возможно получение безвирусной апикальной меристемы от больного растения, но при этом риск попадания вирусов в здоровые ткани должен быть снижен до нуля. Это может быть достигнуто путем применения предварительной термотерапии исходных растений или хемотерапии.

Термотерапия. Метод термотерапии применяется как в условиях *in vivo*, так и *in vitro*. Этот метод предусматривает использование сухого горячего воздуха. Для объяснения механизма освобождения растений от вирусов в процессе термотерапии существуют различ-

ные гипотезы. Согласно одной из них, высокие температуры воздействуют непосредственно на вирусные частицы через их рибонуклеиновую кислоту и белковую оболочку, вызывая физическое разрушение и лишая вирусные частицы инфекционности. Вторая гипотеза состоит в том, что высокая температура действует на вирусы через метаболизм растений. Под влиянием высоких температур нарушается равновесие между синтезом и деградацией вирусных частиц. Если преобладает синтез, то концентрация вируса в зараженных тканях растет, и наоборот.

Растения, подвергающиеся термотерапии, помещают в специальные термокамеры (термостат), где в течение первой недели повышают температуру от 25 до 37 °С путем ежедневного увеличения параметров температур на 2 °С. Не менее важно при термотерапии создавать и поддерживать на протяжении всего процесса оптимальные режимы: температуру 37 °С, освещенность лампами дневного света 5 тыс. лк, фотопериод в зависимости от культуры 14—16 ч в сутки при относительной влажности воздуха в термокамере 90 %.

Продолжительность термотерапии всецело зависит от состава вирусов и их термостойкости. Если, например, для гвоздики достаточно 10—12-недельного теплого воздействия, то для освобождения хризантемы от Б-вируса этот период длится 12 недель и более. Однако существуют растения, например луковичные культуры, цимбидиум, розы и др., рост которых угнетается в результате длительной термотерапии *in vivo*. Для таких растений целесообразно проводить термотерапию растений-регенерантов *in vitro*.

Помимо позитивного действия термотерапии на освобождение растений от вирусов выявлен положительный эффект высоких температур на точку роста и процессы морфогенеза некоторых цветочных культур (гвоздики, хризантемы, фрезии) в условиях *in vitro*. Применение термотерапии позволяет увеличить коэффициент размножения на 50—60 %, повысить адаптацию растений-регенерантов к почвенным условиям, а также получить более высокий процент безвирусных маточных растений.

Применение термотерапии в сочетании с меристемной культурой позволяет оздоровить более 70 % растений-регенерантов хмеля от вирусного хлороза, 90 % растений земляники, 25 % — черной и красной смородины, 50 % — малины, более 80 % — картофеля. Проверку растений на наличие вирусов, как правило, проводят с помощью иммуноферментного анализа, электронной микроскопии и травянистых растений-индикаторов.

Хемотерапия. Другой способ, применяемый для освобождения растений от вирусов, — хемотерапия. Этот метод имеет определенные преимущества перед культурой изолированных меристем и термотерапией: 1) позволяет отказаться от трудо-, материало-

и энергозатратной суховоздушной термотерапии; 2) дает возможность использовать относительно крупные экспланты при введении их в культуру *in vitro* (1 мм и более); 3) сокращает время оздоровления благодаря совмещению этапа культивирования микрорастений с терапией; 4) обеспечивает высокий выход безвирусных растений-регенерантов.

Многолетние исследования авторов в области хемотерапии вирусов плодовых, ягодных, декоративных и других культур *in vitro* позволили выявить наиболее эффективные виды и концентрации противовирусных препаратов, способных подавлять различающиеся по биологии иларвирусы, потивирусы, неповирусы, рабдовирусы, аденовирусы, садвавирусы, триховирусы, капилловирусы и флави-вирусы и увеличивать выход безвирусного посадочного материала.

К настоящему времени обнаружено множество соединений, обладающих противовирусной активностью. Это экстракты некоторых высших растений и водорослей, культуральные жидкости ряда грибов и бактерий, ферменты-рибонуклеазы, РНК некоторых микроорганизмов, интерферон, физиологически активные соединения растений (в том числе витамины и фитогормоны) и другие природные и синтетические химические соединения. Только в конце 1980-х — начале 1990-х гг. в США и Германии в качестве ингибиторов вирусов запатентовано несколько десятков синтетических химических соединений, в частности лигносульфоновые кислоты, лигносульфонаты, ряд жирных кислот, триазины, гуанидины, фосфатиды, карбамиды, полилизин, некоторые амины, гетероциклы, дифенилы и др., а из биогенных средств — биназы и олигонуклеотиды.

Противовирусные соединения должны обладать следующими характеристиками: 1) надежное предотвращение заражения растений и размножение патогена; 2) системное перемещение в обработанных растениях; 3) отсутствие фитотоксичности; 4) продолжительный срок действия; 5) безопасность для окружающей среды и человека; 6) низкая стоимость и доступность; 7) широкий спектр действия на фитопатогенные вирусы.

Наиболее перспективными противовирусными соединениями считаются следующие: 1) аналоги и производные пуриновых и пиримидиновых оснований; 2) ферменты-рибонуклеазы; 3) интерферон и интермедиаты действия интерферона — олигоаденилаты; 4) некоторые антибиотики; 5) полианионы, особенно ряд высокомолекулярных органических кислот и ангидридов; 6) физиологически активные соединения растений (цитокинины, никотиновая и 2-хлорэтилфосфоновая кислоты и др.).

По механизму действия на вирусы противовирусные препараты делятся на две группы: 1) истинные ингибиторы вирусов (непосредственно воздействуют на РНК вирусов и (или) вирусный структурный белок); 2) индукторы устойчивости растений к заражению

вирусами (действуют на вирусы опосредованно, включая и стимулируя механизмы иммунитета самих растений).

В свою очередь, по стадиям вирусного цикла, которые они угнетают, все противовирусные препараты делятся на следующие основные группы: ингибиторы, препятствующие проникновению вируса в клетку; ингибиторы синтеза вирусных нуклеиновых кислот и белков; ингибиторы, угнетающие поздние стадии репродукции вируса.

Наиболее изученными ингибиторами являются аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований. К таким веществам относится препарат «Виразол» (рибаверин — 1-β-D-рибофуранозил-1,3,5-триазол-3-карбоскамид) синтезированное специально для противовирусной химиотерапии. Ингибирующее действие рибаверина установлено против целого ряда фитопатогенных вирусов: крапчатости красного клевера, X-вируса картофеля, мозаики люцерны, огуречной мозаики и Y-вируса картофеля, хлоротической пятнистости листьев яблони, мозаики яблони. Механизм его действия заключается в следующем: вещество ингибирует биосинтез гуанозин-5-фосфата (анаболита гуанина) в зараженных клетках, а также ингибирует репликацию 5'-конца вирусных РНК.

В культуре *in vitro* применение данного препарата заключается в его добавлении в состав питательной среды в концентрации от 1 до 50 мг/л. При использовании препарата «Вирозол» в культуральной среде процент безвирусных меристемных растений для ряда обычных для этих растений вирусов увеличивался до 80—100 % при 0—41 % в контроле. Положительные результаты химиотерапии были получены для сливы, черешни, малины, некоторых цветочных и других растений. Однако термо- и химиотерапевтические методы оздоровления посадочного материала от вирусов экономически малоэффективны. Поэтому в настоящее время с помощью методов трансгеноза создаются формы растений с генетической устойчивостью к вирусам.

Помимо веществ, относящихся к истинным ингибиторам вируса, существует целый ряд других соединений, которые относятся к индукторам устойчивости к вирусной инфекции. Среди всех выделяются: 1) полианионы, 2) органические кислоты, 3) регуляторы роста, 4) фенольные соединения, 5) полисахариды, 6) гликозиды, 7) интерферон.

Известным индуктором устойчивости растений к вирусам являются полианионы, особенно акриловая, полиакриловая, полиметилакриловая кислоты, поливинилпирролидон, полиакриламид и некоторые производные малеинового ангидрида. Действуя через актиномицины — чувствительные механизмы, эти вещества вызывают повышенный синтез этилена, после чего начинают появляться PR-белки (*pathogenesis-related proteins*). Например, установлена эффективность полиакриловой кислоты против целого ряда фитопатогенных вирусов: табачной мозаики, огуречной мозаики, крап-

чатости клевера красного, мозаики вигны, погрешности табака, картофеля X и Y.

Интенсивное терапевтическое действие на вирусы отмечено еще для одного физиологически активного соединения — 2-хлорэтилфосфоновой кислоты, которая в растениях также оказывает влияние на освобождение этилена. В производстве эта кислота используется как ретардант, в виде препаратов этрел и кампозан. Установлена высокая эффективность кислоты против ряда специфических вирусов зерновых и пасленовых культур. Экзогенными индукторами устойчивости растений к вирусам могут служить также бензойная кислота и ее производные, например парааминобензойная кислота (ПАБК). В отличие от полианионов механизм последних соединений основывается не на стимулировании синтеза этилена, а на непосредственном индуцировании *PR*-белков.

Фенольные соединения являются мощными ингибиторами белок- и РНК-содержащих систем. Поэтому накопление фенолов может служить фактором, препятствующим размножению сильно патогенного штамма вируса. При поражении растений вирусами, как правило, происходит повышение концентрации фенольных соединений в тканях, например, кемпферола, кверцетина, кофейной, хлорогеновой и изохлорогеновой кислот.

В последнее время появляется все больше доказательств важнейшей роли эндогенной салициловой кислоты в качестве регулятора устойчивости растений к различным фитопатогенам, включая вирусы, и индуктора патогенеза независимых белков. Например, установлено, что устойчивость к ВТМ у табака коррелирует с содержанием эндогенной салициловой кислоты и *PR*-белка.

Перспективными индукторами антифитовирусной устойчивости ввиду безвредности для окружающей среды и доступности могут стать также некоторые полисахариды. Выделенные из клеточных стенок грибов и растений олигосахариды, такие, как β -глюканы, хитин, хитозан и пектины, известны своей способностью индуцировать у растений широкий спектр защитных реакций, в частности новообразование фитоалексинов. Например, применение хитозана ингибировало локальную и системную инфекцию вирусов мозаики люцерны, огуречной мозаики, некроза табака и X-вируса картофеля. Установлено, что хитозан не оказывает влияние на заражение вирусами клеток, но блокировал более поздние стадии репродукции этих патогенов — репликацию вирусной РНК или синтез вирусспецифических белков.

Антиоксидантными свойствами обладают выделенные из различных растений вторичные метаболиты — стероидные гликозиды: капсикозид, прототоматин, пурпуреагитозид, функлозид, мелонгозид и др. Обработка ими травянистых растений значительно снижала концентрации вирусов табачной мозаики, скручивания листьев картофеля, некротической кольцевой пятнистости косточ-

ковых, шарки слив и др. Показано, что обработка инфицированных ВТМ растений томатов водными растворами стероидных гликозидов сопровождалась значительным снижением (более чем на 60 %) концентрации вируса в листьях, а добавление в состав питательной среды мелангозида и сомелангозида в 2,5 раза увеличивало выход безвирусных растений картофеля.

Особое место среди индукторов устойчивости занимает интерферон. Как известно, интерферон животных клеток имеет белковую природу, может индуцироваться вирусами и РНК, а также стимулирует образование в клетках 2'—5'-олигоаденилатов, обладающих противовирусной активностью. Определенное сходство интерферона с образующимися в растениях PR-белками явилось предпосылкой для его испытаний против фитопатогенных вирусов. Экспериментально установлено, что человеческий лейкоцитарный интерферон способен подавлять репродукцию вирусов табачной мозаики, Y-, F-, M- и S-вирусов картофеля. Применение интерферона в культуре меристем картофеля в 1,5—2,7 раза увеличивало выход безвирусных растений-регенерантов. Под действием интерферона в тканях растений происходит увеличение активности олигоаденилатсинтетазы, полимеризующей АТФ с образованием олигоаденилатов, обладающих антивирусной активностью. Предполагается, что сигнал к синтезу олигоаденилатов передается по цепочке: вирус — РНК вируса — интерфероноподобные белки — олигоаденилатсинтетаза растений. При этом у устойчивых растений включение интерфероноподобного механизма, очевидно, происходит в более ранние сроки или его регулирующее действие более успешно противостоит вирусному заражению, чем у восприимчивых растений. Сделан предварительный вывод, что интерферон способен существенно ингибировать лишь нестабильные вирусы (вирусы с очень высокой скоростью распада вирусных частиц), тогда как его эффективность против стабильных вирусов в системно зараженных растениях является недостаточно высокой.

Таким образом, метод хемотерапии вирусов *in vitro* в настоящее время можно рассматривать как высокоэффективный способ оздоровления растений от вирусной инфекции, позволяющей в короткие сроки и с минимальными затратами получить большое число безвирусного посадочного материала.

15.3. Оптимизация условий клонального микроразмножения растений

Важнейшее условие успешного культивирования изолированных клеток и тканей — сбалансированность питательных сред по минеральным солям, углеводам, фитогормонам и т. д. При введении

в культуру нового вида растений исследователи нередко испытывают большое число сред. Этот процесс длителен и часто не приносит должного результата. Для определения оптимального состава питательной среды применяют методы математического планирования эксперимента, позволяющие быстро при небольшом объеме экспериментов определить условия культивирования, обеспечивающие высокую скорость размножения, изучить зависимость микро-размножения от совокупности факторов, действующих на процесс, а также установить наличие и оценить эффективность межфакторных взаимодействий. В зависимости от поставленной цели эксперименты проводят по полному или дробному плану первого или второго порядка.

Успех оптимизации зависит от того, насколько правильно выбран критерий оптимизации. На первом этапе микроразмножения критерием может служить количественная оценка любой морфогенетической реакции экспланта, ведущей в дальнейшем к формированию целого растительного организма, например: высота побега, число дифференцирующихся стеблевых апексов, побегов, эмбриоидов. На втором этапе учитываются общее число развившихся побегов, эмбриоидов, которое должно отражать эффективность размножения. Критерием оптимизации третьего этапа может служить процент укорененных растений, длина корневой системы, число корней на один микропобег. При этом также необходимо учитывать высоту и общее состояние растения и приживаемость его при пересадке в почву.

Математическое планирование необходимо начинать с выбора факторов, действующих на изучаемый процесс ($X_1, X_2, X_3, \dots$ и т. д.), их предельных значений (верхний и нижний уровни) и схемы эксперимента (матрицы).

Изучаемые факторы и их концентрации (интервалы варьирования) выбирают на основе предварительных данных об изучаемом процессе или на основе интуиции исследователя. Не следует брать слишком большие интервалы варьирования, так как в них может «спрятаться» сам оптимум. Лучше выбирать небольшие интервалы, но так, чтобы разница между учитываемым показателем для верхнего и нижнего уровней изучаемого фактора была заметной (с учетом возможных погрешностей измерения и вариабельности процесса).

После выбора изучаемых факторов подбирают матрицу эксперимента, которая характеризуется следующими свойствами:

- в каждой серии количество вариантов опытов с верхним уровнем каждого фактора равно количеству вариантов с нижним уровнем того же фактора;
- верхний уровень любого фактора сочетается одинаковое число раз и с верхними, и с нижними уровнями всех остальных факторов, он как бы проверяется на усредненном фоне, в котором влия-

ние уровней остальных факторов нивелируется. Это же положение справедливо и для нижних уровней.

Такие матрицы обязательно имеют число вариантов планирования, кратное четырем (4, 8, 12, 16, 20, 24, 32 и т. д.). Планы матриц разработаны для различного числа факторов и могут включать разное число вариантов планирования. Планы экспериментов имеются в различных справочниках и руководствах.

Ниже приведены примеры матриц планирования полного факторного эксперимента (ПФЭ), где X_1 , X_2 , X_3 , ... и т. д. — варианты изучаемых факторов (табл. 3.4—3.6).

Таблица 3.4

Матрица планирования для двух факторов на двух уровнях (ПФЭ 22//4)

Варианты опытов	Изучаемые факторы	
	X_1	X_2
1	–	–
2	+	–
3	–	+
4	+	+

Таблица 3.5

Матрица планирования для трех факторов на двух уровнях (ПФЭ 23//8)

Варианты опытов	Изучаемые факторы		
	X_1	X_2	X_3
1	–	–	–
2	+	–	–
3	–	+	–
4	+	+	–
5	–	–	+
6	+	–	+
7	–	+	+
8	+	+	+

Таблица 3.6

Матрица планирования для четырех факторов на двух уровнях (ПФЭ 24//16)

Варианты опытов	Изучаемые факторы			
	X_1	X_2	X_3	X_4
1	–	–	–	–

Варианты опытов	Изучаемые факторы			
	X_1	X_2	X_3	X_4
2	+	–	–	–
3	–	+	–	–
4	+	+	–	–
5	–	–	+	–
6	+	–	+	–
7	–	+	+	–
8	+	+	+	–
9	–	–	–	+
10	+	–	–	+
11	–	+	–	+
12	+	+	–	+
13	–	–	+	+
14	+	–	+	+
15	–	+	+	+
16	+	+	+	+

Примеры матриц планирования дробного факторного эксперимента (ДФЭ) показаны в табл. 3.7—3.9.

Таблица 3.7

Матрица планирования для пяти факторов на двух уровнях (ДФЭ 25//8)

Варианты опытов	Изучаемые факторы				
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
1	–	–	–	–	–
2	+	–	–	+	+
3	–	+		+	+
4	+	+		–	–
5	–	–	+	+	–
6	+	–	+	–	–
7	–	+	+	–	+
8	+	+	+	+	+

Таблица 3.8

Матрица планирования для шести факторов на двух уровнях (ДФЭ 26//8)

Варианты опытов	Изучаемые факторы					
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆
1	–	–	–	–	–	–
2	+	–	–	+	+	–
3	–	+	–	+	–	+
4	+	+	–	–	+	+
5	–	–	+	+	+	+
6	+	–	+	–	–	+
7	–	+	+	–	+	–
8	+	+	+	+	–	–

Таблица 3.9

Матрица планирования для восьми факторов на двух уровнях (ДФЭ 28//12)

Варианты опытов	Изучаемые факторы							
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
1	–	–	–	–	–	–	–	–
2	–	–	+	+	–	+	+	–
3	+	–	–	+	+	–	+	–
4	+	–	–	–	+	+	+	+
5	–	+	–	–	+	+	–	–
6	+	–	+	–	–	+	–	+
7	+	+	–	+	–	–	–	+
8	+	+	+	–	–	–	+	–
9	–	–	+	+	+	–	–	+
10	–	+	–	+	–	+	+	+
11	–	+	+	–	+	–	+	+
12	+	+	+	+	+	+	–	–

После того как была выбрана матрица эксперимента, отбирают экспланты, используемые в эксперименте. При этом необходимо учитывать неоднородность исходного растительного материала и гетерогенность культивируемых тканей, поэтому растительный материал необходимо равномерно распределять между разными вариантами эксперимента. Оптимальные условия культивирования должны обеспечить удовлетворительный рост всех эксплантов.

Обработку результатов многофакторных экспериментов проводят статистически и для получения уравнений регрессии рассчитывают следующие показатели: 1) коэффициент регрессии свободного члена; 2) коэффициенты регрессии изучаемых факторов; 3) коэффициенты регрессии межфакторных взаимодействий; 4) построчные дисперсии; 5) значение критерия Кохрена; 6) адекватность результатов. Подробное и обстоятельное изложение принципов постановки, проведения и обработки результатов многофакторных экспериментов можно найти в руководстве по математическому планированию¹.

Например, при оптимизации начальных условий культивирования гипокотилей шести генотипов томатов был поставлен опыт первого порядка по матрице полного факторного эксперимента $2^4/16$, где 2 — число уровней, на которых испытывались факторы; 4 — число изучаемых в эксперименте факторов (X_1 — инозит, X_2 — сахароза, X_3 — зеатин, X_4 — ИУК); 16 — число опытов по схеме эксперимента.

В результате статистической обработки были получены следующие уравнения регрессии:

- $Y = 3,756 + 1,619X_2 - 0,419X_1X_2 - 0,244X_2X_3X_4$ (по размеру каллуса);

- $Y_1 = 2,438 + 0,738X_2 - 0,662X_3 - 0,438X_4 + 0,433X_2X_3 + 0,462X_1X_2X_3 + 0,437X_1X_4 + 0,537X_1X_2X_4 - 0,312X_1X_2X_3X_4$ (по числу почек на один каллус).

Из уравнений видно, что все факторы, за исключением X_1 , оказывают прямое положительное или отрицательное действие на изучаемые процессы. Так, значение фактора X_2 в обоих уравнениях свидетельствуют о том, что добавление его в питательную среду стимулирует рост каллуса и образование адвентивных почек, а уменьшение концентрации зеатина и ИУК (X_3 и X_4 , соответственно) увеличивает выход адвентивных почек с одного каллуса. Таким образом, за один эксперимент были определены факторы, влияющие на образование каллуса и адвентивных почек, и определен оптимальный состав питательной среды для начального этапа клонального микроразмножения томатов через первичный каллус.

В последние годы многофакторные эксперименты широко используются для оптимизации условий культивирования каллусных тканей сахарной свеклы, бобов, раувольфии, женьшеня; процессов клонального микроразмножения герберы, фрезии, каперсов, полыни лимонной, сосны обыкновенной и некоторых других растений. Методы математического планирования являются эффективным и экономически выгодным способом оптимизации культивирования растительных тканей *in vitro* и микроразмножения растений.

¹ Максимов В. Н. Многофакторный эксперимент в биологии. М. : Изд-во Московского ун-та, 1980.

Контрольные вопросы и задания

1. Какие существуют методы оздоровления растений от вирусов?
2. Что такое термотерапия?
3. Что такое хемотерапия?
4. Почему меристематическая зона побега свободна от вирусов?
5. Какие вы знаете методы тестирования растений на вирусы?
6. Приведите примеры технологий получения безвирусного посадочного материала.
 7. Где возможно использовать безвирусный посадочный материал?
 8. В чем преимущества применения методов математического планирования эксперимента?
 9. Что такое многофакторный эксперимент?
 10. Сколько факторов можно оптимизировать за один эксперимент?

Ситуационные задачи

1. Рассчитайте, какое количество микрорастений хризантемы можно получить к концу шестого пассажа, если известно, что средний коэффициент размножения составляет 6,5.

2. Рассчитайте, какое количество микрорастений картофеля можно получить к концу восьмого пассажа, если известно, что коэффициент размножения на втором и третьем пассажах составляет 4,7, на четвертом — шестом пассажах — 7,1 и на седьмом и восьмом — 6,0.

3. Рассчитайте средний коэффициент размножения стевии *in vitro* на протяжении пяти пассажей, если известно, что первоначально в культуру *in vitro* было введено 23 микрочеренка, содержащих две пазушные почки, а к концу пятого пассажа было получено 9375 шт. микрорастений стевии.

4. Рассчитайте средний коэффициент размножения розы *in vitro* на протяжении семи пассажей, если известно, что к концу третьего пассажа было получено 500 шт. растений, к концу шестого пассажа — 6500 шт. растений, а к концу седьмого пассажа — 7700 шт. растений. Первоначально в культуру *in vitro* было введено 25 микрочеренков, каждый из которых содержал одну пазушную почку.

5. По каким биометрическим и морфометрическим показателям можно оценить эффективность применения исследуемых питательных сред?

6. Оцените эффективность применения культуры изолированных меристем, методов термотерапии и хемотерапии для получения безвирусного посадочного материала *in vitro*.

7. Для увеличения коэффициента размножения растений в культуре *in vitro* применяют регуляторы роста — цитокинины. Можно ли, изменяя спектральный состав света, получить высокий коэффициент размножения, исключив цитокинины из состава питательной среды?

8. Для увеличения укореняемости микропобегов в культуре *in vitro* применяют регуляторы роста — ауксины. Можно ли, изменяя спектральный состав света, получить высокий процент укоренившихся микропобегов, исключив ауксины из состава питательной среды?

9. Что вы знаете о применении когерентной лазерной оптики для повышения эффективности размножения растений в культуре *in vitro*?

10. Для эффективного размножения сирени *in vitro* определите наиболее оптимальные сроки введения изолированных эксплантов в культуру *in vitro*, тип первичного экспланта и состав питательной среды на первом пассаже.

11. Для эффективного размножения лилии *in vitro* определите наиболее оптимальные сроки введения изолированных эксплантов в культуру *in vitro*, тип первичного экспланта и состав питательной среды на первом пассаже.

12. Для эффективного размножения картофеля *in vitro* определите наиболее оптимальные сроки введения изолированных эксплантов в культуру *in vitro*, тип первичного экспланта и состав питательной среды на первом пассаже.

13. Индуцирование соматического эмбриогенеза предусматривает получение моно- или биполярных структур?

14. Что необходимо сделать, что бы получить искусственные семена? Расскажите о технологии получения искусственных семян моркови.

15. Рассчитайте эффективность применения антитранспирантов при адаптации растений к условиям *in vivo*, если известно, что в почву было высажено 10 369 шт. растений-регенерантов, а через месяц осталось 8677 шт.

16. Рассчитайте площадь теплицы, необходимую для адаптации 11 367 шт. растений-регенерантов земляники, если для одного растения требуется площадь 5×5 см.

Лабораторный практикум

Работа 1. Изолирование и культивирование апикальных меристем картофеля

Объяснение. Культура изолированных апикальных меристем используется для получения свободного от вирусов посадочного материала и для микроклонального размножения растений. Метод основан на том, что по мере продвижения к верхушке больного растения наблюдается снижение количества вирусов. Апикальная меристема обычно совершенно свободна от вирусов, она представляет собой конус активно делящихся клеток высотой 0,1 мм (100 мкм) и шириной 0,25 мм. Поскольку меристеме бывает трудно изолировать без повреждения, часто ее отделяют с одним-двумя листовыми зачатками (апексы размером 100—250 мкм). Для повышения эффективности оздоровления картофеля метод верхушечной меристемы сочетают с термо- и хемотерапией. Тепловая обработка вызывает инактивацию вирусов, химические вещества ингибируют их развитие. Безвирусные растения могут быть размножены *in vitro* и высажены в теплицы *in vivo* для получения безвирусных клубней. Для ускоренного размножения оздоровленного материала используются также клубни, образовавшиеся на безвирусных растениях *in vitro*.

Материалы и оборудование: клубни картофеля; бинокулярная лупа, скальпели, препаровальные иглы, пробирки со стерильной питательной средой.

Ход работы. Клубни картофеля хранят при температуре 4—6 °С, затем проращивают в темноте при 20—22 °С. Работы по изолированию меристем проводят в простерилизованном с помощью бактерицидных ламп ламинар-боксе. Рабочее место (стол, бинокулярная лупа) и штативы с пробирками протирают спиртом. Инструменты (пинцеты, скальпели, иглы) стерилизуют перед каждой манипуляцией, погружая их в спирт и обжигая на спиртовке.

Ростки опускают в химический стакан и заливают 0,1%-ным раствором диацита на 3—5 мин (либо 1—6%-ным раствором гипохлорита кальция или натрия, либо 0,1%-ным раствором сулемы). Затем не менее трех раз промывают их стерильной водой, помещают в стерильную чашку Петри и добавляют несколько капель стерильной воды для предупреждения подсыхания. Перед изолированием меристем с помощью препаровальной иглы под бинокулярной лупой с верхушки ростка удаляют покровные листочки, последо-

вательно обнажая боковые и верхушечные меристемы с примордиальными листочками. Меристему, включающую кусочек ткани размером 100—250 мкм без листовых зачатков (примордиев), изолируют обычной тонкой иглой, зажатой в цанговый держатель. Изолировать можно как верхушечную, так и боковые меристемы. Каждую операцию проводят отдельным простерилизованным инструментом. Меристему на острие иглы переносят на поверхность питательной среды в пробирку, которую закрывают пробкой над пламенем горелки и ставят в штатив. Штатив с пробирками закрывают целлофаном для предупреждения подсыхания среды и ставят в световую камеру.

В качестве питательной среды используют модифицированную среду МС, заранее приготовленную и простерилизованную в автоклаве при давлении 1 атм в течение 20 мин.

Через 2, 3, 4 недели проводят наблюдения за развитием из меристем побега и зарисовывают этапы этого процесса.

Работа 2. Клональное микроразмножение картофеля путем черенкования побегов

Объяснение. Одним из наиболее распространенных способов размножения картофеля является черенкование в пробирочной культуре. Для этого растения делят на сегменты — черенки, которые пересаживают в пробирки с питательной средой МС. Размножение методом черенкования предусматривает, прежде всего, удаление верхушечной почки, чтобы исключить апикальное доминирование и стимулировать рост пазушных меристем.

Черенкование проводят с интервалом 24—28 дней. Из одного растения получают 5—8 черенков, за 2—3 месяца это составит 3—5 тыс. растений, а за 7 месяцев — 30—40 тыс. Укоренение наблюдается спонтанно.

Пересадка растений-регенерантов в почвенные условия является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений — весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом, корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат легкого механического состава. При необходимости растения подкармливают растворами Кнопа, Кнудсона и др.

Материалы и оборудование: пробирочные растения картофеля; пробирки с модифицированной стерильной питательной средой МС; стерильные скальпели, пинцеты, чашки Петри; спирт, спиртовка, спички, вата.

Ход работы. Пробирочное растение картофеля вынимают в ламинар-боксе из пробирки, помещают в чашку Петри, разрезают

на сегменты (отрезок стебля с листом и пазушной почкой). Часть стебля над листом при этом должна быть в 2—3 раза меньше, чем часть ниже листа. Необходимо соблюдать строгую стерильность. Черенки помещают на модифицированную питательную среду МС в пробирки. Для предотвращения попадания микроорганизмов горлышко пробирки обжигают в пламени спиртовки. Пробирку с черенком зарисовывают и ставят в световую камеру. Проводят наблюдение за развитием побега через 7 и 14 суток и зарисовывают последовательные этапы развития растения из черенка.

Работа 3. Клональное микроразмножение хризантем

Объяснение. Основной метод, используемый при клональном микроразмножении растений, — активация развития уже существующих в растении меристем, основывающийся на снятии апикального доминирования. Это может быть достигнуто двумя путями: а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде; б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин), а также 2iP и зеатин. Полученные таким образом побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков. В настоящее время этот метод широко используется в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур — как технических (сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стахис), так и овощных (томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.), а также для размножения культур промышленного цветоводства (гвоздика, хризантема, роза, гербера), тропических и субтропических растений (рододендрон, азалия, камелия, чай и др.), плодовых и ягодных культур (яблоня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, крыжовник и др.) и древесных растений (тополь, ива, ольха, береза, рябина, секвойя, туя, можжевельник и др.). Для некоторых сельскохозяйственных культур, таких как картофель, технология клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. Применение метода активации развития существующих в растении меристем позволяет получать из одной меристемы картофеля более 10^5 растений в год, причем технология предусматривает получение в пробирках микроклубней — ценного, безвирусного семенного материала.

Материалы и оборудование: растения хризантем, стерильная питательная среда МС, 0,1%-ный раствор сулемы, стерильная дистиллированная вода, стерильный стакан (2 шт.), стерильные ин-

струменты (скальпель и пинцет), стерильные чашки Петри, спирт, спиртовка, спички.

Ход работы. Нарезают черенки с растения-донора, помещают в марлевый мешочек и стерилизуют в течение 5—8 мин в 0,1%-ном растворе сулемы, после чего промывают в трех порциях стерильной дистиллированной воды. Затем черенки вынимают из марлевого мешочка, раскладывают на стерильную бумагу или чашку Петри и подрезают базальную часть побега. Сохраняя ориентацию побега, его помещают вертикально на агаризованную питательную среду МС в пробирки. После обжигания горлышка пробирок их закрывают ватными пробками или стерильной прозрачной пленкой.

Через 4—5 недель культивирования наблюдается образование пазушных побегов, каждые из которых отделяют от материнского экспланта и после микрочеренкования самостоятельно культивируют на свежеприготовленной питательной среде МС. Микрочеренки состоят из сегмента стебля с одной или двумя пазушными почками. Процесс микрочеренкования не имеет ограничений во времени.

Для укоренения сформировавшихся микропобегов применяю ИУК или ИМК в концентрации 2 мг/л.

Работа 4. Клональное микроразмножение лилий

Объяснение. Для размножения лилий применяют метод клонального микроразмножения. В качестве первичного экспланта используют чешуйки луковиц, которые культивируют на питательных средах, содержащих цитокинины. В результате культивирования в базальной части чешуйки образуются адвентивные луковички, которые в дальнейшем при отделении от первичного экспланта формируют полноценные растения. При использовании такого метода размножения можно получать до 2000 растений с одной луковицы в течение 3 месяцев выращивания.

Материалы и оборудование: луковицы лилий, стерильная питательная среда МС, 0,1%-ный раствор сулемы, стерильная дистиллированная вода, стерильный стакан (2 шт.), стерильные инструменты (скальпель и пинцет), стерильные чашки Петри или бумага, спирт, спиртовка, спички.

Ход работы. Чешуйки отделяют от луковицы у самого донца и промывают в растворе детергента в течение 15 мин, после чего ополаскивают проточной водой. Затем чешуйки стерилизуют 0,1%-ным раствором сулемы в течение 10 мин и трижды промывают стерильной дистиллированной водой, подрезают места облома чешуек на расстоянии 1—1,5 мм от края, а также тонкие клеточные слои по бокам чешуек. После этого чешуйки делят на кусочки размером 0,5×0,5 см², которые помещают на агаризованную питательную среду в пробирки.

Культивирование растительного материала осуществляют в пробирках размером 20×200 мм, содержащих 10 мл питательной среды, а также в стеклянных банках объемом 100—200 мл с питательной средой 20—50 мл. Выращивают экспланты в световой комнате, где поддерживается 70%-ная влажность воздуха, температура 25 °С, 24-часовое освещение белыми люминесцентными лампами с интенсивностью света 3—10 тыс. лк.

Через 4—5 недель, с момента начала культивирования, наблюдается образование меристематических очагов в виде микролуковиц, которые отделяют от материнского экспланта и самостоятельно культивируют на питательной среде МС. Индукцию корнеобразования осуществляют на питательной среде МС, содержащей НУК или ИУК в концентрации 0,2—0,4 мг/л.

Раздел IV

ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

В результате изучения учебного материала данного раздела обучающиеся должны:

знать

- метод оплодотворения *in vitro*;
- метод культуры изолированных зародышей;
- методы создания гаплоидных растений *in vitro*;
- теоретические основы создания криобанка растительных клеток;
- способы клонирования нового селекционного материала;

уметь

- на практике применять методы клеточной инженерии для преодоления прогамной и постгамной несовместимости растений;
- подбирать условия для культивирования изолированных репродуктивных клеток и тканей растений в условиях *in vitro*;
- клонировать новый селекционный материал;

владеть

- технологиями искусственного оплодотворения *in vitro*;
 - технологией андрогенеза, гиногенеза и партеногенеза *in vitro* с целью создания гаплоидных растений.
-

Глава 16

ПРЕОДОЛЕНИЕ ПРОГАМНОЙ И ПОСТГАМНОЙ НЕСОВМЕСТИМОСТИ РАСТЕНИЙ

Одно из направлений клеточных технологий — использование их в селекции, которое облегчает и ускоряет традиционный селекционный процесс в создании новых форм и сортов растений. Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей *in vitro* условно можно разделить на две группы.

Первая группа — это вспомогательные технологии, которые не подменяют обычную селекцию, а служат ей. К ним можно отнести: оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости); культивирование семян и незрелых гибридных зародышей (преодоление постгамной несовместимости); получение гаплоидов путем культивирования пыльников и микроспор; криосохранение изолированных клеток, тканей и органов; клональное микроразмножение отдаленных гибридов.

Вторая группа методов ведет к самостоятельному, независимому от традиционных методов селекции, получению новых форм и сортов растений: клеточная селекция с использованием каллусной ткани; соматическая гибридизация (слияние изолированных протопластов и получение неполовых гибридов); применение методов генной инженерии.

В отдаленной гибридизации находят применение такие методы культуры изолированных тканей, как оплодотворение *in vitro*, эмбриокультура (выращивание изолированных зародышей на искусственных питательных средах), клональное микроразмножение ценных гибридов, а также получение гаплоидов *in vitro* и криосохранение.

16.1. Оплодотворение в культуре *in vitro*

Данный метод применяется для преодоления прогамной несовместимости растений и проводится в том случае, когда невозможно осуществить оплодотворение между выбранными парами в естественных условиях. Это вызвано несколькими причинами: 1) физиологическими (несоответствие во времени созревания

пыльцы и т. д.); 2) морфологическими (короткая пыльцевая трубка или блокирование ее роста на разных этапах развития и т. д.). Оплодотворение *in vitro* можно осуществить двумя способами: а) культивирование на искусственной агаризованной питательной среде завязи с нанесенной на нее готовой пылью; б) завязь вскрывается и на питательную среду переносятся кусочки плаценты с семязачатками, вблизи которых или непосредственно на ткани плаценты культивируется готовая пыльца. Визуально определить, произошло оплодотворение *in vitro* или нет, можно по быстро увеличивающимся в размерах семязачаткам. Сформировавшийся зародыш, как правило, не переходит в состояние покоя, а сразу прорастает и дает начало гибридному поколению.

Существуют различные модификации метода опыления и оплодотворения *in vitro*: прививка столбика с рыльцем совместимого гинецея в завязь несовместимого гинецея; нанесение пыльцы на свежесрезанную поверхность столбика; удаление с рыльца его собственного экссудата и нанесение на него экссудата с рыльца донорного растения; применение различных химических веществ, например колхицина, и т. д. Метод опыления пестиков может быть использован также для преодоления барьеров предоплодотворения, особенно при преждевременном опадании завязей.

Метод оплодотворения *in vitro* был успешно применен для преодоления самонесовместимости у петунии (*Petunia*), а также у растений родов *Papaveraceae*, *Caryophyllaceae*, *Solanaceae*. Удалось провести опыление ячменя пылью ржи и пшеницы. При оплодотворении *in vitro* получены межвидовые гибриды табака, а также между табаком и махоркой. Оплодотворение *in vitro* было использовано при проведении генетических исследований на кукурузе. Этот метод был применен отечественными исследователями для получения жизнеспособных гибридных семян табака, а также овощных культур, в частности при межвидовой и межродовой гибридизации томата *Lycopersicon esculentum* с *L. minutum*, *L. hirsutum* и *Solanum pennellii*. Гибриды томатов, полученные из таких семян, проявляли нормальные признаки фенотипа и фертильность.

16.2. Культура изолированных зародышей

Данный метод применяется для преодоления постгамной несовместимости растений. Постгамная несовместимость при отдаленной гибридизации возникает после оплодотворения. Часто при этом образуются щуплые невсхожие семена. Причиной может быть расхождение во времени развития зародыша и эндосперма. Из-за слабого развития эндосперма зародыш бывает неспособен к нормальному прорастанию. В таких случаях из зрелой щуплой зерновки изолируют зародыш и выращивают его в питательной среде.

Первые работы по культуре изолированных зародышей были опубликованы более 100 лет назад Р. Ханнингом (1904), который по праву считается основателем данного метода. Целью этого исследования, проведенного на зародышах семейства Крестоцветные, было определение условий для выращивания зародышей вне семени. Работы Ханнинга стимулировали появление аналогичных исследований, выполненных на разных объектах другими авторами.

Начало применению метода культуры изолированных зародышей в прикладном плане было положено в 1924—1925 гг. Ранние исследования по культуре незрелых зародышей были направлены на поиск оптимальных условий выращивания, которые в какой-то мере приближались бы к нативным. В результате этих исследований была усовершенствована методика и техника выращивания незрелых зародышей на ранних этапах формирования, определены оптимальный состав проточной питательной среды и другие физико-химические условия выращивания. В последующих исследованиях изучалось действие жидких и твердых питательных сред на рост изолированных зародышей, уточнялся состав и концентрация различных макро- и микроэлементов, условия углеродного питания, а в дальнейшем значительное внимание исследователи уделяли изучению роли различных биологически активных веществ, фитогормонов, витаминов, аминокислот, растительных экстрактов на дифференциацию изолированных зародышей.

Выращивание зародышей в искусственной питательной среде называется *эмбриокультурой*. Среда для выращивания зрелого зародыша может быть простой, без добавок физиологически активных веществ (например, среда Уайта) или любая другая, содержащая минеральные соли и сахарозу. При более отдаленных скрещиваниях нарушения в развитии зародыша могут наблюдаться уже на ранних этапах, что выражается в отсутствии дифференцировки, замедленном росте. В этом случае культура зародыша состоит из двух этапов — эмбрионального роста зародыша, во время которого продолжается его дифференцировка, и прорастания подросшего зародыша. Для первого этапа требуется более сложная по составу среда с повышенным содержанием сахарозы, с добавками различных аминокислот, витаминов и гормонов.

Применение эмбриокультуры в селекции приобретает в последнее время большое значение для получения отдаленных гибридов различных сельскохозяйственных культур. Показана возможность увеличения выхода пшенично-ржаных гибридов путем дорастивания незрелых зародышей, а также использования эмбриокультуры для преодоления постгамной несовместимости при гибридизации пшеницы с колосняком. Получены полноценные растения из недоразвитых щуплых семян, которые характерны для гибридов у риса, триплоидные растения ржи при скрещивании автотетраплоидных

и диплоидных растений ржи. С использованием метода культуры зиготических зародышей были получены селекционно ценные формы черешни, персика и груши.

Метод эмбриокультуры находит все более широкое применение в межвидовой гибридизации овощных растений. Для лука разработаны приемы выращивания *in vitro* abortивных зародышей от гибридных семян с разных этапов эмбриогенеза, выращивание зародышей от частично фертильных межвидовых гибридов. Культура изолированных зародышей используется в селекции томатов и других овощных растений (рис. 4.1).

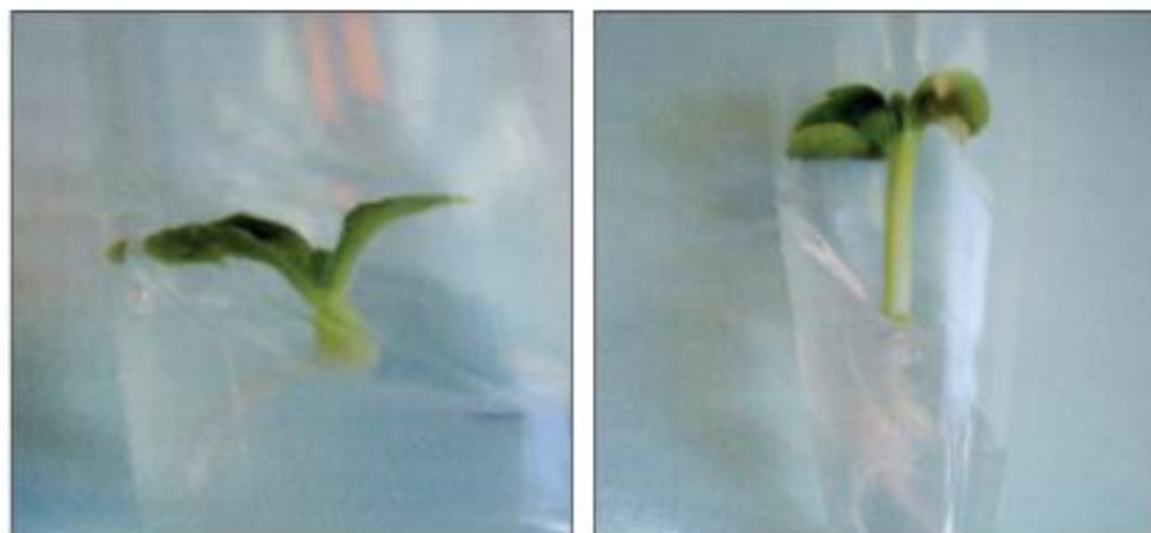


Рис. 4.1. Получение растений-регенерантов тыквы при использовании эмбриокультуры (ВНИИ овощеводства, 2006)

Исследована гормональная регуляция роста и развития зародышей томата *in vitro*. Обсуждается возможность применения эмбриокультуры для получения отдаленных гибридов подсолнечника, изучаются факторы, контролирующие рост и развитие *in vitro* зародышей подсолнечника, изолированных в разные сроки после опыления.

Культура изолированных зародышей как вспомогательный метод при отдаленной гибридизации применяется не только для преодоления постгамной несовместимости, но также с целью микроразмножения ценных гибридов. В этом случае микроразмножение происходит путем каллусогенеза, индукции морфогенеза и получения растений-регенерантов из каллусной ткани (рис. 4.2). Техника культивирования незрелых зародышей позволяет размножать ценные генотипы растений на ранних стадиях жизненного цикла. Еще одна возможность применения культуры зародышей — использование ее в клеточной селекции.

Клональное микроразмножение отдаленных гибридов. Эмбриокультура дает возможность вырастить гибридные растения из неполноценных зародышей. Однако выход гибридных растений

мал, и гибриды часто бывают стерильны. Иногда, например при селекции гречихи, трудно воспроизвести в потомстве уникальные генотипы из-за перекрестного опыления культуры. Поэтому перед исследователями часто встает задача — размножить и сохранить полученные растения. В этом помогает метод клонального микро-размножения. Размножают гибриды путем активации развития меристемы пазушных почек (черенкованием стерильных побегов), адвентивными почками или регенерацией растений из каллусной ткани, в частности полученной при культивировании зародышей.



Рис. 4.2. Реализация морфогенетического потенциала в культуре изолированных зародышей хвойных культур

Контрольные вопросы и задания

1. Назовите вспомогательные методы клеточной инженерии растений.
2. В чем различие этих методов между собой?
3. Какие методы позволяют преодолеть прогамную и постгамную несовместимость растений?
4. Какие существуют способы культивирования изолированных зародышей *in vitro*?
5. Каким бы вы воспользовались методом, чтобы сохранить и быстро размножить ценный гибрид?

Глава 17

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ РАСТЕНИЙ

Криосохранение соматических клеток растений в жидком азоте (температура -196°C) — новое направление в биотехнологии, которое широко стало развиваться с начала 1970-х гг. Цель данной технологии заключается в сохранении в культуре *in vitro* генофонда, а также в обеспечении селекционеров в любое время генотипом, имеющим искомые признаки: необходимая пыльца для проведения гибридизации; уникальные и единичные семена, в том числе не выносящие обезвоживания; трансформированные, мутантные, гибридные клетки разных видов растений, способных к морфогенезу *in vitro*; зиготические и соматические зародыши и т. д. В настоящее время разработаны условия криосохранения для культивируемых клеток более 30 видов, каллусных культур (около 10 видов), изолированных протопластов (8 видов), сохранения меристем (25 видов) и кончиков стебля (13 видов). Приоритет в этом направлении принадлежит Институту физиологии растений РАН, в частности отделу биологии клетки и биотехнологии, возглавляемому в настоящее время профессором А. М. Носовым (рис. 4.3).

При проведении работ по криосохранению необходимо, прежде всего, учитывать специфику растительных клеток; отбирать мелкие клетки, с маленькой вакуолью и пониженным содержанием воды; разрабатывать в каждом отдельном случае подходы замораживания и последующего оттаивания растительных клеток. При криосохранении встречается ряд трудностей, одна из которых связана с защитой замораживаемых клеток и тканей от осмотического стресса и механического разрушения структур в результате образования и роста кристаллов льда внутри клетки. Одновременно с этим необходимо правильно подбирать условия, обеспечивающие высокую выживаемость клеток при оттаивании и рекультивации. Несмотря на многообразие работ в этом направлении, в них все же наметились общие приемы, лежащие в основе криосохранения: обработка клеток перед замораживанием, применение криопротекторов, соблюдение определенного режима замораживания в интервале от 0 до -40°C (в редких случаях до -70°C), а также специальные предосторожности при оттаивании объектов.

Процесс криоконсервации, как правило, начинается с подготовки культуры клеток к замораживанию. Это может быть достигнуто

несколькими способами, предусматривающими культивирование клеток на питательных средах, содержащих различные осмотически активные вещества: маннит или сорбит в концентрации 2—6 %, аминокислоты и среди них, в первую очередь, пролин, чье значение для связывания воды в клетках растений широко известно, а также γ -аминомасляная кислота.

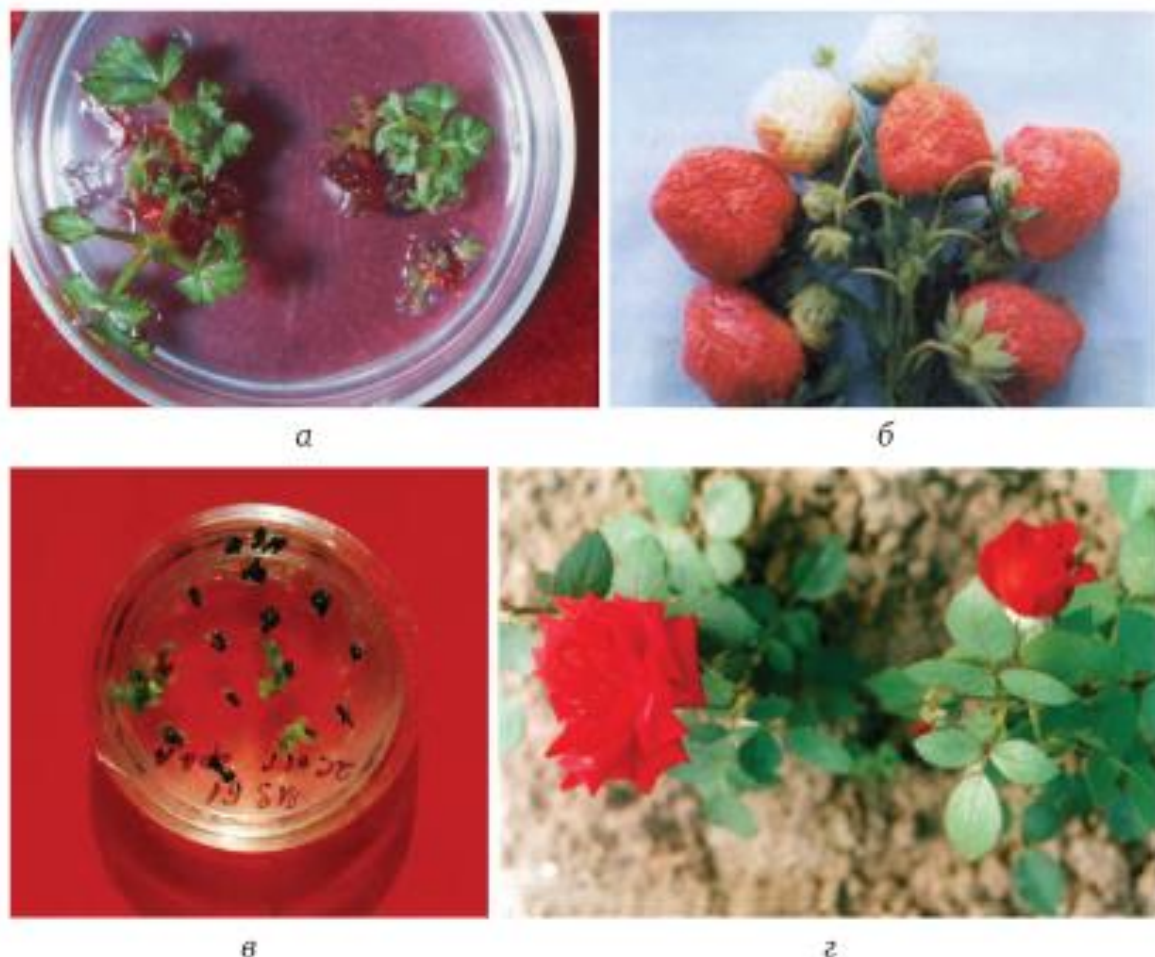


Рис. 4.3. Криосохранение (-196°C) ценных сортов декоративных и сельскохозяйственных растений:
а, б — земляника; в, г — роза

Подбор криопротекторов, веществ, уменьшающих повреждение клеток от осмотического и механического стресса, проводят эмпирически по принципу наименьшей токсичности и оптимального эффекта. 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.

Большое значение при криосохранении имеет правильно подобранный режим замораживания от 0 до -40°C . Как правило, для всех объектов устанавливается скорость замораживания $0,5$ — 1°C в минуту и всю эту работу проводят на специальном оборудовании, обеспечивающем программное замораживание (рис. 4.4).



Рис. 4.4. Программный замораживатель

Таким образом, медленное замораживание и использование криопротекторов позволяет освободить клетку от свободной воды, при -40°C клетки становятся полностью обезвоженными, что дает возможность проводить дальнейшее замораживание, а именно погружать ампулы с растительным материалом в жидкий азот. Хранение осуществляют в металлических сосудах Дьюара (рис. 4.5).



Рис. 4.5. Металлические сосуды Дьюара с жидким азотом, где хранится растительный материал

Хранение материала в жидком азоте практически не лимитировано. Например, в криобанке Института физиологии растений РАН хранятся клетки моркови, которые находятся в жидком азоте около 20 лет, меристемы картофеля — более 10 лет и др.

Оттаивание и проверка жизнеспособности клеток после хранения в жидком азоте является последним этапом технологии криосохранения. Если замораживание осуществляют медленно, постепенно, то оттаивание должно быть проведено как можно быстрее. Для этого ампулы помещают в водяную баню с температурой 40 °С, а иногда и 60 °С, и выдерживают до полного исчезновения последнего кристаллика льда.

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

Экспериментально показано, что клетки после хранения в жидком азоте не теряют способности к делению, регенерации растений, не уменьшается продуктивность синтеза вторичных метаболитов (клетки продуценты) и т. д. Так, Институтом физиологии растений РАН совместно с НПО по картофелеводству разработаны методы криосохранения меристем четырех сортов картофеля и показана возможность из 20 % хранящихся меристем регенерировать целые растения, которые при высадке в поле не отличались по всем признакам, включая темпы роста и продуктивность, от обычных пробирочных растений. Более подробно о технике криосохранения можно узнать из обзорных работ А. С. Попова.

Таким образом, технология, связанная с криосохранением растительных объектов, развивается и постоянно совершенствуется. Несомненно, эта технология имеет свое будущее, так как уже сегодня криобанки 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

1. Что такое криосохранение?
2. В чем различие подготовки меристематических и каллусных клеток к дальнейшему хранению их в жидком азоте?
3. Что такое криопротекторы?
4. Как вы думаете, можно ли хранить в жидком азоте органы животных?

Глава 18

ПОЛУЧЕНИЕ ГАПЛОИДНЫХ РАСТЕНИЙ *IN VITRO* И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИХ В СЕЛЕКЦИИ

Одним из важных направлений современной селекции является создание новых генотипов сельскохозяйственных растений, характеризующиеся повышенной продуктивностью и качеством урожая. Для этого растения должны обладать единичной, групповой или комплексной устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессовым факторам окружающей среды. Создание таких растений традиционными методами (классическая селекция) требует длительного времени, огромных масштабов работы и больших затрат. Например, для получения одного районированного сорта озимой пшеницы, селекционерам пришлось проработать сотни гибридных комбинаций и изучить десятки тысяч селекционных номеров, на что потребовалось 10 лет работы¹. Поэтому большой теоретический и практический интерес для селекции представляет, в частности, вовлечение в селекционный процесс новых методов клеточной и генной инженерии растений, а также различных молекулярно-генетических, биохимических, физиологических и других методов. Применение биотехнологических методов в селекционном процессе может осуществляться на разных этапах селекции, начиная от оплодотворения растений *in vitro*, получения гибридных зародышей и заканчивая созданием новых форм растений (клеточная селекция и соматическая гибридизация), обладающих определенной устойчивостью и продуктивностью.

18.1. Значение гаплоидии в селекции растений

Обычно для стабилизации линейных форм растений используют традиционные методы: отдаленную гибридизацию, обработку фитогормонами, создание стрессовых условий и др. Однако данные приемы являются трудоемкими, требуют много времени и недостаточно эффективны вследствие низкой частоты выхода гаплоидных растений.

¹ Сандухадзе Б. И., Рыбакова М. И., Морозова З. А. Научные основы селекции озимой пшеницы в Нечерноземной зоне России. М. : МГИУ, 2003.

Одним из перспективных методов ускорения селекционного процесса является метод, направленный на получение гаплоидных растений *in vitro*, позволяющий быстро создавать генетически стабильные гомозиготные линии. Главное преимущество гаплоидии заключается в получении за одну-две генерации стабильной гомозиготной линии, которую можно сразу оценить на перспективность для селекционной практики. При создании нового селекционного материала сначала получают межсортовые гибриды, а затем при культивировании пыльников таких гибридов — гаплоиды с перекombинированным геномом обоих родителей. Восстановление диплоидного числа хромосом приводит к получению гомозиготных растений, а затем и линий от каждого отдельного растения. Среди этих линий проводят отбор по интересующим признакам. Кроме того, гаплоиды значительно расширяют генетическое разнообразие исходного селекционного материала: во-первых, за счет рекомбинаций при мейотическом делении в процессе гаметогенеза; во-вторых, за счет мутаций, возникающих в процессе культивирования клеток *in vitro*. С помощью гаплоидов могут быть легко обнаружены рецессивные мутации, отселектированы клеточные линии, устойчивые к патогенам, высоким и низким температурам, засолению и другим стрессовым факторам.

По данным ряда исследователей, использование гаплоидов позволяет сократить селекционный процесс на четыре поколения. У видов-перекрестников, не способных завязывать семена при самоопылении, получение гаплоидов через культуру пыльников является единственной возможностью создания гомозиготных линий для гетерозисной селекции. Перспективным оказалось и использование гаплоидов в селекции озимых растений, у которых из-за необходимости яровизировать проростки удлинен вегетационный период. Несмотря на встречающуюся гаметоклональную изменчивость среди растений, регенерированных из микроспор, в случае отбора гаплоидов и создания на их основе гомозиготных линий наблюдается гомогенность и стабильность признаков у таких линий в ряду поколений.

Ускорение селекционного процесса — далеко не главное преимущество, которое обеспечивает использование гаплоидных растений. Не менее важным является то, что у гаплоидных растений проявляются эффекты всех генов, как доминантных, так и рецессивных. Полностью отсутствуют взаимодействия генов по типу доминирования и сверхдоминирования. Поэтому имеется возможность выбраковывать вредные для селекции, летальные и полуметальные рецессивные гены. Очищение популяции от вредных рецессивных генов повышает ее жизнеспособность и продуктивность, а также увеличивает комбинационную способность.

Гаплоиды можно применять: для стабилизации числа хромосом межвидовых гибридов в случае высокой степени негомологичности хромосом; получения межвидовых гибридов, устойчивых к неблагоприятным факторам среды, с использованием диких видов, получения линий-восстановителей ЦМС. Создание гомозиготных дигаплоидных линий у самонесовместимых гибридов, таких как рожь и рапс, позволяет вести селекцию на гетерозис. Этот метод представляет идеальную систему для проведения работ по мутагенезу при условии, что системы регенерации растений хорошо разработаны для исследуемых генотипов. Это связано с тем, что мутации у высших растений определяются с трудом, так как они являются рецессивными и не выявляются при наличии доминантных аллелей в гомологичных парах хромосом. У гаплоидов рецессивные гены проявляются сразу, что позволяет отобрать генотипы с соответствующими полезными признаками и перевести их на диплоидный уровень.

Экспериментальное получение удвоенных гаплоидов (дигаплоидов) является одним из широко используемых методов для решения многих фундаментальных проблем физиологии, генетики, молекулярной биологии и биохимии растений. Данный метод обеспечивает возможность значительного ускорения селекционного процесса для всех возделываемых культур. Путем удвоения числа хромосом у гаплоидов можно сразу создать гомозиготные линии, на выделение которых при селекции на гетерозис у перекрестноопыляющихся культур приходится затрачивать до 7—10 лет (однолетние растения) и (или) 14—20 лет (двулетние растения). Например, в России были получены за 4 года вместо обычных 10—12 лет сорта ячменя Исток и Одесский 115 путем сочетания партеногенеза с методом культуры изолированных зародышей.

Гомозиготные диплоидные линии широко используются в селекционно-генетических программах многих институтов и селекционных центрах мира, включая Россию и другие страны СНГ, по улучшению таких хозяйственно-важных культур, как пшеница, рис, ячмень, картофель, капуста, табак и др. Так, в настоящее время гаплоидные технологии широко применяются для создания новых сортов риса, пшеницы, ячменя, рапса, картофеля, льна и других культур. Например, в Японии получен сорт табака, сочетающий устойчивость растений к вилту с высоким качеством сырья. Выведены новые высокопродуктивные сорта риса, пшеницы, табака, устойчивые к мучнистой росе и желтой ржавчине. Большая работа проведена китайскими исследователями в этом направлении. С использованием метода культуры пыльников получено 20 сортов пшеницы, 100 сортов и перспективных форм риса. При этом многие из них показали значительное увеличение урожайности (до 27 %) по сравнению с сортами, полученными методами традиционной

селекции. Так получены перспективные формы кукурузы Ноа F₁, созданные на основе высокоимбредных линий; высокоурожайные сорта перца, устойчивые к болезням, плоды которых обладали хорошими вкусовыми качествами. В этой стране на площади в несколько миллионов гектар высевают сорта риса, полученные с помощью гаплоидных технологий.

Внедрение гаплоидных технологий в сочетании с методами классической селекции позволило отобрать формы, сорта и гибридные особи с ценными хозяйственными признаками. Первый сорт пшеницы Florin, превысивший стандарт по урожайности и обладающий устойчивостью к полеганию и болезням, был выведен во Франции, а китайские сорта Jinhua № 1, 2, отличаются высокой продуктивностью. Для создания сортов пшеницы дигаплоидные линии успешно применяются также во Франции, США, Индии, Италии, Японии, Англии, Венгрии и Канаде.

В России данный метод также применяется в ряде научно-исследовательских учреждений, в которых разрабатывают методы получения гаплоидов из изолированных пыльников с целью ускорения селекционного процесса при создании новых форм и сортов сельскохозяйственных культур. Этот метод стал основным источником получения гаплоидных растений для декоративных, овощных, зерновых и кормовых культур. Например, выведены линии табака, устойчивые к черной корневой гнили, мучнистой росе, полиспорозу. Селекционерам переданы гомозиготные линии, на основе чего создан новый сорт риса Жемчуг¹. В НПО «Подмосковье» получено 3100 гаплоидных линий растений от 50 межсортовых гибридов ячменя. На основе гаплоидов с помощью колхицина для этой культуры создано 1068 гомозиготных диплоидных линий. Лучшие из них характеризовались комплексной устойчивостью к болезням и имели потенциал урожайности 80—85 ц/га.

В НИИСХ Юго-Востока получен в результате гаплоидных технологий высокоурожайный сорт пшеницы Саратовская-64, который допущен к использованию с 2000 г. в восьми регионах РФ. Культуру изолированных пыльников успешно используют и для ускоренного получения гомозиготных форм в различных типах скрещиваний. С использованием ДН-метода (метод получения дигаплоидных линий в культуре репродуктивных органов) в селекции тритикале получены формы с хозяйственно-ценными признаками.

Возможности использования гаплоидных технологий для создания, засухоустойчивых форм пшеницы и ячменя довольно детально

¹ Харченко П. Н. Цитологические, анатомо-морфологические и физиолого-биохимические признаки регенерантов, каллусов и протопластов риса в связи с хозяйственно-ценными свойствами растений в целях создания новых и совершенствования существующих методов и приемов селекционно-семеноводческой работы : докл. дис. ... д-ра биол. наук. Краснодар, 1997.

обсуждаются в работе Т. И. Дьячук. Автором показано, что сорта, созданные с применением ДН-линий, обладают высокой засухоустойчивостью в условиях Поволжья. Например, сорт Нутанс 240, полученный в результате андрогенеза *in vitro*, передан на государственные сортоиспытания, а перспективные линии ячменя Нутанс 279, Нутанс 288, Нутанс 289 и яровой мягкой пшеницы С-2127 включены в схемы селекции¹.

Продолжительность создания линий при использовании гаплоидных технологий может составлять 7—8 месяцев. Однако этот процесс трудоемкий и зависит от ряда взаимосвязанных факторов.

На рис. 4.6 представлены основные направления селекционно-генетических исследований, в которые включены гаплоидные растения и показана возможность ускорения селекционного процесса путем получения стабильных гомозиготных линий, что является основным преимуществом использования дигаплоидов по сравнению с традиционными методами селекции.



Рис. 4.6. Основные направления использования гаплоидных растений

¹ Дьячук Т. И. Технологические и селекционные аспекты гаплоидии: на примере пшеницы и ячменя. Саратов, 2003.

Таким образом, отмечая преимущества использования гаплоидных технологий в практической селекции зерновых культур, необходимо указать также и на некоторые сдерживающие факторы. Во-первых, эмпирический подход, направленный на поиск генотипов, отзывчивых на условия культивирования пыльников, вместо разработки соответствующих «генотипнезависимых» методических процедур, позволяющих получать гаплоидные растения для любых генотипов. Во-вторых, неоднозначность и трудная воспроизводимость результатов из-за «гонки» за высоким выходом гаплоидной продукции при недостаточной изученности клеточных и молекулярных механизмов морфогенеза *in vitro*. В-третьих, известно, что эффективность андрогенеза *in vitro* зависит от определенного баланса эндогенных и экзогенных фитогормонов. К сожалению, этот вопрос является не до конца изученным и, наверное, самым сложным. По мнению Р. Г. Бутенко (1984), это связано с интегральным характером морфогенетических процессов и их зависимостью от многих внешних и внутренних факторов.

18.2. Методы создания гаплоидных растений

Создание гаплоидных растений играет важную роль в эволюции растительного мира. С момента открытия и изучения гаплоидии на нее возлагали надежду как на самую перспективную возможность в селекции. Экспериментальная гаплоидия позволила получить гаплоидные растения большинства возделываемых культур, но в селекционной практике используются лишь те виды, для которых разработаны способы массового получения гаплоидных растений.

Спонтанное возникновение гаплоидов в природе — редкое явление, которое варьирует, как правило, от десятитысячных до десятых долей процента. Для получения гаплоидов применяются различные методы: отдаленная гибридизация, внутривидовая гибридизация, температурные воздействия, метод ионизирующей радиации, метод близнецов, химический метод, культура мужского и женского гаметофитов.

Отдаленная гибридизация — один из первых изученных способов получения гаплоидных растений, который в настоящее время для некоторых культур остается достаточно эффективным способом индуцирования гаплоидии. Этим способом впервые были получены матроклинные гаплоиды *N. tabacum* путем скрещивания *N. tabacum* × × *N. sylvestris* в первом поколении. Способом отдаленных скрещиваний получены гаплоиды *Brassica nigra* и *Solanum tuberosum*.

Получение гаплоидов путем внутривидовой гибридизации основано на анализе генотипов отцовской и материнской формы и под-

боре генотипов, которые обеспечивают высокую частоту образования гаплоидов. Впервые такие формы были получены для кукурузы в 1959 г.

Температурные воздействия также являются методом инициации гаплоидии. Однако в случае применения данного метода были получены лишь единичные гаплоиды для таких культур, как кукуруза, табак и рожь. Например, этим способом Л. Рандольф в 1923 г. индуцировал гаплоидию у *Z. mays* путем обработки материнских растений через сутки после опыления температурой +43 °С.

Другим методом получения гаплоидов является применение ионизирующей радиации. Впервые облучение семян, растений и пыльцы было применено в 1931 г. для индуцирования гаплоидии у кукурузы. Первые гаплоидные растения кукурузы были получены Я. Катаяма в 1934 г. путем опыления пыльцой, облученной рентгеновским излучением (X-излучением). В результате облучения, мужские гаметы инактивировались. Ослабление происходило настолько, что мужские гаметы теряли способность к слиянию с яйцеклеткой, но при этом стимулировали ее к делению с последующим образованием гаплоидного зародыша. Кроме того, облучение пыльцы в стадии гаметогенеза могло ингибировать деление генеративного ядра, в результате чего формировалась пыльца с одним реституционным спермием, которая обеспечивала возможность партеногенетического развития яйцеклеток. Таким методом получены в 1990 г. гаплоидные растения кукурузы, в 1955 г. мягкой пшеницы. Облучение гамма-излучением показало наибольшую эффективность, но необходимо обязательное условие, чтобы материнские формы обладали склонностью к автономному апомиксису.

Близнецовый метод заключается в поиске и отборе гаплоидных близнецов. Близнецами называют пары или группы самостоятельных растений, полученных из одного семени. Одни авторы объясняют возникновение близнецов закладкой в одной семяпочке двух или нескольких зародышевых мешков, один из которых оплодотворяется нормально, а другой начинает свое развитие без оплодотворения, под влиянием первого. Это впервые показано на *Oryza sativa* в 1935 г. Другое мнение о возникновении близнецов состоит в том, что гаплоидный близнец возникает в результате формирования зародыша из синергид или антипод зародышевого мешка. Функционируют оба пути развития зародыша, кроме того, выделяют разделение на ранних этапах эмбриогенеза одного зародыша на несколько. Хорошо это показано на картофеле.

Другой способ, обеспечивающий повышение частоты возникновения гаплоидов, основан на химическом воздействии. В ряде случаев при обработке семян, соцветий или пыльцы химическими веществами происходит повышение частоты образования гаплоидов. Так, обработка рылец кукурузы до опыления гидразидом малеиновой кислоты (50 мг/л), в опытах Е. Динон увеличивала частоту га-

плоидов с 1:400 до 1:143. Гидразид малеиновой кислоты (40 мг/л) в сочетании с 2%-ным диметилсульфоксидом (ДМСО) оказался эффективным и для индуцирования гомозиготных диплоидов кукурузы. О химическом индуцировании апомиктического образования семян у гибридов кукурузы с использованием регуляторов роста и ДМСО сообщили также Г. Ху, Г. Лианг и С. Вассон. Большинство полученных ими растений оказались диплоидами, некоторые — миксоплоидами и лишь немногие — гаплоидами. Диплоидные растения были морфологически однородны и сходны с родителями. Они возникали, по предположению авторов, из соматической ткани семязпочки, а гаплоиды — из редуцированных клеток зародышевого мешка. Таким образом, была показана и возможность химической индукции добавочных зародышей у кукурузы.

Е. В. Гришина и М. И. Зайцева (1968) изучали влияние физиологически активных веществ на частоту гаплоидов кукурузы. Были исследованы индолилмасляная, индолилпропионовая, индолилтриуксусная и α -нафтилуксусная кислоты — в концентрации 0,1 % и новокаин — в концентрации 0,5 %. Химические вещества наносились на рыльца материнских растений путем опрыскивания. Наибольшее повышение частоты гаплоидов авторы обнаружили при обработке рылец индолилтриуксусной кислотой (до 1:1550) и α -нафтилуксусной кислотой (до 1:913) — за сутки до опыления и новокаином (до 1:242) — через сутки после опыления. В контроле гаплоиды не формировались. Возрастание частоты гаплоидии при обработке рылец физиологически активными веществами, видимо, объясняется тем, что они стимулировали яйцеклетки к делению без оплодотворения, а последующее опыление обеспечивало возможность формирования эндосперма и апомиктического развития зародыша. Новокаин, нанесенный на рыльца через сутки после опыления, по всей вероятности, нарушал процесс двойного оплодотворения, ограничивая его оплодотворением центрального ядра зародышевого мешка. Повышение частоты гаплоидии у сортов кукурузы в опытах Е. В. Гришиной и М. И. Зайцевой отмечено также при использовании пыльцевого родителя, зерновки которого перед посевом были обработаны химическими мутагенами — нитрозометилмочевинной и этиленимином. Механизм влияния химических мутагенов (через пыльцу) на возрастание частоты гаплоидии, видимо, аналогичен механизму действия физических мутагенов.

Значимый прорыв в получении гаплоидов произошел с развитием биотехнологии, когда были изучены методы культивирования клеток и тканей на искусственных питательных средах. Впервые в 1949 г. были разработаны экспериментальные методы получения гаплоидов *in vitro*. Культура мужского и женского гаметофитов — одно из перспективных направлений массового получения гаплоидных растений. Регенерация растений из изолированных пыльников, микроспор и завязей основана на принципе, что гаплоидные клетки

гаметофитов имеют широкую компетентность и могут менять свой путь развития с гаметофитного на спорофитный.

Существует три способа получения гаплоидов с использованием метода культуры изолированных тканей растений *in vitro*:

1) *андрогенез* — получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор;

2) *гиногенез* — получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семязпочек;

3) *партеногенез* — получение гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы.

Культура изолированных пыльников и микроспор — один из самых интересных разделов современной биотехнологии. Впервые гаплоидные растения были получены S. Guha, S. C. Maheshwari в 1964 г. для *Datura innoxia* путем андрогенеза. Затем Nitsch J. P. получил гаплоидные растения из пыльцевых эмбрионов *Nicotiana tabacum* и *Nicotiana glauca*. Эти разработки положили начало развитию нового метода получения гаплоидных растений в культуре пыльников и микроспор. Таким образом, была выявлена тотипотентность незрелой пыльцы, и с этого момента в результате различных исследований стали обнаруживаться возможности спорофитного пути развития в культуре изолированных пыльников у многих видов растений.

В настоящее время исследования по получению гаплоидов методом культуры пыльников проводятся во многих странах мира. Андрогенез отмечен для 240 видов, включая некоторые гибриды, принадлежащие почти к 85 родам и 38 семействам однодольных и двудольных растений.

В культуре пыльников возможны два пути образования гаплоидных растений. Первый — образование растений путем прямого эмбриогенеза из изолированных микроспор. При этом внутри пыльников из отдельных незрелых пыльцевых зерен возникают эмбриониды (рис. 4.7). Они прорастают и формируют гаплоидные растения. Второй — образование каллуса из клеток пыльника. В дальнейшем в результате морфогенеза из каллусных клеток регенерируют растения. В этом случае образовавшиеся растения не всегда бывают гаплоидными и часто отличаются по пloidности. В настоящее время до конца не выявлено, образуются ли они от полиплоидизированных гаплоидных клеток или от слившихся клеток¹.

Метод культивирования *in vitro* неоплодотворенных завязей и семязпочек (гиногенез) успешно был применен для ячменя, кукурузы, риса, табака и других сельскохозяйственных культур.

¹ Калашикова Е. А. Клеточная инженерия растений : учеб. пособие. М. : Изд-во РГАУ-МСХА, 2012.

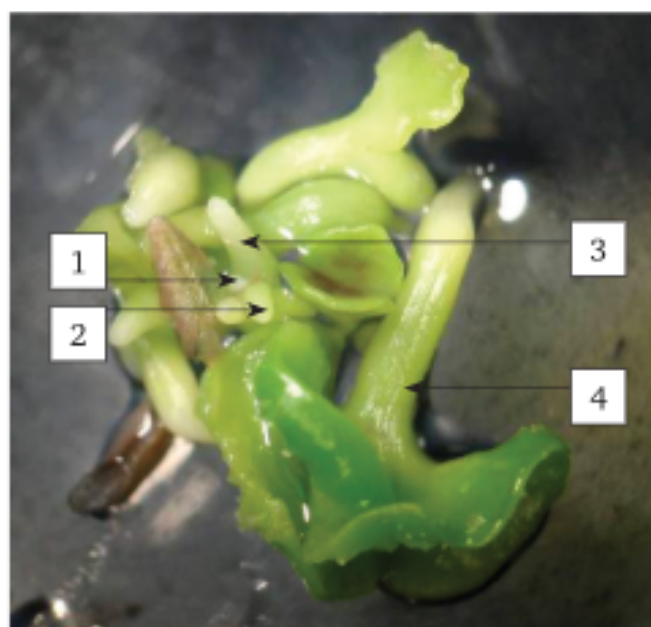


Рис. 4.7. Прямая регенерация соматических эмбриондов на изолированных пыльниках рапса (Май Дык Чунг, 2010):

1 — глобулярная стадия; 2 — сердцевидная стадия;
3 — стадия торпедо; 4 — проросток

Применение метода культивирования неоплодотворенных завязей и семяпочек *in vitro* в селекции растений вызвано большей частью тем, что вероятность регенерации при этом зеленых гаплоидных растений составляет 100 % по сравнению с методом культивирования пыльников. Тем не менее некоторые исследователи приходят к выводу, что для отдельных видов, особенно злаковых культур, гиногенез *in vitro* более перспективен, чем андрогенез *in vitro*. Установлено, что женские гаметофиты дольше сохраняют способность к новообразованиям, чем мужские. Например, для риса и табака было показано, что культивирование молодых одно-, двух- и четырехядерных зародышевых мешков наиболее эффективно, а для ячменя лучшие результаты были получены при культивировании зрелых зародышевых мешков. Кроме того, исследования показали, что гиногенез является единственным эффективным способом получения гаплоидных растений для *Beta vulgaris*, *Gerbera jamesonii*, для которых других способов получения гаплоидных растений не существует. Полученные таким образом гаплоидные растения отличаются высоким потенциалом размножения благодаря экономии времени за счет уменьшения длительности цикла классической селекции и генетической ценности гомозиготных линий. Кроме того, наличие только одного набора хромосом позволяет выявлять мутации, контролируемые рецессивными генами, и восстанавливать уникальные рекомбинанты.

Работы, проведенные на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева, показали, что при

культивировании семяпочек на разных вариантах питательных сред отмечалось либо образование каллусной ткани, либо формирование эмбриоидов. Эти процессы зависели от гормонального состава питательной среды. Так, присутствие кинетина в концентрации 1 мг/л в сочетании с 2,4-Д 1 мг/л приводило к формированию каллусной ткани из всех клеток семяпочек, а на среде с Дропп 1,0 мг/л и ИУК 0,5 мг/л — эмбриоидов.

Метод партеногенеза основан на том, что после отдаленного скрещивания хромосомы одного из родителей (гаплопродюсера) могут подвергаться элиминации, в результате чего в яйцеклетке сохраняется только одинарный, гаплоидный набор хромосом. При этом яйцеклетка продолжает развиваться до образования зародыша. Однако такой зародыш для дальнейшего роста и развития нуждается в питательных веществах, поскольку при отдаленной гибридизации, как правило, формирование эндосперма не происходит. Для сохранения такого гаплоидного зародыша его изолируют и в дальнейшем культивируют *in vitro* на питательных средах определенного состава. Гаплопродюсерами могут выступать как представители одного рода, как, например, ячмень луковичный (*Hordeum bulbosum*) для ячменя культурного (*Hordeum vulgare*), так и различных родов — африканское просо (*Pennisetum glaucum*) и кукуруза (*Zea mays*) для мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*). Универсальным гаплопродюсером для некоторых зерновых культур — твердой пшеницы, ячменя и овса — является кукуруза.

Метод партеногенеза был применен Као и Kasha в 1969 г. на ячмене при скрещивании *H. vulgare* × *H. bulbosum*. Использование в качестве гаплопродюсеров кукурузы изучали М. Инагаки, а также К. Суенага и соавторы (1995), американского проса — Ф. Матзк и А. Махн (1994), сорго — Н. Сан, С. Лу и К. Лиу (1996). При этом многие авторы подтверждают максимальный выход гаплоидов мягкой пшеницы при использовании в качестве гаплопродюсера кукурузы.

Таким образом, можно заключить, что для создания гаплоидных растений возможно применять различные методы, которые необходимо выбирать с учетом генетических и физиологических особенностей растений.

18.3. Факторы, влияющие на получение гаплоидных растений *in vitro*

До сих пор эмбриогенез в культуре изолированных репродуктивных органов *in vitro* различных культур происходит спонтанно и имеет низкую частоту выхода гаплоидных растений (1—4 %), а также предлагаемые технологии трудно воспроизводимы и недостаточно изучены на каждом этапе андрогенеза. Сложность механизмов спо-

рофитного пути развития микроспор и регуляция спорогенных клеток в условиях *in vitro* является важнейшей проблемой гаплоидных технологий. В компетенции микроспор наряду с другими можно выделить ряд взаимосвязанных факторов, каждый из которых оказывает свое влияние на морфогенетические процессы при культивировании репродуктивных органов растений *in vitro*. Для изученных культур показано, что эмбриогенез зависит от генетических, физиологических причин, стадии развития бутона и микроспор, а также факторов внешней среды, в частности состава питательной среды (минеральный и гормональный состав) и условий культивирования (жидкие, твердые питательные среды, световой и температурные режимы). Кроме того, этот процесс зависит и от процентного содержания микроспор, находящихся на оптимальной стадии развития для индукции пыльцевого эмбриогенеза в момент инокуляции пыльника. Например, С. С. Беккужиной (2011), при работе с изолированными пыльниками яровой пшеницы, экспериментально установлено, что эффективность пыльцевого эмбриогенеза повышается только в том случае, когда доля микроспор, находящихся на второй фазе развития, т. е. перед сильной вакуолизацией, составляет более 40 %. В этом случае выход гаплоидных структур отмечается в 8,4 % случаев, в то время как в вариантах, где количество микроспор перед сильной вакуолизацией составляет 40 %, выход эмбрионов снижается в 2 раза.

Переход с гаметофитного пути развития на спорофитный при культивировании пыльников *in vitro* возможен лишь на определенной стадии развития мужского гаметофита. Успех получения каллусных и (или) эмбриогенных гаплоидных структур зависит от правильной оценки исходного состояния развития гаметофита донорного растения. Важным моментом для снижения трудоемкости и увеличения производительности при проведении исследований по получению гаплоидов и (или) удвоенных гаплоидов является выявление корреляции между морфологическими показателями генеративных органов растения и стадией развития микроспоро- и гаметогенеза.

У разных растений для этих целей могут использоваться различные генеративные органы. У *Lilium longiflorum* была выявлена тесная корреляция между длиной пыльника и стадией микроспорогенеза и гаметогенеза. Эта зависимость была подтверждена у *L. candidum*. Длина пыльника также используется как маркерный признак для определения стадии развития микроспор у табака, картофеля, рапса, вигны, капусты белокочанной. Кроме того, в качестве маркерного признака, для сои, картофеля, томата, рапса, сурепицы используется размер бутона; перца сладкого — равная длина лепестков и чашелистиков; для капусты — соотношение длины лепестка и длины пыльника; для ячменя — появление флагового

листа на 1—3 см над предпоследним листом в зависимости от генотипа, а также длины колоса. Н. Н. Кругловой с соавторами (2006) установлено, что фенотипическим маркером критической стадии развития пыльника служит отношение расстояния от основания предпоследнего листа до основания флагового листа к расстоянию от основания флагового листа до кончика находящегося в трубке колоса. Фенотипический маркер у каждого изучаемого генотипа, как правило, свой. На рис. 4.8¹ в качестве примера приведен такой маркер для яровой мягкой пшеницы линии Фотос.

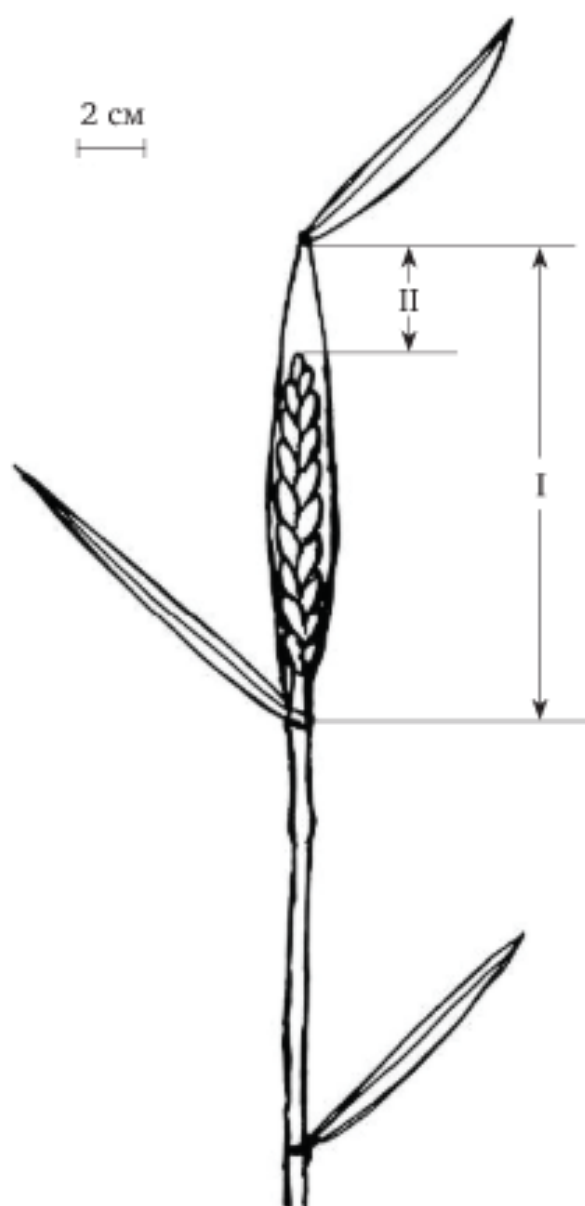


Рис. 4.8. Фенотипический маркер растений пшеницы линии Фотос, содержащих пыльники в критической стадии развития (схема):

I — расстояние от основания предпоследнего листа до основания флагового листа; II — расстояние от основания флагового листа до кончика находящегося в трубке колоса. Масштабная линейка — 2 см

¹ Круглова Н. Н. [и др.]. Эмбриологические основы андроклинии пшеницы. М., 2005.

Однако у некоторых растений не удалось выявить корреляционной зависимости между показателями генеративных органов и стадией микроспорогенеза. Например безрезультатными оказались попытки установить корреляцию между параметрами цветка и стадией развития микроспор у сахарной свеклы.

Таким образом, для различных видов растений изучена зависимость стадии развития микроспор от размера бутона в момент изоляции. Однако данный подход имеет место только в том случае, когда изолирование бутонов осуществляется с главного соцветия, находящегося в определенной фазе цветения (начало бутонизации). Кроме того, зависимость стадии развития микроспор от размера бутона сильно коррелирует с сортовыми особенностями изучаемой культуры. Это затрудняет технологический процесс массового получения гаплоидных растений, так как связано с ограничением временного интервала изолирования первичного экспланта.

Частота образующихся гаплоидных растений *in vitro*, прежде всего, зависит от генотипа исходного растения, а также его видовой и сортовой принадлежности. Это относится ко всем способам получения гаплоидных растений. Так, по мнению С. С. Хохлова (1976), для представителей семейства *Solanaceae*, гаплоиды удастся получить из пыльцы гораздо легче, чем для растений других семейств и сортов. По мнению одних исследователей, в пользу возможности отбора генотипов с высокой способностью к андрогенезу свидетельствует факт того, что при повторном культивировании пыльников дигаплоидных форм наблюдается увеличение частоты андроклинии по сравнению с исходными формами. При этом считается, что эта способность сохраняется в ряду поколений. Согласно другой точке зрения, частота эмбриогенеза у дигаплоидов андроклинного происхождения значительно ниже, чем у исходных форм. Отмечены также случаи, когда способность к андроклинии *in vitro* у гибридных растений первого поколения была значительно выше, чем у родительских форм. Таким образом, влияние вида, разновидности, сорта и т. д. на выход андроклинных структур очевидно и это должно учитываться при разработке технологии получения гаплоидных растений *in vitro*.

Большое влияние на индукцию спорофитного развития оказывают и модифицирующие факторы, особенно предобработка цветков и соцветий пониженными или повышенными температурами перед изолированием репродуктивных органов на искусственную питательную среду. Температурному воздействию могут быть подвергнуты соцветия, бутоны, пыльники и другие части растения-донора.

Из литературных данных установлено, что холодовая предобработка соцветий до выделения пыльников оказала положительное влияние на эффективность получения андрогенных структур в культуре пыльников *in vitro* растений различных таксономических групп.

Так, по данным Ж. Нич (1969) воздействие на пыльники *Nicotiana tabacum* пониженной температурой (3—5 °C) в критический момент развития пыльцевого зерна — во время первого митоза приводило к возникновению двух одинаковых дочерних ядер. Эти ядра располагались на противоположных полюсах пыльцевого зерна, многократно делились и давали начало многоклеточным каллусам и эмбриоидам. Предобработка пыльников пониженными температурами в опытах Ж. Нич позволяла получать до 3 % гомозиготных дигаплоидов. Вероятнее всего, температурный шок влияет на ориентацию веретена деления, что приводит к образованию эмбрионидов. Также было доказано, что холодовая предобработка растений способствует синхронизации деления микроспор и поддержания жизнеспособности эмбриогенных структур¹.

Режимы холодовой предобработки первичных эксплантов для исследуемых объектов могут различаться. Например, для риса обработка срезанных метелок умеренным температурным шоком (8—10 °C) в течение 10—14 суток оказывало положительное влияние на регенерационный потенциал. Оптимальным для прохождения начальных этапов морфогенеза в культуре пыльников *Triticale*, по данным С. Ф. Лукьянук и С. А. Игнатовой, оказалось воздействие температуры 5 °C в течение 10—15 суток. Авторами выявлено также стимулирующее влияние монохроматического синего света на дифференцировку меристематических зон в каллусных тканях с последующим ростом и формированием побегов.

Для видов рода *Nicotiana* предварительное инкубирование цветочных почек при пониженной температуре (7 °C) в течение 7 суток усиливало эмбриогенез. Холодовая 14-суточная обработка была менее эффективной. Для картофеля наиболее эффективной оказалась предобработка бутонов температурой 4 °C в течение 48—72 ч², в то время, как выдерживание бутонов при 6 °C не оказало существенного влияния на частоту каллусообразования³. Для ячменя увеличение выхода эмбрионидов достигалось выдержкой колосьев перед культивированием пыльников при 2 °C в течение 16—24 суток или 5—7 °C в течение 6—10 суток⁴. Для пшеницы предобработка колосьев перед изолированием пыльников при температуре 3 °C в течение 18—22 суток повышала частоту эмбриогенеза. По методике S. M. Ouyang и других исследователей (1983) для пшеницы

¹ Тюкавин Г. Б. Основы биотехнологии моркови : монография. М. : ВНИИССОК, 2007.

² Маруненко И. М. Условия способствующие развитию микроспоры по спорофитному пути, и получение гаплоидов : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 1992.

³ Калинин Ф. Л., Сарнацкая В. В., Полищук В. Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев : Наукова думка, 1980.

⁴ Рахимбаев И. Р. Культура репродуктивных клеток и гаплоидная биотехнология генетического улучшения растений // Биотехнология, теория и практика. 1997. № 3. С. 8.

и спелты оптимальным вариантом является предобработка колосьев при 3 °С в течение 8—10 суток.

Предварительная обработка бутонов холодом способствует синхронизации делений микроспор и поддержанию их жизнеспособности на длительное время. Ряд исследователей считает, что «холодовой шок» изменяет полярность первого пыльцевого митоза и тем самым способствует равному делению микроспор. Кроме того, по некоторым данным, обработка холодом изменяет состояние плазматических мембран микроспор путем усиления их синтеза и встраивания в них жирных кислот, что приводит к разжижению и текучести мембран. Отмечается, что холодовая обработка вводит микроспоры в состояние морфогенной компетенции, побуждает их к делению. В литературе также показано, что в условиях воздействия холодом микроспоры продуцируют и выделяют в культуральную среду кондиционирующие факторы, способствующие индуцировать спорофитный морфогенез в культуре свежесекретированных микроспор. Холодовая индукция спорофитного морфогенеза сопровождается появлением внеклеточных «гаметофитных» полипептидов, которые участвуют в регуляции морфогенеза микроспор *in vitro*¹.

Высокого выхода эмбриогенных структур, как показано для некоторых видов, можно достичь, если пыльники после изолирования и культивирования их на питательной среде обработать низкими положительными температурами. В ряде случаев такой подход, видимо, удобнее, поскольку отпадает необходимость предварительной инкубации. Например, для риса и пшеницы было установлено, что положительный эффект низкотемпературной обработки пыльников связан с более длительным поддержанием жизнеспособности их стенок и нормальных взаимосвязей с микроспорами.

Эффективность предобработки, ее экспозиции и диапазона температур зависит от генотипических особенностей растения-донора. Поэтому для ряда культур температурная обработка не всегда эффективна. Например, академиком И. Р. Рахимбаевым в 1992 г. (Казахстан) стимулирующий эффект предобработки пониженной температурой не был установлен при культивировании пыльников хлопчатника, сахарной, кормовой и диких видов свеклы, а также пыльников цветной капусты.

Помимо холодовой обработки для синхронизации деления микроспор применяют и воздействие на изолированные экспланты повышенных температур. Например, в культуре микроспор рапса показано, что воздействие на них повышенной температурой (32,5 °С) в течение 4 суток привело к переходу поздней одноклеточной стадии развития микроспор на эмбриогенный путь развития. Для про-

¹ Жамбакин К. Ж. Гаплоидная биотехнология растений. Алматы : Издательский центр «Интерлигал», 2004.

са и гороха эффективной оказалась тепловая обработка пыльников при инкубировании их в термостате при 32—33 °С в течение 5 суток. Для брюссельской и цветной капусты оптимальным был более мягкий режим тепловой обработки. Наилучшие результаты для этих культур получены при воздействии на изолированные пыльники температурой 35 °С в течение 16 ч.

Под действием высоких температур в микроспорах ингибируется синтез контрольного белка и повышается экспрессия многочисленных белков теплового шока (БТШ), принадлежащих к каждому из известных классов. Кроме того, были обнаружены качественные различия состава БТШ в микроспорах, причиной чего могут быть аллельные вариации¹.

Для повышения частоты эмбриогенеза в культуре изолированных пыльников в ряде случаев применяют сочетание обработки пыльников высокими и пониженными температурами. Так, для индукции образования каллуса и регенерации зеленых растений риса оптимальной оказалась следующая температурная обработка пыльников: 35 °С в течение 5 ч с последующей обработкой 10 °С в течение 7 суток.

В целом следует заключить, что как холодовая обработка, так и обработка эксплантов высокими температурами стимулирует частоту деления микроспор/пыльцы. Повышенные температуры, видимо, вызывают распад микротрубочек и нарушение веретена деления, что приводит к ненормальному делению ядер микроспор и образованию эмбриоидов и (или) каллусов. Холодовая обработка действует на микроспоры опосредованно. Она вызывает изменения в ультраструктуре протопластов, ведет к формированию одинаковых или почти одинаковых ядер, повышает жизнеспособность эмбриогенных микроспор/пыльцевых зерен, задерживая процесс их дегенерации. Установлено, что в процессе культивирования пыльников, подвергнутых холодовой предобработке, часть микроспор и пыльцевых зерен переходит с нормального (гаметофитного) пути развития на спорофитный, в результате чего происходит формирование многоклеточных гаплоидных эмбриоидов². Однако роль температурного воздействия на андрогенез до конца еще не изучена.

Как правило, частота андрогенеза для различных генотипов может варьировать от 1 до 8 %. Такая низкая компетенция микроспор к морфогенезу, вероятно, связана и с выделением ими газообразного гормона — этилена, который является причиной старения клеток, что приводит к быстрому развитию микроспоры от стадии тетрады до зрелой трехклеточной пыльцы. Это приводит к снижению

¹ Кошкин Е. И. Физиология устойчивости сельскохозяйственных культур. М. : Дрофа, 2010.

² Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений

или полной потере морфогенетической активности культивируемых эксплантов. Поэтому целесообразно проводить предобработку соцветий различными веществами, блокирующими синтез этилена. К таким веществам относится нитрат серебра, положительное действие которого показано для пыльников риса, капусты, пшеницы и других сельскохозяйственных культур¹.

Повышения морфогенетической активности изолированных пыльников, микроспор, завязей и семяпочек возможно добиться за счет применения предобработки бутонов/колосьев веществами гормональной и негормональной природы. Например, в работах С. С. Беккужиной (2011) показано, что обработка колосьев яровой пшеницы гормонами (кинетин, 2,4-Д, ИУК) в некоторых вариантах увеличивает частоту выхода эмбриоидов, и этот процесс зависит от концентрации и продолжительности воздействия. Установлено, что кинетин в малых концентрациях повышает выход эмбриоидов. Однако увеличение концентрации данного гормона до 0,2 %, а для некоторых генотипов и до 0,3 %, снижает учитываемый показатель. При обработке срезанных растений гормонами ауксинового типа действия (2,4-Д) выявлено, что повышение концентрации гормона увеличивает частоту выхода эмбриоидов у всех изучаемых генотипов. Например, частота образования эмбриоидов у линии Ю580R в контроле составило 0,6 %, а при обработке 0,04%-ным раствором 2,4-Д этот показатель повысился до 3 %. Для сорта Целинная-Юбилейная при обработке срезанных колосьев 2,4-Д в концентрации 0,03 % выход эмбриоидов составил 8 %. Аналогичные результаты получены и при обработке ИУК.

Предобработка срезанных растений аконитовой кислотой не оказала существенного влияния на частоту эмбриогенеза. Однако эмбриоиды, полученные в этом варианте, проявили высокий морфогенетический потенциал, в результате чего в 100 % случаев из них формировались растения-регенеранты, что не было отмечено в других вариантах².

При индукции пыльцевого эмбриогенеза одним из запусков сигнала спорофитного пути развития микроспор является определенное содержание эндогенной и экзогенной ИУК. Ответная реакция культуры пыльников при предобработке срезанных растений ИУК зависит от эндогенного содержания ИУК в момент инокуляции пыльника. Например, в работе В. Ю. Горбуновой (2000) показано, что экспланты с высоким содержанием эндогенных ИУК и АБК способны регулировать морфогенетические процессы в культуре пыльников пшеницы при отсутствии экзогенных гормонов. В то же вре-

¹ Поляков А. В. Биотехнология в селекции льна : монография. 2-е изд. М., 2010.

² Беккужина С. С. Гаплоидные технологии в ускоренном создании исходных форм и линий яровой мягкой пшеницы, устойчивых к засухе и *Septoria nodorum* Berk : автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2011.

мя для сортов с низким содержанием ИУК, микроспоры не могут переключиться на спорофитный путь развития, для этого необходимо присутствие в питательной среде ауксина, в частности 2,4-Д, в повышенных концентрациях.

Другим фактором, оказывающим существенное влияние на процесс получения гаплоидных растений *in vitro*, является состав питательной среды. По характеру влияния на ткани выделяют два рода компонентов питательной среды: поддерживающие жизнедеятельность и индуцирующие смену программы морфогенеза. К первой группе относят макро- и микроэлементы, витамины, компоненты углеводного и азотного питания, агар; ко второй группе — фитогормоны и гормоноподобные вещества синтетического и природного происхождения¹.

Для культивирования изолированных пыльников, микроспор, завязей и семяпочек используют питательные среды, рекомендованные Ф. Уайтом (1943), Т. Мурасиге и Ф. Скугом (1962), К. Миллером (1968), Э. Линсмайером и Ф. Скугом (1965), Д. Блейдсом (1966), супругами Нич (1969), О. Гамборгом с соавторами (1976), С. Ф. Лукьянюк и С. А. Игнатовой (1980, 1983) и некоторыми другими авторами, состав которых приведен в книге В. Ницше и Г. Венцеля².

Состав питательных сред, как правило, подбирается эмпирически и обычно содержит минеральные соли, углеводы, аминокислоты, витамины, фитогормоны, агар и другие добавки — кокосовое молоко, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина, картофельный экстракт и т. д. Среда, используемые для разных таксономических групп, как правило, различаются.

Компонентный состав первичной среды для культивирования пыльников играет важную роль в формировании, дальнейшем развитии новообразований и последующей регенерации растений. Из литературных данных следует, что разные виды растений требуют различного соотношения в питательной среде азотсодержащих солей, аминокислот и гормональных факторов. В частности, в культуре пыльников картофеля, томата, табака обычно используют среды, содержащие минеральные соли по прописям Нича, N₆, MS. В этих средах решающее значение имеет оптимальное соотношение нитратного и аммонийного азота. Показано положительное влияние на морфогенез повышенной концентрации нитратного и уменьшенной концентрации аммонийного азота в питательной среде. На этой основе были разработаны различные варианты азотных сред, из которых наиболее оптимальными для культивирова-

¹ Тюкавин Г. Б. Основы биотехнологии моркови : монография. М. : ВНИИССОК, 2007.

² Ницше В., Венцель Г. Гаплоиды в селекции растений / пер. с англ. В. В. Попова. М. : Колос, 1980.

ния пыльников риса, пшеницы, тритикале и других злаковых культур оказались среды N₆ и Блейдса.

Основой всех питательных сред, используемых в экспериментах по культуре тканей растений, является смесь минеральных солей, представленных как макро-, так и микроэлементами. Показано, что добавление кальция в виде CaCl₂ в среду увеличивает формирование эмбриоидов у пшеницы. Ag⁺ при добавлении в среду в виде тиосульфата серебра подавляет развитие каллусов, а нитрат серебра (AgNO₃) способствует регенерации растений.

Консистенция питательной среды является важным фактором, влияющим на морфогенетический потенциал изолированных эксплантов. К настоящему времени накоплена обширная информация о преимуществах жидких питательных сред для культивирования пыльников. Известно, что большинство типов агара, используемого для приготовления твердых сред, оказывает отрицательное влияние на выживаемость генеративных эксплантов, поэтому агар целесообразно заменять агарозой. Некоторые авторы для уплотнения питательной среды успешно применяют крахмал. Кроме того, в работах по получению гаплоидных растений рекомендуется использовать и жидкие среды. Так, для инициации соматического эмбриогенеза в пыльниках ячменя, по сообщению К. Каши (1989), наиболее эффективной оказалась жидкая питательная среда ВАС 1 (barley anther culture medium). Однако следует иметь в виду, что при использовании жидких питательных сред, несмотря на высокую способность к каллусогенезу, частота регенерации последних бывает довольно низкой. Видимо, это связано с условиями анаэробно-анаэробного роста каллусной ткани, а также с формированием сильно вакуолизированных, оводненных клеток, не способных к регенерации.

Увеличения эффективности андрогенеза *in vitro* у ячменя сорта Clipper удалось достичь при использовании для культивирования пыльников, плавающих на жидкой среде мембран. Другим способом повышения плавучести каллусов на жидкой среде при работе с ячменем может служить добавление в нее фикола — 200 г/л (Као К. Н., 1984). Например, К. Каша (1989) сообщил, о более низких концентрациях фикола (2,0—3,5 г/л) в среде ВАС 1. Благоприятное влияние на культуру пыльников оказывает также активированный уголь (0,2—0,5 %), адсорбирующий гормоны, витамины, железо и фенольные соединения, продуцируемые стареющими тканями.

Особое внимание при оптимизации питательной среды в культуре тканей растений уделяется гормональному контролю морфогенеза, который осуществляется путем изменения соотношения ауксин/цитокинин. С помощью регуляторов роста осуществляется взаимодействие клеток, тканей и органов как в целом растений, так и в его изолированных эксплантах. Гормоны необходимы для запуска и регуляции морфогенетических и физиологических программ,

действуют в очень низких концентрациях и являются сравнительно низкомолекулярными веществами. Из литературных данных установлено, что при культивировании пыльников на питательных средах *in vitro* все виды растений можно разделить на два класса: гормонозависимые и гормононезависимые. У гормононезависимых растений гормоны могут поступать из стенки пыльника или из самой пыльцы. К таким в основном относятся растения семейства *Solanaceae*. Например, для растений табака и белены черной пыльцевой эмбриогенез был индуцирован на простой минерально-сахарозной среде. Установлено, что пыльники табака содержат эндогенные ауксины, один из которых идентифицирован в качестве ИУК. Однако для индукции каллусогенеза и эмбриогенеза пыльникам большинства видов растений требуется добавление в среду различных гормонов и других ростовых веществ. Из ауксинов в культуре тканей растений чаще всего используется 2,4-Д, ИУК и НУК, из цитокининов — кинетин и БАП. Очевидно, фитогормоны или их синтетические аналоги влияют на экспрессию генов в период морфогенеза. Экспериментально показано, что первая фаза процесса регенерации растений в большей степени зависит от применяемого ауксина. Например, продемонстрировано, что концентрация 2,4-Д выше 0,1 мг/л ингибирует прямой эмбриогенез, активизируя при этом процесс каллусогенеза с последующим получением растений из него при субкультивировании, а концентрация ниже 0,1 мг/л способствует прямому эмбриогенезу и регенерации растений (пшеница, морковь и другие культуры) на исходной среде культивирования. Положительное влияние пониженных концентраций 2,4-Д на индукцию морфогенных структур в культуре пыльников различных растений отмечается многими исследователями. Установлено, что применение 2,4-Д на ранней одноядерной стадии микроспор вызывает их стерилизацию, а на поздней одноядерной стадии приводит к их аномальному развитию. Замена 2,4-Д на ИУК или НУК в питательной среде повышает как регенерационный потенциал культивируемых эксплантов, так и процент образования нормальных по морфологии растений. ИУК в зависимости от концентрации и исходной стадии развития микроспор ускоряет созревание пыльцы или же усиливает ее стерилизацию.

Сочетание ауксина с цитокинином, входящих в состав питательных сред, является наиболее мощным индуктором морфогенеза для различных таксономических групп. Например, для ячменя хорошие результаты были получены при использовании либо сочетания 2,4-Д — 1,5 мг/л с кинетином — 0,5 мг/л, либо ИУК — 1,0 мг/л с 6-БАП — 1,0 мг/л. У хлопчатника для индукции каллуса в культуре пыльников необходима высокая концентрация ауксина по сравнению с цитокинином — 2,0 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л кинетина, а для пролиферации требуется повышенная концентрация цитокинина — 2,0 мг/л 2,4-Д + 2,0 мг/л кинетина. Пыльники растений лонга-

на (*Dimocarpus longan*) на среде МС с 2,0 мг/л 2,4-Д + 1,0 мг/л кинетина образовывали каллусы, из которых на среде для регенерации (0,1 мг/л НУК + 0,5 мг/л БАП) были индуцированы эмбриониды. При перенесении последних на среду с 0,1 мг/л ИУК + 0,3 мг/л БАП были индуцированы гаплоидные растения. При культивировании пыльников риса, находящихся на стадии первого деления микроспор, на среде, содержащей 1/2 минеральных солей по МС с 2,0 мг/л НУК + 1,0 мг/л БАП, наблюдалось образование каллуса с последующей регенерацией растений. В то же время формирование эмбрионидов и гаплоидных растений происходило при культивировании пыльников с одноядерными микроспорами на безгормональной среде.

Исходя из того, что при разработке гаплоидной технологии необходимо добиться прямой регенерации растений из культивируемых пыльников и микроспор, исключая процесс каллусогенеза, при котором наблюдается соматональная изменчивость, представляет интерес изучение мало применяемых в культуре *in vitro* препаратов гормональной природы. Одним из таких препаратов является Дропп (тиадазурон) — 3-(1,2,3-Тиadiaзолин-5) — 1-фенилмочевина. Формула: $C_9H_8N_4OS$ (рис. 4.9).



Рис. 4.9. Структурная формула препарата Дропп

Рострегулирующая активность Дропп была выявлена на интактных растениях в конце 1970-х гг., но к настоящему времени данный препарат приобрел практическое значение, например, для хлопчатника. Дропп обладает цитокининовой активностью, кроме того, под его влиянием резко интенсифицируется образование АБК в клетках растений¹. Известно, что АБК оказывает стимулирующее действие на органогенез (побегообразование) и эмбриогенез. Кроме того, АБК препятствует образованию корней, подавляющих рост образовавшихся почек, и частично ингибирует каллусообразование.

Исследования, проведенные на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева, показали эффективность применения данного препарата на индукцию эмбрионидов из изолированных микроспор капусты белокочанной. Присутствие Дропп в питательной среде в концентрации 0,2 мг/л в сочетании с НУК 0,05 мг/л привело к формированию эмбрионидов в 8,2 % случаев. При длительном культивировании пыльников в этих условиях наблюдали разрыв стенок пыльника

¹ Муромцев Г. С. [и др.]. Основы химической регуляции роста и продуктивности растений. М. : Агропромиздат, 1987.

и появление глобулоподобных структур, которые в дальнейшем развивались в эмбриониды, проходя при этом все стадии развития.

Кроме регуляторов роста, большое влияние на процессы морфогенеза оказывает источник углеродного питания, который присутствует в составе питательной среды в виде сахарозы, глюкозы или мальтозы. Сахароза наиболее часто используется в качестве источника углерода и играет роль осмотика. Например, для злаковых культур концентрация данного компонента в среде зависит от исследуемого генотипа: для пшеницы требуется 9 % сахарозы, риса — 6 %, кукурузы и ячменя — 12 %, томатов — от 10 до 15 %.

В литературе отмечено, что замена сахарозы на мальтозу или глюкозу положительно влияет не только на индукцию каллусов и эмбрионидов, но и на последующую регенерацию растений.

Морфогенетический потенциал пыльников в значительной мере зависит от условий выращивания растений-доноров. Доля зеленых регенерантов из пыльников полевых растений, как правило, выше, чем из пыльников тепличных растений. Например, в работах Е. Т. Ларсена с соавторами (1991) показано, что у ячменя этот показатель достигал в первом случае 15,1 %, во втором — 9,9 %. Аналогичные результаты наблюдались для пшеницы. Отсюда следует, что условия выращивания растений в сооружениях искусственного климата далеки от оптимальных.

Кроме того, условия культивирования (фотопериод, интенсивность освещения) изолированных репродуктивных органов растений *in vitro* оказывают определенное влияние на процесс получения гаплоидных растений. Поэтому при оптимизации гаплоидных технологий эти факторы необходимо учитывать.

В культуре пыльников *in vitro* на начальных этапах культивирования происходят митотические деления микроспориальных клеток и возникают эндоспориальные многоклеточные образования, которые содержат две, три, четыре клетки и более. Сначала эти клетки размещаются внутри оболочки исходной микроспоры. В дальнейшем из эндоспориальных многоклеточных образований формируются разные типы андрогенных структур (калусы, эмбриониды).

Микроспоры в процессе культивирования переходят в многоклеточное состояние, т. е. превращаются в эндоспориальные многоклеточные образования в результате митотических делений, разными путями. Следовательно, для понимания закономерностей андрогенеза *in vitro* важно изучение путей развития микроспор, формирования андрогенных структур и регенерации растений.

Начальные пути развития микроспор в культуре *in vitro* систематизировал Н. Сандерленд. Он выделил три пути развития — А, В и С, основанные на способах деления ядра микроспоры. Пути А и С связаны с неравным первым делением ядра микроспоры, в ре-

зультате которого образуется генеративное и вегетативное ядро. В первом случае (путь А) генеративное ядро не развивается или дегенерирует, во втором (путь С) — наблюдается независимое деление ядер обоих типов. Путь В состоит в том, что после первого раннего деления в пыльцевом зерне образуются два одинаковых ядра, продолжающих развитие и участвующих в образовании каллуса или эмбриоидов. У одних и тех же видов присутствуют три пути развития микроспор, но частота их образования сильно различается.

Пути А и В в норме ведут к образованию гаплоидных каллусов и эмбриоидов, хотя в случае пути В возможны отклонения, связанные со слиянием ядер и формированием диплоидных и полиплоидных каллусов и эмбриоидов. Путь С всегда заканчивается формированием диплоидных и полиплоидных каллусов и эмбриоидов. Поэтому растения, формирующиеся в культуре изолированных пыльников, нередко варьируют по числу хромосом от гаплоидных до полиплоидных. В наибольшей степени это относится к индукции растений из каллусной ткани. Так, у ячменя, по данным Д. Клэфэма (1973), из 25 зеленых андрогенных растений было: 3 — преимущественно гаплоидных, 1 — частично гаплоидное, 17 — диплоидных и 4 — преимущественно тетраплоидных растения.

Длительное культивирование андрогенного каллуса рекомендуется использовать для получения спонтанно возникающих диплоидизированных гаплоидов и растений других уровней пloidности. В отличие от каллусной ткани прямой эмбриогенез обеспечивает большую цитогенетическую стабильность андрогенного потомства.

При культивировании пыльников необходимо учитывать особенности всех тканей, так как наряду с микроспорами в образовании эмбриоидов могут принимать участие и соматические клетки пыльников. Способность к образованию эмбриоидов и механизмы этого процесса во многом зависят от стадии развития микроспор. Многочисленные исследования показали, что наиболее оптимальная стадия развития микроспор — сильно вакуолизированная стадия.

Цитологические исследования, проведенные на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА, показали, что в процессе культивирования пыльников рапса в течение 25 суток на среде В₅ наблюдается процесс образования из микроспор сильно вакуолизированных и активно делящихся клеток. В дальнейшем они подвергаются многократным симметричным митотическим делениям, что ведет к формированию сначала двуклеточных микроспор, а затем многоклеточных структур (рис. 4.10, а—в, е, ж)¹. Развитие этих структур происходит двумя путями: 1) формирование

¹ Май Дык Чунг. Совершенствование технологии получения гаплоидных и ди-гаплоидных растений рапса (*Brassica napus* L.) и белокочанной капусты (*Brassica oleracea* L.) *in vitro* : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.06. М., 2010.

эмбрионидов, 2) формирование вытянутых клеток и дальнейшая их гибель. Визуально было отмечено, что формирование эмбрионидов происходит лишь в том случае, когда структуры попадают на поверхность питательной среды. В случае если структуры остаются внутри пыльника, наблюдается процесс формирования вытянутых клеток, который был схож с процессом прорастания пыльцы *in vivo* (рис. 4.10, з, д, з—к). Причем эта способность характерна только для клеток, которые находились в периферийной зоне клеточных структур. Такие структуры в дальнейшем не были способны к эмбриогенезу и погибали в процессе культивирования.

Таким образом, можно предположить, что низкая частота эмбриогенеза в культуре изолированных пыльников связана с незначительным выходом клеточных структур на питательную среду. Поэтому культивирование изолированных микроспор является наиболее перспективным способом получения гаплоидных растений.

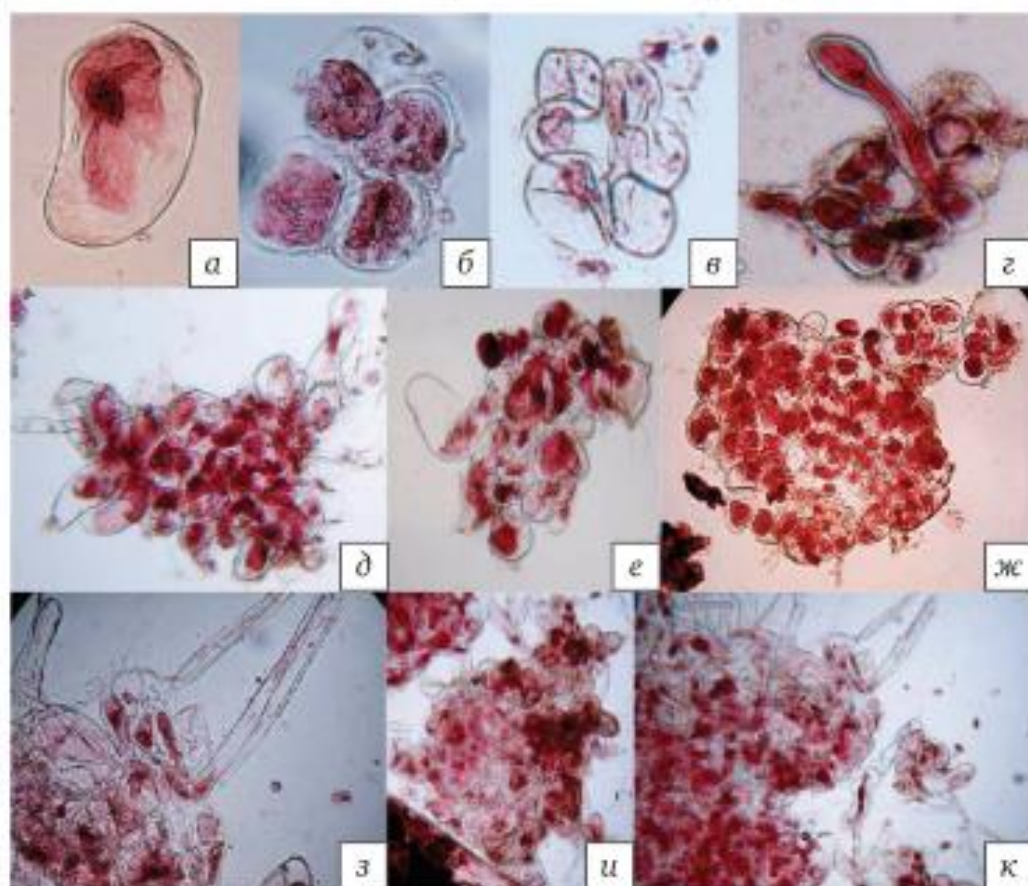


Рис. 4.10. Развитие микроспор и формирование клеточных структур:
а — одноядерная сильновакуолизированная; б, в — многоклеточные структуры; г—е, з—к — формирование вытянутых клеток, похожих на процесс прорастания пыльцы *in vivo*; ж — формирование эмбрионидов

Для доказательства гаплоидной природы растений-регенерантов, полученных в культуре изолированных пыльников и микроспор, применяют различные методы, например подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц (косвенный метод) и числа хро-

мосом в меристеме корня (прямой метод). Известно, что число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц у гаплоидного растения в 2 раза меньше, чем у диплоидного. Из перечисленных методов последний является наиболее эффективным в доказательстве гаплоидной природы полученных растений. Однако он имеет определенные трудности, прежде всего, для растений, для которых характерно наличие мелких хромосом, что затрудняет процесс их подсчета.

Для получения дигаплоидных растений необходимо провести работу по удвоению числа хромосом у гаплоидных растений. Для этого полученные гаплоидные растения обрабатывают колхицином 0,5%-ной концентрации в сочетании с 4%-ным раствором диметилсульфоксида. Обработку растений возможно проводить разными способами. Наиболее перспективным способом является нанесение раствора на пазушные и верхушечные почки в течение 7—10 суток (рис. 4.11).



Рис. 4.11. Обработка пазушных и верхушечных почек растений-регенерантов рапса раствором колхицина

После этого растения можно переносить в условия теплицы. Исследования разных авторов показывают, что обработка гаплоидных растений раствором колхицина приводит к формированию фертильных цветков с последующим созреванием семян, в то время как в вариантах без обработки растения были стерильными и семена не образовывались (рис. 4.12).

Таким образом, литературные данные свидетельствуют о том, что технология создания гаплоидных растений *in vitro* — процесс длительный, зависящий от комплекса взаимосвязанных факторов, начиная от выращивания растения-донора и заканчивая способами обработки гаплоидных регенерантов с целью получения дигаплоидов. Кроме того, предлагаемые в литературе подходы не всегда эффективны и трудновоспроизводимы. Поэтому поиск и разработка новых элементов гаплоидных технологий остается в настоящее время острой проблемой клеточной биотехнологии.



Рис. 4.12. Соцветия рапса:

а — гаплоидные растения без обработки колхицином; *б* — гаплоидные растения после обработки колхицином

Контрольные вопросы и задания

1. Какова роль гаплоидных растений в селекции?
2. Какие существуют способы создания гаплоидных растений?
3. Что является первичным эксплантом при андрогенезе?
4. Что является первичным эксплантом при гиногенезе?
5. Что является первичным эксплантом при партеногенезе?
6. Что вы знаете о получении гаплоидных растений в условиях *in vitro*?
7. Каким образом гаплоидия растений позволяет ускорять селекционный процесс?
8. Какие факторы, оказывают влияние на частоту андрогенеза?
9. Что заставляет микроспору перейти с гаметофитного на спорофитный путь развития?
10. Как вы думаете, каким образом можно гаплоидные растения перевести в дигаплоидное состояние? Расскажите о методических приемах.

Ситуационные задачи

1. Известно, что для создания новых сортов растений используют метод отдаленной гибридизации. Однако в результате скрещивания двух генотипов возникает постгамная несовместимость, которая проявляется в низкой всхожести семян или полном ее отсутствии. Предложите технологию, направленную на сохранение полученных гибридов.

2. При преодолении постгамной несовместимости растений применяют эмбриокультуру. Перечислите методы сохранения гибридных зародышей и выберите наиболее приемлемый метод для пшеницы, сосны и вишни.

3. При гибридизации часто возникают физиологические и морфологические барьеры несовместимости родительских форм. Назовите метод, позволяющий преодолеть прогамную несовместимость растений.

4. Для создания генофонда ценных клеток и тканей растений *in vitro* применяют метод криоконсервации. При данной технологии встречается ряд трудностей, связанных с защитой клеток и тканей от осмотического стресса и их механического разрушения в результате замораживания. Как защитить клетки от осмотического стресса и их механического разрушения в результате замораживания?

5. При проведении работ по криосохранению необходимо учитывать специфику растительных клеток. Определите оптимальные режимы технологии криоконсервации каллусных и меристемных клеток. Назовите сходства и различия в технологиях.

6. Одним из важных этапов получения нового селекционного материала является включение в селекционный процесс гаплоидных растений, которые получены путем андрогенеза. Какие факторы оказывают влияние на переход с гаметофитного на спорофитный путь развития микроспор *in vitro*?

7. Оцените эффективность андрогенеза, гиногенеза и партеногенеза при получении гаплоидных растений. Объясните свой выбор.

8. Возможно ли в культуре изолированных пыльников и микроспор получить ДН-линии спонтанно или этот процесс находится под контролем действия определенных веществ?

Лабораторный практикум

Работа 1. Культура изолированных пыльников. Получение гаплоидных растений

Объяснение. Культивирование *in vitro* пыльцы и пыльников позволяет получать гаплоидные растения и каллусные ткани. Это представляет большой интерес для генетики и селекции, так как у гаплоидов легче выявить и отобрать ценные мутации, а с помощью колхицина можно получить полностью гомозиготные диплоидные растения.

В условиях культуры *in vitro* индукция роста микроспор и образования эмбриоидов осуществляется двумя путями: прямым эмбриогенезом или через образование каллуса и индуцирование органо-генеза. В обоих случаях процесс протекает иначе, чем в условиях *in vivo*. Образование гамет после одного-двух делений блокируется, в то время как вегетативная клетка делится как зигота и дает начало эмбрионам. Более желателен прямой андрогенез, при котором микроспора ведет себя как зигота и проходит целый ряд этапов эмбриогенеза, вплоть до образования на пыльнике растений. В случае непрямого андрогенеза микроспора дает начало каллусу, в котором на той же среде начинается образование эмбриоидов.

Индукцирование андрогенеза в наибольшей степени зависит от состояния пыльцы в момент введения ее в культуру *in vitro*. Пыльники рекомендуется брать в момент первого митоза или после его завершения. Для этой цели пригодны нераспустившиеся цветочные бутоны с пыльниками, содержащими одноклеточные микроспоры.

У многих видов наилучший выход микроспор обеспечивается при предобработке культивируемых пыльников низкими температурами. Например, у ячменя обработка в течение 28 дней при 4 °С или 14 суток при 7 °С дает оптимальные результаты.

Материалы и оборудование: цветочные бутоны растений; бинокулярная лупа; стерильные пинцеты, скальпели, пробирки или чашки Петри с питательной средой для пыльников; гипохлорит кальция или натрия или 0,1%-ный раствор диацита или сулемы; колбы со стерильной водой — 2 шт.; стерильные стаканчики — 2 шт.; спиртовка, спички, вата.

Ход работы. Микроспоры, выделенные из пыльников, окрашивают 3%-ным ацетокармином и с помощью микроскопа определяют стадию развития пыльцы в пыльниках. Отбирают бутоны с пыльниками, содержащими преимущественно одноядерные микроспоры.

Отделяют цветочные почки, помещают по 23 шт. в раствор гипохлорита или диацита на 5—10 мин, затем 2—3 раза промывают стерильной водой. Делают надрез на одной стороне почки и с помощью пинцета с тонкими кончиками собирают тычинки в стерильные чашки Петри. От тычинок отделяют тычиночные нити и помещают по пять пыльников в культуральный сосуд. Изолирование неповрежденных пыльников из очень маленьких цветочных почек следует проводить под бинокулярной лупой. У мелких бутонов удаляют только венчик и помещают целую почку на питательную среду таким образом, чтобы пыльники были в непосредственном контакте со средой. Наличие других частей цветка не влияет на развитие пыльцы.

Поврежденные пыльники обязательно отбраковывают, так как в противном случае это ведет к гибели всего пыльника и, кроме того, каллусная ткань может образовываться не из пыльцы, а из соматических диплоидных клеток.

Пыльники культивируют на агаризованной или жидкой питательной среде в пробирках или чашках Петри $d = 5$ см. Культуры инкубируют при 24—27 °С и экспонируют при освещенности около 2000 лк и 14-часовом дне. Важно, чтобы пыльники были отобраны из относительно молодых растений, выросших в нормальных условиях освещения. У старых растений к концу цветения образуются мелкие бутоны, которые содержат пыльники с гетерогенной смесью микроспор и дефективной пыльцой.

При культивировании пыльников, образующиеся из пыльцы растения за 3—8 недель достигают высоты около 5 см, после чего их вынимают из агара и пересаживают в горшки со стерильной почвой. В первое время горшки необходимо накрывать стаканом для создания влажной атмосферы.

Для образования эмбриоидов необходимы сахара и железо. Сахарозу вносят в питательную среду в концентрации 2—4 %, но для некоторых пыльников (ячменя, томатов, пшеницы) она должна быть повышена до 6—12 %. Железо лучше применять в комплексе с хелатами (Fe ЭДТА).

Работа 2. Получение гаплоидных растений в культуре пыльников мягкой пшеницы

Объяснение. Гаплоидия — процесс, приводящий к получению растений с уменьшенным вдвое набором хромосом. В системах *in vitro* гаплоиды получают путем культивирования пыльников и микроспор. Поскольку гаплоиды, полученные в культуре пыльников, несут генотип мужской гаметы, этот процесс называется андрогенезом *in vitro*. Андрогенез может быть прямым и косвенным. При прямом андрогенезе образование гаплоидных растений-регенерантов происходит благодаря пыльцевому эмбриогенезу, т. е. из эмбриоидов, формирующихся путем деления микроспор. Микроспора

ведет себя как зигота и проходит ряд этапов эмбриогенеза, иногда до образования на пыльнике растений. Возникновение гаплоидных растений из каллусов, которые образуются в результате дедифференциации микроспор, называется косвенным андрогенезом. При этом не все растения, регенерировавшие из каллуса, являются гаплоидными. В связи с этим для массового получения гаплоидов необходимо индуцировать пылевой эмбриогенез. При выделении пыльников из цветочных бутонов и помещении их на питательную среду индуцируется спорофитный путь развития микроспор. Внутри пыльника происходят многочисленные деления микроспор и образуется многоклеточный комплекс, из которого формируются различные андрогенные структуры (глобулы, эмбриониды), дающие начало гаплоидным растениям. Индуцирование андрогенеза в наибольшей степени зависит от комплекса факторов, главными из которых являются генотип, физиологическое состояние донорного растения и экспланта, стадия развития пыльцы, состав питательных сред, условия культивирования и др.

Материалы и оборудование: молодые колосья пшеницы (до выколашивания) — 10 шт., стерильные чашки Петри с одним-двумя слоями фильтровальной бумаги — 3 шт., бинокулярная лупа, стерильные пинцеты для извлечения и переноса пыльников на питательную среду, стерильные стаканы — 3 шт., колба со стерильной дистиллированной водой, 0,1%-ный раствор сулемы для стерилизации колосьев, 3%-ный ацетокармин, колба с питательной средой МС, спиртовка, спички, ватный тампон для стерилизации ламинар-бокса и предметного столика бинокуляра.

Ход работы. Колосья пшеницы помещают для стерилизации в 0,1%-ный раствор сулемы и выдерживают 10—15 мин. Затем сулему сливают, а колосья промывают в 3—5 объемах стерильной дистиллированной воды, выкладывают в чашки Петри на фильтровальную бумагу. Под бинокулярной лупой, придерживая одним пинцетом колос, отгибают листовые обертки и извлекают пыльники (поврежденные отбрасывают), которые быстро переносят в чашки Петри с агаризованной средой МС, слегка вдавливая пинцетом для лучшего контакта со средой. Культуры инкубируют при 23—25 °С без доступа света в течение 3—5 недель. Стадию развития пыльцы в пыльниках определяют цитологическим методом. Для этого пинцетом извлекают пыльники на предметное стекло и дробят на мелкие кусочки. Содержимое окрашивают ацетокармином с подогревом на спиртовке и определяют под микроскопом стадию развития пыльцы.

Работа 3. Культура изолированных зародышей

Объяснение. При отдаленной гибридизации наблюдается так называемая постгамная несовместимость, в результате чего заро-

дыш остается недоразвитым и неспособным к нормальному прорастанию. Даже у щуплой зрелой зерновки можно извлечь зародыш и культивировать его на питательной среде без добавления гормонов, например на среде МС. При более отдаленных скрещиваниях нарушения в развитии зародыша иногда наблюдаются уже на ранних этапах, что выражается в замедлении темпов роста, отсутствии дифференцировки. Процесс культивирования такого зародыша состоит из двух этапов: эмбрионального роста, во время которого продолжается дифференциация, и его прорастания. Для первого этапа требуется более сложная питательная среда. Незрелые зародыши изолируют обычно через 2 недели после опыления, но этот срок может быть другим в зависимости от комбинаций скрещивания и погодных условий. Целесообразнее начать наблюдение за развитием гибридных зерновок уже с 9—10 суток после опыления и, обнаружив замедление или остановку роста, ухудшение внешнего вида зерновок, немедленно приступить к изолированию и высадке зародышей на питательную среду.

Материалы и оборудование: зрелые зерновки пшеницы; замоченные в воде за 1 сутки до занятий; пробирки со стерильной питательной средой МС; стерильные пинцет, скальпель, стерильные матрасики или чашки Петри; колба со стерильной водой, спиртовка, спички, марлевые стерильные мешочки.

Ход работы. Всю работу проводят в ламинар-боксе. Предварительно замоченные семена стерилизуют спиртом в течение 2—3 мин, затем помещают по 10—20 шт. в марлевые мешочки и стерилизуют в растворе диацета или сулемы 15 мин. Раствор сливают во флакон для повторных стерилизаций, а семена промывают 3—5 раз стерильной дистиллированной водой в том же стакане, в котором проводилась стерилизация. Пинцетом переносят зерновки на стерильный матрасик или в чашку Петри. Кладут зерновку бороздкой вниз и, придерживая пинцетом, остро отточенным скальпелем или иглой рассекают оболочку и выделяют зародыш. Повернутый щитком вниз зародыш переносят в пробирку или чашку Петри со средой МС без гормонов. Через 2—3 недели зарисовывают образовавшиеся из зародышей проростки.

Раздел V

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ

В результате изучения учебного материала данного раздела обучающиеся должны:

знать

- методы выделения протопластов;
- приборы, реактивы и оборудование для выделения протопластов;
- методы слияния протопластов *in vitro*;
- теоретические основы создания соматических гибридов;
- методы *in vitro* создания растений, устойчивых к абиотическим факторам окружающей среды;

• методы *in vitro* создания растений, устойчивых к биотическим факторам окружающей среды;

уметь

- на практике применять методы соматической гибридизации;
- подбирать условия для культивирования изолированных протопластов *in vitro*;
- культивировать клеточные культуры на селективных средах;

владеть

- технологиями культивирования изолированных протопластов;
 - технологиями *in vitro* соматической гибридизации клеток;
 - технологиями получения устойчивых к абиотическим и биотическим стрессам клеточных культур и растений-регенерантов.
-

Глава 19

ГИБРИДИЗАЦИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Соматическая гибридизация — создание неполовых гибридов путем слияния изолированных протопластов, полученных из соматических клеток. Теоретическое слияние протопластов и парасексуальная гибридизация могут представлять интерес в том случае, если с помощью этой техники окажется возможным:

- скрещивать филогенетически отдаленные виды растений (организмов), которые невозможно скрестить обычным половым путем;
- получать асимметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами (или несколькими генами, или только органеллами и цитоплазмой) другого;
- создать систему гибридизации, включающую одновременное слияние трех родительских клеток и более;
- получать гибриды, представляющие собой в генетическом смысле сумму идиотипов родителей;
- получать растения, гетерозиготные по внеядерным генам;
- преодолевать ограничения, налагаемые генеративными системами несовместимости;
- скрещивать формы, которые невозможно гибридизировать половым путем из-за аномалий в морфогенезе или гаметогенезе родителей;
- гибридизировать клетки, несущие различные эпигенетические программы.

Важнейшим отличием гибридизации с помощью парасексуальной техники от обычного полового скрещивания является то, что этот новый способ всецело искусственный. Можно теоретически предположить, что часть ограничений, присущая половому скрещиванию, парасексуальной гибридизации не свойственна (например, ограничения, возникающие вследствие неспособности родителей к нормальному гаметогенезу либо вследствие реакции генеративных систем несовместимости). Кроме того, гибридизация клеток является сложным процессом, состоящим из целого ряда событий, способных приводить к генетическим изменениям: слияние клеток, слияние (неслияние) ядер клеток, слияние (неслияние) других органелл, селективная деструкция органелл и т. д. Поскольку генотип

потомства является функцией всех этих событий, вполне очевидно, что, задавая те или иные параметры искусственного процесса парасексуальной гибридизации, можно предопределять его генетический результат.

Выделение, культивирование и слияние изолированных протопластов. Для применения методов соматической гибридизации необходима разработка соответствующих технологий получения протопластов, способных делиться и регенерировать растения. Выделение протопластов растительных клеток путем их плазмолизирования и механического разрушения клеточной стенки было осуществлено еще в конце XIX в., а в 1909 г. Э. Кюстер наблюдал слияние таких протопластов. Однако метод изолированных протопластов получил развитие лишь после того, как И. К. Коккинг (1960) впервые осуществил ферментативное разрушение клеточной стенки и выделил голые протопласты (рис. 5.1), а в 1970 г. он добился индуцированного слияния протопластов за счет применения в качестве индуктора нитрата натрия. Разработанная методика оказалась малоэффективной и сейчас имеет лишь историческое значение.

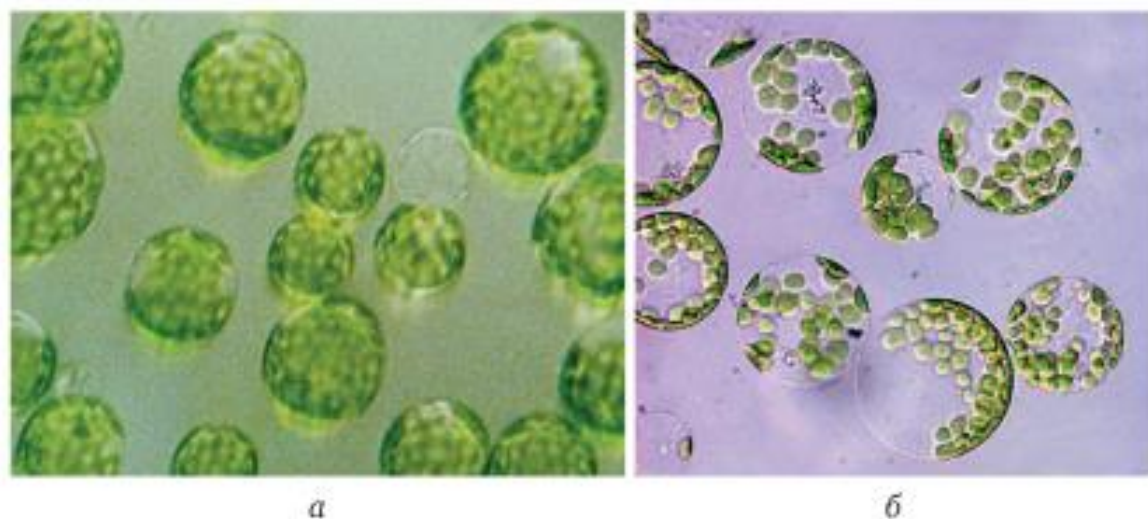


Рис. 5.1. Изолированные протопласты, полученные:
а — из семядольной хвои сосны обыкновенной;
б — из листовой пластинки табака

Для культивирования протопластов применяют те же питательные среды, что и для культуры изолированных клеток и тканей. Наиболее часто используются следующие основные среды: 1) модифицированная среда Мурасиге и Скуга; 2) среда Гамборга (B_5), состав которой ранее был разработан для суспензионных культур сои. Однако данная среда оказалась пригодной для протопластов целого ряда видов растений, особенно для калусных протопластов; 3) среда 8Р, представляющая собой сильно обогащенную витаминами, аминокислотами и сахарами среду Гамборга. Отличительной чертой всех сред для протопластов является отсутствие агара

в питательной среде, а также повышенное осмотическое давление на начальных этапах культивирования. В качестве осмотиков обычно используют сахара: глюкозу, маннитол, сорбитол, сахарозу и ксилозу, иногда сочетание двух различных сахаров, а также CaCl_2 .

Одним из технических условий при культивировании протопластов большинства видов является обеспечение определенной плотности высева клеток. В большинстве случаев эта величина составляет 10^4 — 10^5 кл/мл, а объем культуры — 2,5—10 мл.

В процессе культивирования изолированные протопласты регенерируют новую клеточную стенку (через 48 ч с момента выделения протопластов) и превращаются в обычные клетки, способные делиться и давать начало образованию каллусной ткани (рис. 5.2).

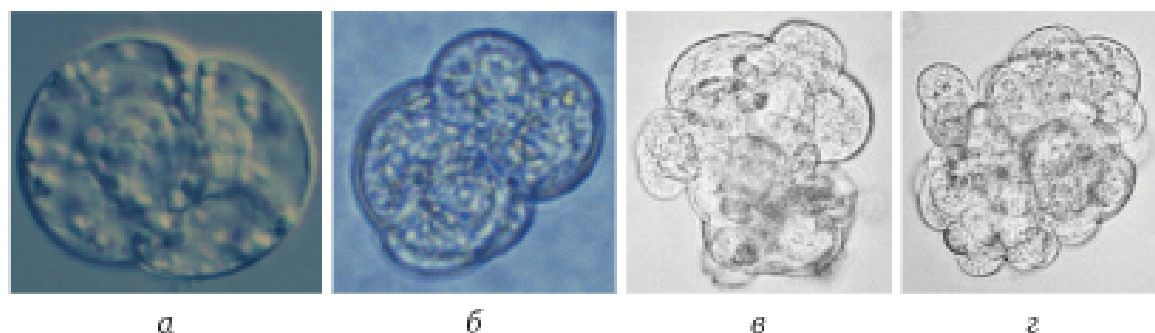


Рис. 5.2. Слияние протопластов и формирование каллусной ткани:

а — слияние протопластов; б — деление гибридной клетки;
в — формирование микрокаллуса; г — формирование каллусной ткани

Протопласты выделяют из каллусных, суспензионных клеток или из клеток листьев, меристем, стеблей. При выделении протопластов из листьев сначала удаляют эпидермис, лист нарезают на сегменты и затем подвергают энзиматической обработке пектиназой и целлюлазой (рис. 5.3).

Слияние изолированных протопластов может происходить спонтанно, но довольно редко. Индуцированное слияние изолированных протопластов впервые было получено в лаборатории Э. Коккинга в 1970 г. В качестве индуктора ученые использовали нитрат натрия. Однако этот метод оказался малоэффективным, и сейчас найдены другие фьюзогены (индукторы слияния). Наиболее эффективными из них оказались растворы с высоким рН (9—11) и высокой концентрацией ионов кальция (100—300 мМ). Протопласты предварительно агглютинируют с помощью концентрированных растворов полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500—6000 М. Методика «полиэтиленгликоль — высокий рН — высокая концентрация Ca^{2+} » хорошо себя зарекомендовала и в различных модификациях используется в большинстве биотехнологических лабораториях. Применяя эту обработку, удастся вовлечь в слияние до 10—50 % протопластов. Однако данный метод имеет недостатки: 1) сравнительно высокая

летальность обработки (чем выше эффективность слияния, тем сильнее повреждаются клетки); 2) высокая частота образования многоядерных продуктов слияния, которые в большинстве случаев нежизнеспособны. Кроме того, даже неслившиеся клетки после обработки часто остаются слипшимися, что мешает в дальнейшем вести количественный учет событий гибридизации.



Рис. 5.3. Схема получения и культивирования протопластов

Частота слияния протопластов, вероятно, не зависит от видовой принадлежности протопластов — компонентов системы. Значительно большее влияние на процесс слияния оказывает не только внешние факторы, но и ультраструктурная организация (тканевая принадлежность) клеток. Например, меристемные и каллусные протопласты очень легко заставить сливаться; значительно труднее этот процесс происходит у сильно вакуолизированных клеток и клеток с развитыми хлоропластами (в частности, трудно индуцировать слияние мезофильных протопластов).

У. Циммерман с сотрудниками разработали физический метод слияния протопластов животных клеток, липосом, в котором в качестве индуктора использовались импульсы электрического тока.

Слияние протопластов приводит к образованию либо гибрида, либо цибрида (рис. 5.4)¹. Цибридная клетка содержит цитоплазму обоих партнеров, а ядро — одного. Это возможно в том случае, когда после слияния протопластов не происходит соединения ядер и одно ядро дегенерирует. Образование цибрида возможно и в том случае, если один из протопластов лишен ядра или оно инактивировано путем облучения.

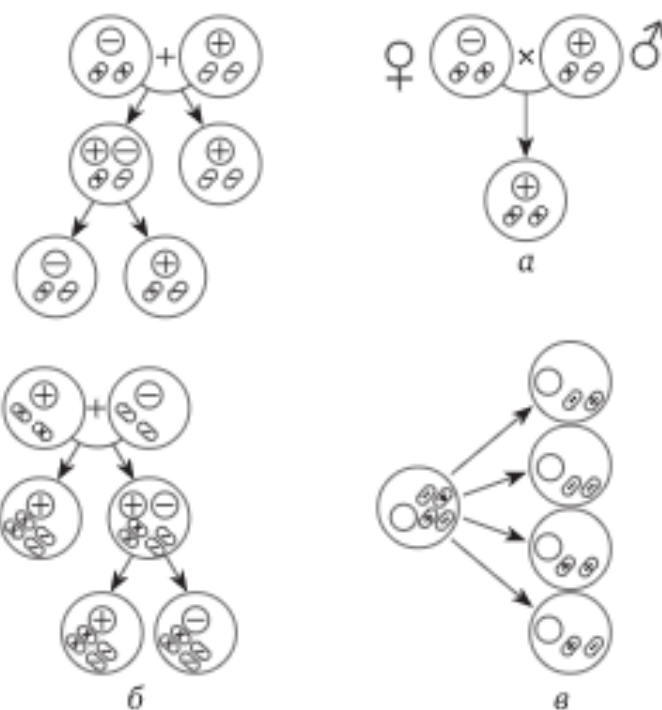


Рис. 5.4. Схемы, иллюстрирующие наследование при парасексуальной гибридизации: а — родительских ядерных (кружок) и внеядерных (овал) детерминант при парасексуальной (слева) и половой (справа) гибридизациях; б — при парасексуальной гибридизации с учетом как минимум двух независимых внеядерных генофоров; в — генетическое разнообразие парасексуальных потомков, возникающее дополнительно к цитоплазматическим гетерозиготам вследствие соматической сегрегации внеядерных генофоров

¹ Глеба Ю. Ю., Сытник К. М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений : монография. Киев : Наукова думка, 1982.

Цибридизация позволяет ввести цитоплазматические гены, несущие признаки ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности), устойчивости к некоторым гербицидам и патогенам.

Описаны гибриды между протопластами эритроцитов крысы и протопластами дрожжевых клеток, между протопластами моркови и человека, табака и человека и др.

Первый неполовой межвидовой гибрид высших растений получен в 1972 г. путем слияния изолированных протопластов двух видов табака: *Nicotiana glauca* и *N. langsdorfii*. В 1978 г. Г. Мельхерс предпринял попытку получить парасексуальный гибрид между картофелем и томатом. В этих экспериментах протопласты, полученные из каллусной ткани дигаплоидного картофеля сливали с мезофильными протопластами хлорофильного мутанта томата типа *Aurea* с помощью стандартной методики «ПЭГ — высокий pH — высокое Ca^{2+} ». В конкретных условиях культуры мезофильные протопласты томата также делились, однако их каллусные ткани не были способны к регенерации побегов. Среди большого количества зеленых регенерантов картофеля были обнаружены четыре морфологически ненормальные формы, несущие ряд признаков обоих родителей (форма листа, окраска цветков). Хромосомный анализ показал, что три растения из полученных имеют гиперамфиплоидное число хромосом (50—56 вместо 48), в то время как один гибрид имеет около 72 хромосом. Различить морфологически хромосомы картофеля и томата оказалось невозможно. При анализе полипептидов белка Фракция 1 в малой субъединице установлены полипептиды и типа картофеля, и типа томата. Большая субъединица (хлоропластные гены) в трех из четырех растений состояла из полипептидов типа томата, а у высокохромосомной формы обнаружены хлоропласты картофеля. Полученные гибриды были аномальными в отношении морфологии (махровые цветки, утолщенные корни, отсутствие выраженных столонов) и предположительно стерильными, что можно объяснить и их анэуплоидной природой, а не гибридностью. Здесь уместно вспомнить, что когда 40 лет назад Э. Кокинг описывал радужные надежды тех, кто надеялся получать гибриды с помощью слияния протопластов, он нарисовал томатофель — гибрид картофеля и томата — растение, ветви которого свисали под тяжестью томатов, а к столонам были прикреплены внушительного размера клубни. Есть, видимо, некая ирония в том, что у первого настоящего парасексуального гибрида томат + картофель нет ни «вершков», ни «корешков».

В настоящее время методом парасексуальной гибридизации получено большое число межвидовых, межсемейственных и межтрибных гибридов. Однако во многих случаях гибридные растения, полученные таким путем, в той или иной степени аномальны. Примером может служить соматический гибрид между арабидопсисом

и турнепсом, который является растением-монстром. Возникающие аномалии являются результатом хромосомной несбалансированности.

Для идентификации гибридов могут служить пластиды. Например, при слиянии протопластов табака и моркови в качестве селективных маркеров использовались зеленые хлоропласты табака и красно-оранжевые хромопласты моркови.

Использование изолированных протопластов в селекции растений не ограничивается возможностью их индуцированного слияния и получения соматических гибридов. Изолированные протопласты способны поглощать из окружающей среды макромолекулы и органеллы, следовательно, в них можно вводить чужеродную информацию, не пересаживая ДНК или органеллы других клеток. Уже проведена успешная трансплантация изолированных ядер в протопласты петунии и табака. Вместе с тем поглощение протопластами чужеродных ядер не всегда ведет к образованию гибридов. Кроме ядер в изолированные протопласты удалось трансплантировать чужеродные хлоропласты. Из этих протопластов А. Карлсон получил растения-регенеранты, содержащие хлоропласты другого организма.

В целом, как видим, использование изолированных протопластов в генетической реконструкции клетки открывает перспективы перед клеточной селекцией.

Контрольные вопросы

1. Что такое изолированный протопласт?
2. Кто впервые выделил изолированные протопласты? Из какого объекта?
3. На чем основывается метод соматической гибридизации?
4. Какие ферменты и осмотики применяют для изолирования протопластов?
5. Из каких растительных объектов можно получить протопласты?
6. Какие условия и питательные среды применяют для культивирования изолированных протопластов?
7. Через сколько часов восстанавливается клеточная стенка у протопласта?
8. Какое практическое применение имеет метод соматической гибридизации?

Глава 20

КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К АБИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

В естественных условиях высшие растения, как и другие живые организмы, подвергаются многочисленным стрессам. Стрессовым может быть любой внешний фактор, вызывающий у растений химические и физические изменения, которые оказывают негативное влияние на их рост и развитие, а также приводят к снижению продуктивности и качества урожая сельскохозяйственных культур.

Устойчивость растений к стрессовым факторам внешней среды является предметом интенсивного изучения физиологов, биохимиков, генетиков, и привлекает все большее внимание клеточных и молекулярных биологов.

Клеточная селекция растений *in vitro* — метод выделения генетически модифицированных мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий. Значительный интерес представляет вопрос об использовании клеточной селекции в комплексе с получением соматоклонов. Одна из наиболее сильных сторон культуры *in vitro* в создании технологий для сельского хозяйства — возможность на основе соматоклональных вариаций или индуцированных мутаций отбирать в жестких селективных условиях клетки, характеризующиеся искомыми признаками.

Для проведения клеточной селекции используют следующие приемы:

- прямая (позитивная) селекция, при которой выживает лишь определенный искомый мутантный тип клеток;
- непрямая (негативная) селекция, основанная на избирательной гибели неустойчивых делящихся клеток, но требующая дополнительной идентификации у них мутационных изменений;
- тотальная селекция, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны;
- визуальная селекция и неселективный отбор, когда вариантная линия может быть идентифицирована среди всей популяции клеток визуально или при использовании биохимических методов (тонкослойная или жидкостная хроматография, радиоиммунный анализ, микроспектрофотометрия и др.).

20.1. Исходный объект для селекции *in vitro*

Из перечисленных выше приемов клеточной селекции прямая селекция является наиболее распространенным методом и используется главным образом для выделения растений-регенерантов, устойчивых, например, к гербицидам, антибиотикам, токсинам, тяжелым металлам, солям и другим антиметаболитам.

Для проведения работ по клеточной селекции растений в условиях *in vitro* в качестве объекта исследования могут быть использованы каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты. Выбор объекта зависит от наличия разработанных технологий применительно к различным видам растений, а также от конечных целей исследования.

Каллусная ткань представляет собой легкодоступный материал, который наиболее часто используют для клеточной селекции. Как правило, работу проводят на первичной или пересадочной каллусной ткани, которая не утрачивает способности к регенерации на протяжении ряда субкультивирований. Однако при работе с каллусными культурами многие исследователи отмечают существенные недостатки данного объекта: медленный рост ткани, неравноценное для всех клеток действие токсических веществ, которые применяются в качестве селективного фактора, а также потеря регенерационной способности в процессе культивирования каллусных клеток. Несомненно, проводить селекцию целесообразно на уровне одиночных клеток (суспензионная культура, протопласты). Однако для многих видов растений не разработаны эффективные технологии и способы культивирования одиночных клеток. Поэтому несмотря на перечисленные выше недостатки использования каллусных культур этот способ селекции остается для некоторых видов растений пока единственным.

Получение стабильно устойчивых линий — процесс длительный. Как правило, селекция начинается с получения достаточного количества каллусной массы из изолированных растительных эксплантов, использующейся в дальнейшем для определения концентрации селективного фактора (построение дозовой кривой), при которой наблюдается одновременно рост каллусной ткани, и в то же время часть каллусных колоний погибает. Выбранная концентрация селективного фактора признается оптимальной и используется в дальнейших экспериментах. Поскольку первично полученные на средах с селективными факторами колонии клеток могли возникнуть вследствие физиологической адаптации или определенного состояния дифференцировки клеток и не быть генетически устойчивыми, в течение последующих 4—6 субкультивирований на селективной среде проверяется стабильность устойчивости полученных клонов. Затем их переносят на среду без селективного фак-

тора и субкультивируют еще 2—3 пассажа (рис. 5.5). Только после повторного возвращения в селективные условия отбирают стабильные клоны, из которых пытаются получить растения-регенеранты. Однако работы, проведенные с получением растений, устойчивых к повышенным солям, а также к токсинам, выделенным из грибов — возбудителей болезней, показали, что устойчивость клетки и растения к исследуемому селективному фактору может как совпадать, так и не совпадать. Прямая корреляция между устойчивостью растений и клеток *in vitro* отмечена лишь для низких температур, устойчивостью к гербицидам, высоким концентрациям алюминия и другим факторам.

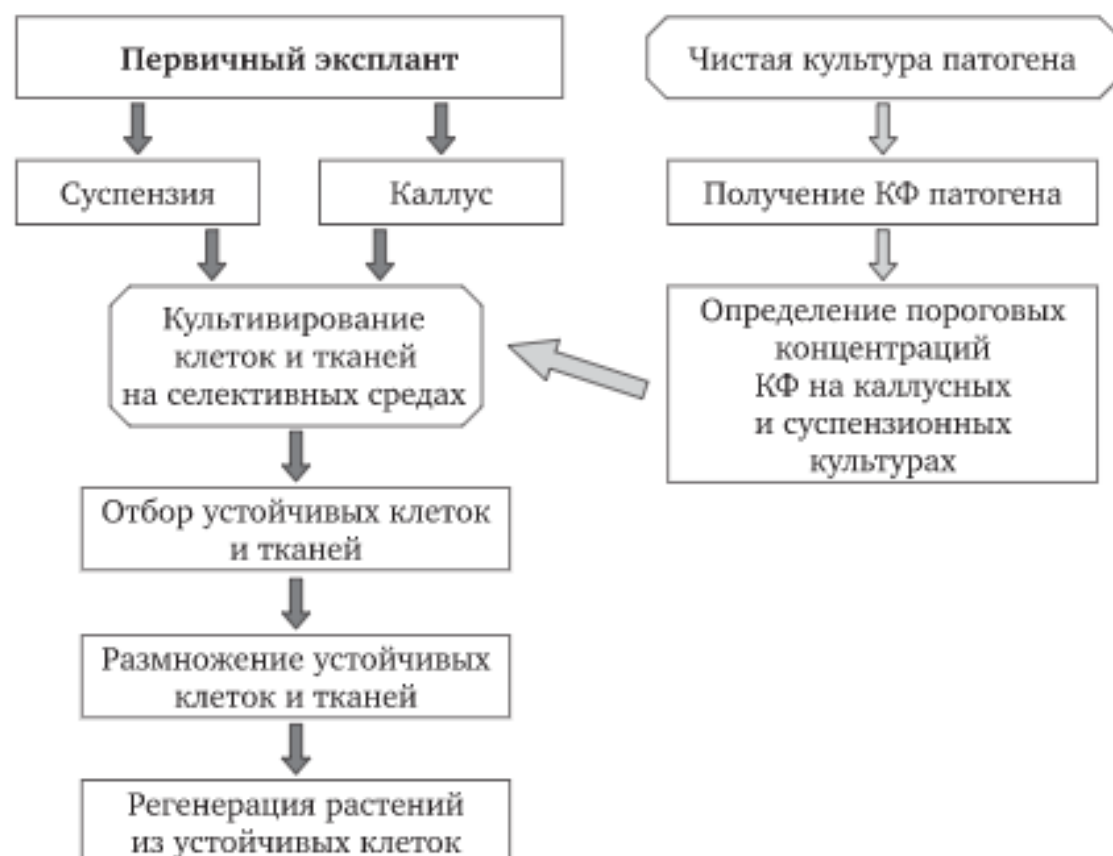


Рис. 5.5. Схема клеточной селекции растений *in vitro*

Большое число работ по культивированию каллуса с целью получения нового селекционного материала проведено на пшенице, ячмене, рисе, сорго, а также на картофеле, томатах, люцерне и, крайне редко, на древесных. Уже достигнуты первые положительные результаты по получению растений пшеницы, риса, картофеля, устойчивых к NaCl. Получены клетки, а из них растения моркови, которые синтезируют в 20 раз больше метионина, в 30 раз — триптофана, в 5 раз — лизина путем добавления в питательную среду токсичных аналогов аминокислот. Для картофеля получены растения, устойчивые к кольцевой гнили. Что касается древесных, то для них работы в этом направлении крайне редки и часто име-

ют поисковый характер. Таким образом, использование каллусной культуры в селекционных целях открывает огромные возможности в создании новых форм растений, несущих ценные признаки, необходимые для человечества.

Наряду с перечисленными выше объектами (калусная, суспензионная культура, изолированные протопласты) в качестве исходного материала для селекции могут быть использованы культуры соматических или андрогенных эмбриоидов — такие органогенные экспланты, как сегменты листьев или различные меристематические и стеблевые части растений, а также культура изолированных зародышей. Например, путем культивирования и селекции *in vitro* зародышей из семян получены растения ячменя, устойчивые к аналогам аминокислот, с улучшенным содержанием белка. Для картофеля разработан эффективный метод обработки побегов и черенков мутагеном, приводивший к получению химерных мутантов хлорофилдефектности и антибиотикоустойчивости. При культивировании пыльников яровой пшеницы сорта Саратовская 29 и Московская 35, на питательных средах с повышенным содержанием солей хлорида натрия, получены соматические эмбриониды, а в дальнейшем — растения-регенеранты, проявившие повышенную солеустойчивость.

Таким образом, проведение селекции на клеточном уровне позволяет создавать новые формы растений в 2—4 раза быстрее по сравнению с традиционными способами селекции.

20.2. Получение растений-регенерантов *in vitro*, устойчивых к абиотическим факторам окружающей среды

Засуха. Недостаток воды в почве наносит значительно больший урон растениеводству, чем все остальные стрессовые факторы, вместе взятые. Засуха приводит к возникновению водного дефицита в почве и соответственно в растениях, вызывая у них водный стресс. Хотя термин «засуха» относится главным образом к почвенному водному стрессу, он включает также воздействие жары на растения. Стресс, вызванный водным дефицитом, может быть первичным в случае засухи, а также вторичным при низкотемпературном, тепловом или солевом стрессах. Стресс, вызванный засухой, ведет к прямым или косвенным повреждениям растений, которые обусловлены инактивацией ферментов, нарушением биохимических путей, накоплением токсических веществ, утечкой ионов, дефицитом питания и другими причинами.

С целью имитации *in vitro* стрессового эффекта засухи могут применяться питательные среды, которые дополнены осмотически активными веществами, понижающими внешний водный потенциал.

В качестве такого селективного агента для селекции на устойчивость к засухе был использован ПЭГ, представляющий собой не проникающее в клетку осмотически активное вещество. Первое сообщение о выделении клеточных линий табака, устойчивых к стрессу, индуцированному ПЭГ, появилось в 1979 г. Позже для селекции на засухоустойчивость Р. Брессан с соавторами использовали клеточные линии томата, которые подвергались водному стрессу при культивировании каллусной ткани в присутствии ПЭГ 6000 в концентрации 15 %. В результате опытов были отобраны устойчивые каллусные линии. Однако их устойчивость быстро уменьшалась при культивировании каллуса на среде без осмотика, что указывает на физиологическую природу адаптации. Предложено тестирование каллусных линий на рост в присутствии ПЭГ для идентификации выносливых к засухе генотипов сои. Анализ роста каллусных тканей 10 сортов сои на средах с 0, 15, 20 % ПЭГ 8000 свидетельствовал о корреляции засухоустойчивости у растений и толерантности к ПЭГ культивируемых клеток. Для получения адаптированных к водному стрессу клеточных линий также применяли среды, содержащие в качестве осмотика маннитол (99—880 мМ). Как и в предыдущем случае, осмотически адаптированные клетки обладали повышенной выносливостью к солевому стрессу.

Засоление. Одним из лимитирующих факторов сельскохозяйственной продуктивности является засоление почв. Около 900 млн га всех земель нашей планеты имеют повышенное содержание солей, а количество засоленных почв с каждым годом возрастает. Особую тревогу вызывает увеличение в почвах содержания солей, которое происходит в результате их искусственного орошения. Решение данной проблемы во многом зависит от разработки рациональных агротехнических приемов, правильной методологии орошения, использования для полива частично или полностью обессоленной воды. С развитием биотехнологии растений потенциально возможным является получение солевыносливых генотипов у важных сельскохозяйственных культур путем селекции на уровне соматических клеток, слияния протопластов или переноса генов при использовании техники рекомбинантных молекул ДНК.

Вредное действие засоления имеет комплексный характер и обусловлено как нарушением осмотического баланса клетки, так и прямым токсическим влиянием ионов натрия, хлора на физиологические и биохимические процессы в клетке. Результатом такого действия может быть уменьшение тургора клетки, ингибирование функции мембран и активности ферментов, подавление фотосинтеза, нехватки отдельных ионов из-за нарушения селективного транспорта ионов, использование значительного количества энергии для поддержания толерантности. Основные типы реакций растений, возникающие в ответ на повышение концентрации солей во внешней среде, представлены на рис. 5.6.



Рис. 5.6. Основные типы ответных реакций растений на засоление

Экспериментальные данные, полученные многими учеными, показывают, что клеточные механизмы выносливости к засолению являются сходными для культивируемых *in vitro* клеток и целых растений и что селекция на клеточном уровне представляет реальную перспективу получения устойчивых к засолению форм растений.

Большинство селекционных программ направлены на выделение *in vitro* клеточных линий, толерантных к присутствию в среде для культивирования клеток хлорида натрия. Так, показано, что, выращивая гаплоидные каллусные клетки табака на среде с постоянно увеличивающейся концентрацией солей, получены клеточные линии, способные к росту в присутствии 1 % NaCl. М. Наборе с соавторами, предварительно обработав суспензионную культуру табака мутагеном (0,15 % этилметансульфоната (ЭМС), 60 мин), путем одноступенчатой селекции выделили клеточные линии, устойчивые к 0,5 % NaCl. Отмечено, что выносливость, полученных регенерантов к засолению, проявлялась на уровне целых растений.

На кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева проводились исследования по получению солеустойчивых растений на примере яровых твердых и мягких пшениц. Первичным эксплантом служили как изолированные незрелые зародыши, так и репродуктивные органы. Клеточную селекцию

проводили на каллусной ткани, культивируемой на питательной среде, содержащей 0,3 % NaCl или Na₂SO₄ в течение 5—6 пассажей. В результате исследований были получены устойчивые клеточные линии, а также растения-регенеранты. Тестирование на солеустойчивость первого семенного поколения растений-регенерантов методом регистрации замедленной флуоресценции показало, что фотосинтетический аппарат некоторых растений-регенерантов по устойчивости к засолению превосходит исходный сорт. Другие примеры выделения клеточных линий, устойчивых к различным концентрациям хлорида натрия, и регенерации из них растений, сохраняющих толерантность к соли, представлены в табл. 5.1.

Таблица 5.1

**Примеры солевыносливых клеточных линий и растений,
полученных через культуру клеток**

Исходный материал для селекции (плоидность)	Концентрация NaCl	Результаты клеточной селекции
<i>Medicago sativa</i> (2n)	0,17 М	Каллус
<i>Citrus sinensis</i> (2n)	0,08—0,17 М	Каллус
<i>Nicotiana tabacum</i> (2n)	0,17 М	Суспензия, растения
<i>Datura innoxia</i> (2n)	0,17—0,34 М	Каллус, растения
<i>Pennisetum americanum</i> (2n)	0,19 М	Эмбриогенная суспензия
<i>Ipomoea batatas</i> (2n)	0,17 М	Суспензия
<i>Crepis capillaris</i> (2n)	0,12 М	Суспензия
<i>Oryza sativa</i> (2n)	0,17 М	Эмбриогенный каллус, растения

Солевыносливость растений также удастся повысить в результате селекции к одному фактору засоления осмотическому стрессу. Например, клетки томата, адаптированные к водному стрессу, индуцированному ПЭГ, обладали повышенной устойчивостью к NaCl. Повышенная толерантность к соли обнаружена у клеточных линий моркови, отобранных на среде, содержащей в качестве осмотика маннитол в высокой концентрации (99—870 мМ). Из этих результатов следует, что адаптация клеток к осмотическому стрессу применима для отбора солевыносливых вариантов, а исследования подобного рода представляют интерес для изучения как во взаимодействии, так и независимо друг от друга.

Металлы. Присутствие в почве в большом количестве ионов металлов, токсически влияющих на растения, или недостаток ионов, используемых растениями в качестве питательных веществ, могут быть причиной ионного (минерального) стресса у растений. Особое внимание ученых привлекает изучение стрессов, обусловленных на-

личием в почве ионов тяжелых металлов, многие из которых токсически влияют как на растительные, так и на животные организмы. Стрессовое состояние у растений может быть индуцировано ионами таких тяжелых металлов, как цинк, кадмий, медь, ртуть; они также довольно часто встречаются и в почвах. Среди них одним из самых опасных экотоксикантов, проявляющих токсические свойства уже при низких концентрациях, является кадмий. В отличие от других тяжелых металлов, он присутствует в почвенном растворе в основном в виде катиона (Cd^{2+}). Однако при нейтральной реакции могут образовываться и его труднорастворимые комплексы с сульфатами, фосфатами и гидроксидами.

Кадмий характеризуется высокой подвижностью, активно переходит из твердой фазы почвы в жидкую и обратно, что затрудняет прогнозирование его поступления в растения. Этот тяжелый металл преимущественно накапливается в корнях, в репродуктивных же органах (семенах и плодах) его содержание обычно низкое. Однако такая тенденция наблюдается не всегда.

Известно, что в ответ на поступление тяжелых металлов в растения активируются защитные системы, запуская процессы детоксикации, а их эффективность определяет возможность гипераккумуляции и устойчивости к избытку тяжелых металлов. Помимо процессов детоксикации, активирующихся при воздействии металла, клетки растений обладают способностью к синтезу специфических веществ, участвующих в защитных реакциях клетки в стрессовых условиях. К ним относятся распространенные представители вторичного метаболизма — фенольные соединения.

Исследования, проведенные на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К. А. Тимирязева с культурой льна, показали, что присутствие ионов кадмия в почве приводит к торможению роста стеблевой и корневой частей растения, к сокращению на 7—9 суток онтогенетических фаз развития, следующих за фазой «елочки» по сравнению с контролем, культурные виды накапливают ионы кадмия в вегетативной массе, в то время как дикие — нет. Кроме того присутствие кадмия в почвенном субстрате оказало негативное влияние на анатомическое строение стебля льна-долгунца. Мезо- и ультраструктурный анализ стеблей льна-долгунца показал, что присутствие кадмия в субстрате приводило к уменьшению количества клеток элементарных волокон в пучке, к некомпактному расположению клеток элементарных волокон в лубяных пучках, а также к формированию клеток элементарных волокон неодинаковых размеров в пределах одного пучка и к различным срокам формирования вторичной клеточной стенки. Например, в лубяных пучках контрольных растений льна сорта Псковский 359 и Смоленский клетки элементарных волокон располагались в 2—4 слоя, плотно примыкая, друг к другу (рис. 5.7).

Их размер в среднем составлял 20,55 мкм, а толщина клеточной стенки — 6,16 мкм. При воздействии металла объем лубяного пучка у изучаемых сортов изменялся, что выражалось как в уменьшении числа клеток элементарных волокон, так и в изменении их размеров (от 12 до 30 мкм в пределах одного пучка). При этом средние размеры клеток элементарных волокон составляли 19,28 мкм при толщине клеточной стенки 6,61 мкм.

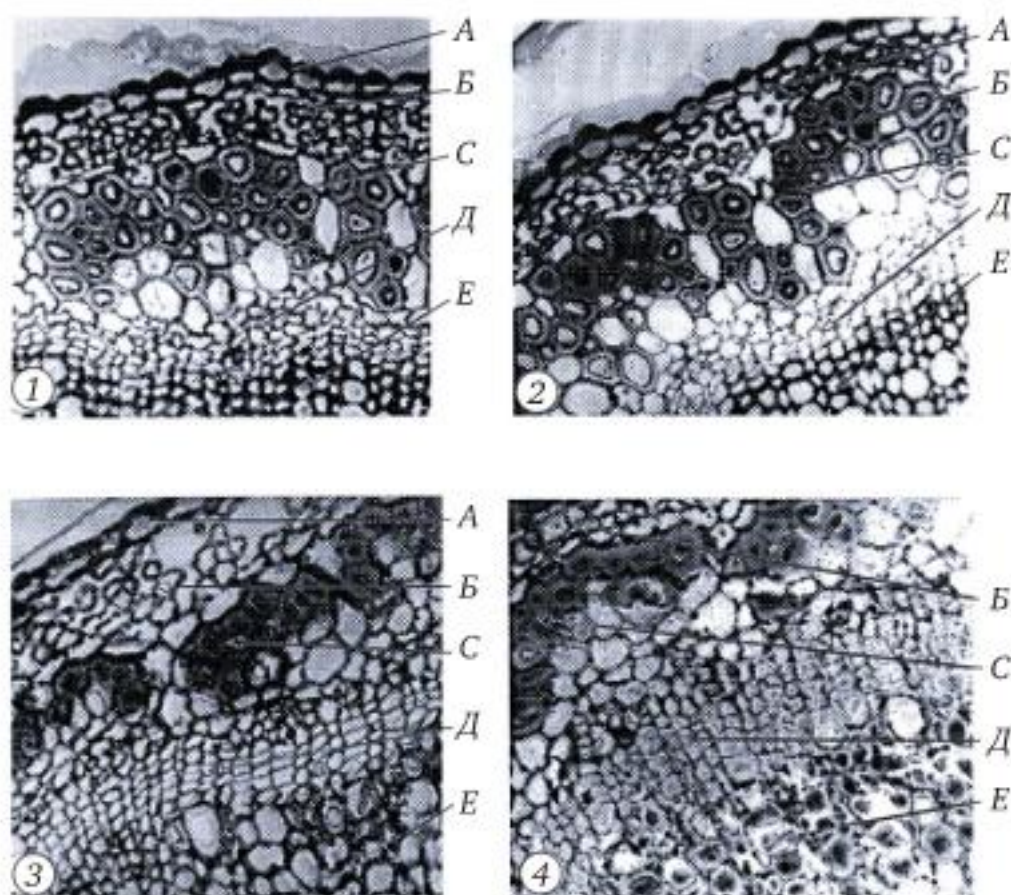


Рис. 5.7. Мезоструктура срединной части стебля льна-долгунца сорта Смоленский (фаза быстрого роста, увеличение $\times 40$):

1, 2 — контроль; 3, 4 — опыт; А — однослойный эпидермис; В — коровая паренхима, С — клетки эпидермальных волокон лубяного пучка; Д — флоэма; Е — ксилема

Работы по клеточной селекции растений на устойчивость к ионным стрессам начаты недавно, но уже имеют положительный результат. Во всех экспериментах используется метод прямой селекции, при котором в качестве селективного агента применяли токсические концентрации солей. Однако создание стрессовых селективных условий *in vitro*, идентичных таковым в природе, крайне затруднительно. В природных условиях помимо токсического действия ионов накладываются другие факторы, в частности наличие различных веществ, кислотность почвы и т. д. Для селекции на клеточном уровне используют питательные среды, которые хотя не полностью соответствовали естественным стрессовым условиям,

все же обеспечивали экспрессию признака устойчивости и давали возможность отбирать нужные варианты.

Путем прямой селекции *in vitro* отобраны клеточные линии петунии, устойчивые к ртути, сорго — к алюминию, моркови — к алюминию и марганцу одновременно; суспензионные клеточные культуры дурмана — к кадмию. На кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА также были проведены работы по получению клеточных линий и растений-регенерантов льна-долгунца, устойчивых к соли нитрата кадмия. В результате клеточной селекции были получены растения-регенеранты, обладающие устойчивостью к данной соли.

Экстремальные температуры. Причиной стрессового фактора у растений могут быть относительно высокие или низкие температуры. Работ по клеточной селекции на устойчивость к этим стрессам немного. Работы по клеточной селекции к тепловому шоку малочисленны, хотя белки теплового шока являются предметом пристального изучения биологов различного профиля. Что касается работ по клеточной селекции к низкотемпературным факторам, то они имеются.

Холодовой стресс у растений может быть вызван температурами большого диапазона: от 10—15 до 0 °C. Такому стрессу наиболее подвержены растения тропических и субтропических зон. Стойкость растений к охлаждению обусловлена способностью липидов мембран оставаться в жидком состоянии благодаря наличию большой пропорции ненасыщенных жирных кислот и (или) повышенного содержания стеролов. Повреждения, вызванные промораживанием растений (температура ниже 0 °C), связаны, прежде всего, с формированием внеклеточного льда. При этом отток воды во внеклеточное пространство приводит к вторичному эффекту, вызванному водным стрессом. Нарушения, вызываемые отрицательными температурами, могут быть предотвращены аккумуляцией антифризных веществ, уменьшением количества несвязанной воды при обезвоживании и увеличением способности переохлаждаться. Большинство авторов отмечают, что у растений происходят глубокие превращения запасных питательных веществ, в частности у морозоустойчивых древесных растений накопление большого количества жиров, а у менее устойчивых — сахаров.

Первые эксперименты, в которых описана возможность использования культивируемых растительных клеток для отбора выносливых к низким температурам клеточных линий, опубликованы в 1976 г. Работы были проведены на суспензионных культурах табака и перца, которые после посева на агаризованные среды подвергались в течение 21 суток соответственно температурам 3 и 4 °C. Среди отобранных клонов обнаружены линии, стабильно сохраняющие повышенную холодоустойчивость.

Основываясь на имеющихся в этой области исследований данных, однозначный ответ о применимости прямой селекции *in vitro* растений, выносливых к низкой температуре, давать пока рано. Несомненно, однако, что индукция *in vitro* генетического разнообразия найдет применение для отбора более выносливых вариантов.

Ультрафиолетовое излучение. Воздействие УФ радиации на растительные объекты привлекает пристальное внимание ученых в связи с усиливающимся антропогенным влиянием на атмосферу и ухудшением состояния озонового слоя, который защищает землю от губительного действия УФ радиации. В результате уменьшения озонового слоя на поверхности земли увеличивается уровень излучения в диапазоне длин волн от 280 до 320 нм. Это излучение лежит в УФ области спектра и относится к его «среднему», или «Б»-участку. Это излучение обозначается как УФ-Б (UV-B). Ультрафиолетовая радиация является мощным стрессовым фактором для живых систем, так как вызывает разнообразные фотохимические превращения. Все живые организмы и растения чувствительны к ультрафиолетовому облучению и реагируют на УФ радиацию. Ультрафиолет не только индуцирует прямые повреждения ДНК, но и вызывает окислительный стресс, в результате которого образуются радикалы, вызывающие повреждения всех структур и молекул клетки. Все химические компартменты могут быть мишенью для ультрафиолета, что влечет за собой физиологические нарушения и анатомические изменения. Нарушения в ДНК могут быть причиной повышенного уровня мутаций, и это может негативно сказываться на сохранении генофонда живых организмов.

Устойчивость к УФ излучению, которое обладает слабой проникающей способностью, может быть обусловлена абсорбцией падающей радиации эпидермальными клетками, морфологическим строением растений, которое предохраняет чувствительные клетки, механизмами фоторепарации. Значительную роль в защите растений от УФ играет аккумуляция в вакуоли клетки флавоноидов, абсорбирующих значительную часть УФ радиации. Образование и накопление флавоноидов наблюдалось при обработке УФ как растений, так и неорганизованно растущих тканей. Например, обнаружено, что облучение УФ протопластов петрушки стимулировало весь фенилпропаноидный биохимический путь, а именно индуцировало координированное увеличение синтеза фенилаланинаммияклизы (ФАЛ).

Несмотря на возрастающий интерес к исследованию культивируемых растительных клеток для изучения клеточных механизмов устойчивости в доступной нам литературе обнаружено лишь несколько сообщений о получении *in vitro* клеточных культур, устойчивых к облучению УФ. Для выделения устойчивых к УФ линий использовали суспензионные и каллусные культуры, которые под-

вергали облучению дозой 250 Дж/м². Колонии, обнаруженные при высеве облученных клеток, сохраняли устойчивость при повторных тестированиях. Устойчивые клетки были в 2,2—2,8 раза больше в размере и имели вдвое увеличенное содержание ДНК. На поздних стадиях культивирования устойчивые клетки накапливали большие количества фенольных соединений, особенно флавоноидов. Так, на 10-е сутки устойчивые клетки содержали в 4 раза больше нефлавоноидных полифенолов и в 14 раз больше флавоноидов, чем родительские клетки. Данный метод клеточной селекции на устойчивость к УФ облучению авторы рассматривают как новый способ селекции *in vitro* клеточных линий и растений, различающихся по продукции флавоноидов.

Работы, проведенные в Институте физиологии растений РАН на яровой мягкой пшенице *T. aestivum* сорта Таежная и линии Фотос, показали, что УФ-Б радиация вызывает изменения в морфофизиологических (размеры клеток, параметры клеточной стенки) и биохимических (содержание фенольных соединений, лигнина, изменения в балансе аминокислот) характеристиках каллусных культур. Установлена зависимость роста клеточных культур пшеницы от интенсивности и длительности воздействия УФ-Б радиации, а также от генотипа исходного экспланта. В результате клеточной селекции *in vitro* получены клеточные культуры пшеницы, сохраняющие способность к неорганизованному росту в присутствии УФ-Б радиации в течение длительного культивирования в стрессовых условиях.

20.3. Особенности мутагенеза и селекции мутантов в условиях *in vitro*

В настоящее время накоплены обширные экспериментальные сведения о мутагенной активности различных химических веществ, а также ионизирующих (рентгеновское излучение и гамма-лучи) и УФ излучений. Например, из химических мутагенов наиболее часто используют ЭМС. После обработки им клеток растений табака получено 25 фенотипических вариантов. Однако имеются данные, свидетельствующие о незначительном мутагенном эффекте ЭМС. Другой мутаген, заслуживающий внимания при работе с клеточными культурами, N-этил-N-нитрозомочевина (НЭМ). Данное химическое соединение нестабильно, быстро разрушается в питательной среде и может применяться для обработки клеток без последующей его отмывки. Эффективное мутагенное действие НЭМ продемонстрировано на суспензионной культуре гаплоидного табака, что позволило выделить мутанты, дефектные по нитратредуктазе. Обработка НЭМ гаплоидных протопластов табака увеличивала частоту возникновения хлоратустойчивых клонов в 20 раз, в то вре-

мя как при мутагенезе диплоидных протопластов этого же вида появление стрептомицинустойчивых клонов возросло в 30 раз. В качестве мутагенов могут быть использованы также N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ) и N-нитрозометилмочевина (НММ).

Наиболее широкий спектр мутаций наблюдается при использовании в качестве мутагена ионизирующего излучения. При рентгеновском облучении клеток получены пигментдефектные линии дурмана и петунии, устойчивые к параквату линии табака. Гамма-облученные растения (лист) служили источником каллусной ткани и протопластов, из которых были выделены линии, устойчивые к гербициду и валину. Устойчивые линии к валину были получены и при обработке культивируемых *in vitro* клеток табака УФ лучами. Применение такого способа облучения гаплоидных протопластов табака приводило к возникновению разнообразных ауксотрофных мутантов.

Выживаемость клеточных колоний может быть различной в зависимости от того, на какой стадии развития культуры применяется обработка мутагеном. При работе с единичными клетками целесообразно проводить обработку их мутагеном до первого деления клеток, так как в другом случае возможно возникновение химерных линий. На изолированных протопластах было показано, что радиочувствительность протопластов зависит от этапов их культивирования. Экспериментально установлено, что облучение протопластов предпочтительнее проводить либо сразу после их выделения, либо на следующий день. Из-за возможного образования в среде под действием ионизирующего излучения токсических для клеток веществ в любом случае желательно отмыть протопласты от среды, в которой проводили облучение.

При работе с химическими мутагенами нередко проявляется их токсическое действие на клетки. Высокий процент летальности при их использовании может приводить к гибели всей популяции клеток, поэтому при работе с химическими мутагенами используют в основном невысокие дозы. При этом иногда мутагенные вещества не отмывают от протопластов и культивируют их в присутствии мутагена. Ионизирующее излучение вызывает меньший токсический эффект. Более того, даже высокие дозы облучения подавляют лишь репродукционную и регенерационную способности клеток, сохраняя, однако, их метаболическую активность.

Контрольные вопросы и задания

1. Что такое клеточная селекция?
2. На каких объектах можно проводить клеточную селекцию?
3. Какие приемы необходимо использовать при проведении клеточной селекции?

4. Какова схема селекции растений *in vitro*?
5. Какие условия необходимы для получения стабильно устойчивых линий клеточных культур?
6. Как вы думаете, при использовании клеточной селекции ускоряется или увеличивается в продолжительности процесс классической селекции?
7. Как можно получить растения, устойчивые к абиотическим факторам окружающей среды? Приведите примеры.
8. В чем преимущества клеточной селекции в условиях *in vitro* по сравнению с классическими методами селекции?

Глава 21

КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БИОТИЧЕСКИМ ФАКТОРАМ

Для увеличения производства продуктов питания экономически важным мероприятием представляется защита растений от болезней и вредителей. Уже сейчас просматриваются реальные перспективы применения клеточной селекции на устойчивость. Если при селекции картофеля на устойчивость к болезням в течение года необходимо в полевых условиях провести оценку от 50 до 100 тыс. семян, то *in vitro* за один прием можно протестировать около 20 млн протопластов, выделенных из 9 г листьев картофеля. Перспективность этого метода показана для томатов, люцерны, ячменя, картофеля. Наиболее эффективна она для тех культур, для которых разработаны методы массовой регенерации растений из клеток и протопластов.

Одним из главных защитных механизмов, лежащих в основе сверхчувствительности растений к патогенам, является *de novo* синтез растениями антимикробных веществ, называемых «фитоалексинами». Защитные реакции у растений, например продукция фитоалексинов, образование белков, связанных с патогенезом, лигнификация, могут быть индуцированы целым рядом веществ биотической или абиотической природы, которые называют *элиситорами*. Абиотическими элиситорами могут быть ионы ртути, полиакриловая и салициловая кислоты. К биотическим элиситорам относятся компоненты клеточных стенок грибов, вещества, присутствующие в культуральных фильтратах.

Для клеточной селекции в качестве селективного агента с успехом используют патотоксины, культуральные фильтраты и непосредственно патогены. В табл. 5.2 приведены некоторые данные по использованию методов клеточной селекции для получения форм растений, устойчивых к биотическим факторам.

**Применение методов клеточной селекции *in vitro* в получении растений,
устойчивых к болезням**

Культура	Болезни	Селективный фактор	Примечание
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Фузариевая кислота	Устойчивые каллусные линии
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Fusarium</i>		Устойчивые регенеранты
<i>Triticum durum</i>	<i>Helminthosporium sativum</i>	Токсин	
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Helminthosporium sativum</i>		
<i>Alpium graveolens</i>	<i>Septoria apicola</i>	Совместное культивирование каллусной ткмни и патогена, КФ	
<i>Licopersicom esculentum</i>	<i>Fusarium</i>	Фузариевая кислота	
<i>Peach</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	КФ	
<i>Triticum aestivum, durum</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>		Устойчивые регенеранты
<i>Medicago sativa</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	КФ, фузариевая кислота	
<i>Nicotiana</i>	<i>Pseudomonas, Alternaria</i>	Токсин	
<i>Brassica napus</i>	<i>Phoma lingam</i>		
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Fusarium</i>	КФ	

21.1. Использование патогенов в клеточной селекции растений на устойчивость к болезням

Наиболее простой подход в селекции *in vitro* на устойчивость к болезням связан с культивированием клеток непосредственно в присутствии патогена. Этот подход может быть особенно полезным, когда мало известно о токсических веществах, ответственных за патогенез, или если патоген не продуцирует токсины. Однако этот способ селекции имеет некоторые сложности в проведении экспериментов. Для правильной схемы селекции прежде всего необхо-

димо знание жизненного цикла патогена. Многие патогены, например грибы, имеют различные стадии жизненного цикла, несколько стадий спороношения, в зависимости от которых могут изменяться выживаемость, рост и эпидемиология. Поэтому необходимо учитывать стадию спороношения, существенным для инфицирования могут быть световой и температурный режимы, относительная влажность, pH, наличие или отсутствие питательных веществ, что сказывается на прорастании спор. Часто стратегия селекции может зависеть от биологии патогена. Например, для инфицирования некротрофами необходим высокий уровень инокулюма, тогда как заражение биотрофами может вызываться отдельными спорами или клетками. Также некротрофы обычно хорошо растут в культуре *in vitro*, а биотрофы плохо, так как большинство из них облигатные паразиты. Для многих видов грибов, например *Helminthosporium gramineum*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia trifolium* характерен быстрый рост мицелия на питательных средах, используемых для растительных клеток. Это не позволяет идентифицировать устойчивые клетки хозяина, которые так же, как и чувствительные, быстро покрываются мицелием. В этом случае пытаются инфицировать лишь кусочки ткани, а также механически ограничить рост патогена. Для *Septoria nodorum* и пирикулярриоза риса это явление не характерно. Мицелий этих грибов растет не так стремительно и обходит стороной устойчивые каллусы на некотором расстоянии от них (рис. 5.8).

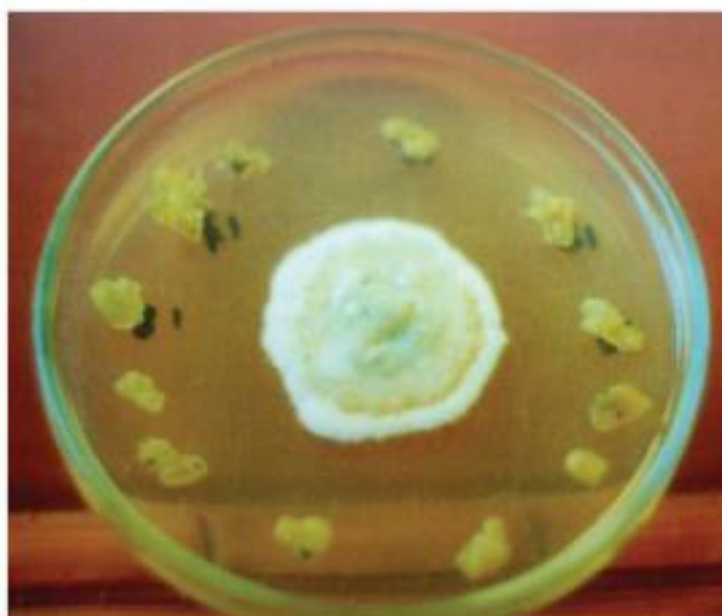


Рис. 5.8. Совместное культивирование каллусной ткани и фитопатогенного гриба

Исследования по культивированию растительных клеток в присутствии патогена были начаты в середине 1960-х гг. и направлены на изучение корреляции устойчивости/чувствительности к патогену *in vivo* и *in vitro*. Непосредственно эксперименты по клеточной

селекции на устойчивость к патогенам не всегда были успешными. Так, для люцерны был предложен способ отбора каллусных тканей на устойчивость к *Phytophthora megasperma*, путем совместного культивирования каллусных клеток и инокулюма патогена. Аналогичный подход был применен для табака на устойчивость к *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*, для березы — к *Peronospora barinosa* f. *Sp. Beta*. В этих исследованиях авторам не всегда удавалось провести клеточную селекцию и получить устойчивые растения, так как в этом случае каллусная ткань сильно инфицировалась мицелием или спорами патогена, что вело к ингибированию ростовых и морфофизиологических процессов. Однако следует отметить, что китайскими учеными были получены два новых высокоурожайных сорта риса, устойчивых к пирикулярриозу. Селекция проводилась на культуре изолированных пыльников, а в качестве селективного фактора применялась смесь 10 линий гриба. В настоящее время новые сорта занимают в Китае более 140 тыс. га и дают средний урожай 7,5 тыс. кг/га.

В клеточной селекции растений на устойчивость к патогенам интересен способ, названный *техникой двойного слоя*. Этот способ был впервые продемонстрирован с люцерной на устойчивость к фузариозу. Метаболические компоненты культивируемого гриба из нижнего слоя среды диффундируют в верхний слой, создавая, тем самым, селективные условия для развития каллусной ткани. Глубина второго слоя служит своеобразным регулятором токсического эффекта. В результате использования данного метода обнаружены резистентные к фузариозу клетки каллусной ткани люцерны.

21.2. Использование патотоксинов в клеточной селекции растений на устойчивость к болезням

Многие фитопатогенные грибы образуют опасные для теплокровных токсины, загрязняющие продукцию растениеводства и животноводства. Например, подавляющее большинство штаммов грибов родов фузариум, аспергиллус и пенициллиум образуют микотоксины и заражают широкий круг диких и культурных растений. Вместе с тем токсины фитопатогенных грибов играют важную роль в патогенезе многих заболеваний растений. Почти все известные микотоксины являются комплексом компонентов, близких по химической природе, но обладающих различной биологической активностью. Токсины многих видов грибов, как и антибиотики, применяют в биохимических исследованиях в качестве более или менее специфических ингибиторов отдельных биохимических процессов.

Перспективным методом селекции растений *in vitro* на устойчивость к болезням является метод, основанный на использовании

в качестве селективного агента патотоксинов, синтезируемых патогенами. Применение токсинов в качестве заменителей живых культур удобнее, проще, эффективнее по следующим причинам: 1) ускоряется процесс отбора при селекции на устойчивость, поскольку реакция растений на токсин проявляется непосредственно после обработки; 2) обеспечиваются стандартные условия заражения: реакция растений на токсин в меньшей степени зависит от окружающей среды; 3) появляется возможность контролировать стабильность условий проведения опытов, потому что токсин можно выделить, накопить и хранить в нужных количествах, используя точные дозировки.

Роль токсинов в болезнях растений до конца пока не ясна. Известно, что незначительное количество патотоксинов играет существенную роль в инициации или развитии болезни. По их действию некоторые авторы условно делят патотоксины на три категории. К первой относятся токсины, которые не являются определяющими в заболевании, но они обладают неспецифическим токсическим действием по отношению к хозяину и токсичны для широкого круга растений. Примером может служить табтоксин, продуцируемый *Pseudomonas syriacae* pv. *tabaci*, являющийся возбудителем бактериальной яблужки табака.

Вторая категория патотоксинов обладает такой же специфичностью по отношению к растениям, как и патоген, но они также не ответственны за развитие болезни. Сюда относится Т-токсин *Drechslera maydis* расы Т, патоген, вызывающий гельминтоспориоз кукурузы. Раса О *D. Maydis* не продуцирует Т-токсин, но все же обладает патогенным эффектом, хотя симптомы болезни менее значительны. Раса Т патогена образует Т-токсин, который специфичен для растений кукурузы, несущих цитоплазматический ген *Tm₃*, ответственный за цитоплазматическую мужскую стерильность. Растения с нормальной цитоплазмой не поражаются токсином.

Третья категория включает патотоксины, которые хозяиноспецифичны и вызывают типичные признаки болезни. Хорошим примером являются 10-викторин — токсин *Drechslera victoriae* — возбудитель гельминтоспороза овса, вызывающий корневую гниль и пятнистость листьев. Специфичность токсина зависит от присутствия у хозяина гена *Victoria*, отвечающего за устойчивость к *Puccinia coronata*.

Выбор схем клеточной селекции на устойчивость растений к патогенам может непосредственно зависеть от механизмов действия токсинов. Отдельные виды патогенов поражают клетки, а затем выделяют токсин. Другие — сначала выделяют токсины, которые убивают клетки, а затем используют продукты их распада для питания. Естественно, в первом случае не будет наблюдаться корре-

ляции между устойчивостью *in vitro* и *in vivo*. Проведение селекции на клеточном уровне целесообразно лишь во втором случае.

В настоящее время из патогенов растений выделено большое количество различных токсических или биологически активных веществ, действие которых схоже с природными патотоксинами (табл. 5.3). У ряда видов рода *Alternaria* были получены и изучены фитотоксины: АК (*A. kikuchiana*), АМ (*A. mali*), АС (*A. citri*), АЛ (*A. alternata*), АФ (*A. frarania*), АЛ (*A. longipes*), АС (*A. solani*). Однако они не являются определяющими в заболевании, обладают неспецифическим токсическим действием к хозяину и токсичны для широкого круга растений. На их фоне нельзя проводить отбор устойчивых форм.

Таблица 5.3

Токсические и биологически активные вещества, продуцируемые патогенами растений

Токсическое вещество	Продуцент	Поражаемые растения
Абсцизовая кислота	<i>Cercospora rosicola</i>	Роза
Алтенин	<i>Alternaria kikuchiana</i>	Японская груша
Альтернариевая кислота	<i>Alternaria solani</i>	Картофель
Цитохалодины	<i>Phoma</i> , <i>Phomopsis</i>	Различные растения
Фенилуксусная кислота	<i>Rhizoctonia solani</i>	Различные проростки
Нофтазорины	<i>Fusarium spp.</i>	Различные растения
Тенуазониевая кислота	<i>Alternaria spp.</i>	
Фузариевая кислота	<i>Fusarium oxysporum</i>	Томаты

Возможность отбора *in vitro* растений, устойчивых к болезням, впервые продемонстрировал в 1973 г. П. Карлсон, который, проводя селекцию табака на устойчивость к метионинсульфоксиму (аналог таботоксина), получил клеточные линии, а затем растений с повышенной устойчивостью к патогену. Некоторые результаты исследований по клеточной селекции на устойчивость к патотоксинам приведены в табл. 5.4.

Таблица 5.4

Примеры клеточной селекции на устойчивость к патотоксинам

Патоген	Хозяин	Устойчивый материал
<i>Leptosphaeria maculans</i>	<i>Brassica napus</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	

Патоген	Хозяин	Устойчивый материал
<i>Alternaria solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Клеточные линии
<i>Drechslera sativum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Phaseolica</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Клеточные линии, регенеранты
<i>Helminthosporium sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Fusarium coeruleum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Клеточные линии, регенеранты
<i>Helminthosporium maydis</i>	<i>Zea mays</i>	Клеточные линии

В селекционной практике в основном применяют хозяинспецифические токсины, вызывающие такие же внешние симптомы и биохимические изменения, как грибы, их продуцирующие. Токсины используются с целью отбора устойчивых к заболеванию форм у различных культур. Например, были получены устойчивые формы гвоздики, томатов, люцерны, клевера к фузариозу путем культивирования изолированных клеток, тканей и органов растений на средах, содержащих фитотоксические вещества рода *Fusarium*. Для гвоздики подтверждено существование корреляции между устойчивостью к токсину *in vitro* и полевой устойчивостью полученных растений-регенерантов.

Для ряда культур (томаты, картофель, ячмень) отбор устойчивых форм на клеточном уровне осуществляется также с использованием в качестве селективного фактора фузариевой кислоты (5-н-бутил-2-пиридин-карбоновая кислота), которая синтезируется различными видами фузариев. Японские исследователи проводили отбор калусной ткани томатов, обладающих устойчивостью к фузариевой кислоте. Установлена идентичность этого соединения, полученного из культуральных фильтратов (КФ) гриба *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* и коммерческого препарата фирмы *Sigma*. На калусных клетках, культивируемых на агаризованной среде МС, изучен дозовый эффект фузариевой кислоты. Клетки инкубировали 1—3 суток при непрерывном освещении (3—4 тыс. лк) и температуре 26 °С, а затем окрашивали флюоресцеином диацетатом (0,01 %) для определения жизнеспособности. Результаты тестирования показали, что 70 мкМ фузариевой кислоты достаточно, чтобы убить практически все клетки. Отдельные клетки, высеянные на эту среду, начинали делиться через 4—6 суток, а через 30—40 суток образовывали калусную ткань размером 3—4 мм. После пяти пассажей на селективной среде калусы переносили на среду без токсина. Через

5—12 суток масса каллусной ткани на этой среде увеличивалась, что соответствовало скорости роста исходной каллусной ткани. Отобранные на устойчивость к фузариевой кислоте каллусы переносили на среду, содержащую КФ патогена (50 %). Установлено, что в этих условиях каллусная ткань не была способна к пролиферации. Видимо, это связано с тем, что в состав КФ наряду с фузариевой кислотой входят и другие токсические экзометаболиты патогена.

В работе ученых из Института генетики (Грюнбах, Германия) изучена возможность отбора резистентных каллусов ячменя на среде с добавлением фузариевой кислоты. Каллусные культуры получали из 7—10-суточных незрелых зародышей сорта Dissa и гибрида W 193 на среде В₅ с 2 мг/л 2,4-Д. Предварительно были проведены исследования по изучению воздействия фузариевой кислоты в концентрации 0,1—2 мМ на каллусогенез ячменя вышеназванных генотипов. После трехнедельной инкубации каллусной ткани в этих условиях отмечено, что при использовании токсина в концентрации 0,8 мМ наблюдалась гибель около 80 % каллусов. Эта концентрация была выбрана авторами как селективная. Для проведения клеточной селекции использовали 3—4-месячные каллусы, которые после четырех циклов отбора помещали на среду без токсина или постоянно культивировали на питательных средах с присутствием фузариевой кислоты. После первого цикла селекции погибало около 75 % каллусов, а после второго — 5—10 %. В дальнейшем (третий и четвертый пассаж) отмечали устойчивость отобранной ткани к воздействию токсина. Отобранные на селективной среде каллусы размножали на среде без токсина. Резистентные клетки сохраняли свою устойчивость при трехмесячном субкультивировании на среде без токсина. После четырех циклов селекции отобрано 8 и 11 % резистентной каллусной ткани сорта Dissa и W 193 соответственно. Хорошо пролиферирующую каллусную ткань помещали для регенерации на среду В₅ с 0,4 мг/л НУК и 1 мг/л БАП. Из устойчивых каллусных линий сорта Dissa было регенерировано 23 зеленых растения, а из линий W 193 — восемь растений-альбиносов.

Во ВНИИ льна проведены исследования по культивированию изолированных пыльников и каллусной ткани льна-долгунца на питательных средах, содержащих в качестве селективного агента фузариевую кислоту. В результате отбора получены растения-регенеранты, характеризующиеся высокой комплексной устойчивостью в полевых условиях к фузариозу и ржавчине. Вместе с тем было показано, что растения-регенеранты во втором-четвертом поколении существенно превосходили исходные генотипы и сорт-стандарт Алексим по семенной продуктивности, а также массе волокна и массе технической части стебля.

Сложность применения токсина в клеточной селекции была выявлена в работе Г. Рассадиной и Л. Хромовой (1987), использовав-

ших метод клеточной селекции для получения картофеля, устойчивого к кольцевой гнили, вызываемой *Corinebacterium sepedonicum*. В качестве селективного фактора применяли грубо очищенный токсин этой бактерии, вызывающий те же симптомы заболевания, что и сам патоген. На питательную среду, содержащую разные концентрации токсина, высевали клетки двух сортов картофеля — более устойчивого и неустойчивого к патогену. На клеточном уровне различие их в устойчивости к токсину коррелировало с устойчивостью растений к патогену. Были отобраны стабильно устойчивые клеточные клоны и на их основе получены растения. Однако не все растения из стабильных клонов были устойчивы к токсину, и не все растения, устойчивые к токсину, оказались устойчивыми к самому патогену. Более того, авторам удалось обнаружить среди растений-регенерантов, полученных из каллусных клеток, не прошедших селекцию, соматклоны, устойчивые к токсину и патогену. Эти данные свидетельствуют о сложности оценки результатов клеточной селекции в случае использования растений с высоким уровнем соматклональной изменчивости *in vitro*.

Анализируя имеющиеся в литературе данные по применению методов клеточной селекции для получения устойчивых к патогенам растений, следует отметить, что практически все существующие схемы клеточной селекции на устойчивость к патогенам характеризуются существенным недостатком, поскольку рассчитаны на создание устойчивости, как правило, лишь к одному определенному токсину или его аналогу. Поэтому актуален поиск новых оригинальных и более эффективных схем селекции на устойчивость к патогенам, особенно на комплексную устойчивость к нескольким патогенам.

21.3. Использование культурального фильтрата патогена в клеточной селекции растений на устойчивость к болезням

В отношении многих патогенов, для которых патотоксины в чистом виде не выделены или не изучены, для селекции *in vitro* на устойчивость реальным представляется использование КФ патогенов. Необходимым условием их применения является наличие его активности как селективного фактора. Отсюда следует учитывать: способ получения КФ; агрессивность штаммов, вводимых в культуру *in vitro*; питательная среда, как фактор накопления неизвестных токсинов; сохранение инфекционных свойств патогенов в культуре. Например, штаммы грибов *Alternaria alternata*, *Alternaria macrospora*, *Alternaria tenuissima* (возбудители альтернариоза хлопчатника) выращивали на среде Чапека — Докса и в жидкой картофельно-морковной среде, после чего проверяли действие полученных КФ по проращиванию семян. Установлено, что подавляющее

действие более чем на 50 % оказал КФ, полученный на среде Чапека — Докса.

Первые обнадеживающие результаты по селекции получены М. Бенке в 1980 г., применявшего нефракционированную культуральную жидкость *Phytophthora infestans* в клеточной селекции картофеля. Были выделены устойчивые клеточные клоны, давшие начало растениям. При механической инокуляции листьев растений-регенерантов спорами *Phytophthora* у трех из 34 выделенных растений были обнаружены очаги поражения, значительно меньше по сравнению с контролем.

Известны различные способы отбора клеток на селективных средах: быстрый (разовый) отбор, прямой ступенчатый, многоступенчатый и прерывистый. Американскими учеными из университета штата Невада был проведен ступенчатый и прямой отбор устойчивых к фузариозу форм люцерны *in vitro*. В первом случае каллусные линии культивировали в течение двух пассажей на среде с 20 % КФ, а затем переносили на среду с 50 % КФ и инкубировали еще в течение четырех месяцев в стрессовых условиях. Во втором случае исходную каллусную ткань сразу помещали на среду с 50 % КФ и после трех пассажей каллусы, сохранившие рост в стрессовых условиях, переносили на среды для регенерации. Применение ступенчатой схемы селекции, позволило получить большее количество растений-регенерантов, проявивших стабильную устойчивость к фузариозу.

Работы по устойчивости к фузариозу были проведены и на томатах. При ступенчатом отборе выделена каллусная линия Regen S-A, способная хорошо расти на селективной среде. Однако при подсчете хромосом у растений, регенерированных из клеток данной линии, обнаружено измененное их число ($2n = 48$ и $2n = 64$). Устойчивые к культуральному фильтрату линии были получены и при прямом отборе. Эти регенеранты имели диплоидный набор хромосом ($2n = 32$), что говорит о преимуществе такого отбора.

Германович С. Т. (1991) использовал многоступенчатый отбор, который заключался в последовательной пересадке клеток клевера лугового с меньшей на большую концентрацию КФ патогена в среде. В работе итальянских ученых показана возможность получения резистентных растений люцерны из восприимчивого исходного материала. Отбор каллусов на устойчивость проводили с использованием двух направлений. При первом из них шестинедельные каллусы переносили на среду В₅, содержащую 10 % культурального фильтрата, и инкубировали три месяца; при втором — каллусы предварительно выращивали на среде В₅ с добавлением 1, 5, 7,5 % КФ, а затем переносили на среду с содержанием его 10 %. Концентрации ниже 10 % не оказывали существенного влияния на рост каллусной ткани, поэтому данную концентрацию использовали

для отбора устойчивых линий. При первом отборе было получено шесть, а при втором способе — два растения.

Устойчивые к фузариозу формы растений были отобраны *in vitro* у другого представителя семейства *Solanaceae* — картофеля. В качестве селекционирующего агента использовали КФ, полученный из двух изолятов *F. oxysporum*, который с целью увеличения выхода токсинов культивировали на обогащенной среде. Культуральную жидкость после отделения конидий стерилизовали фильтрованием через мембраны (0,2 мкм) и смешивали со средой Гамборга (B₅). Отбор проводили на питательной среде, содержащей 40 % КФ, на которую помещали калусы размером 3 мм по 16 шт. на каждую чашку Петри. В этих условиях для большинства калусной ткани было характерно появление некрозов, что приводило к гибели клеток в течение 3 недель.

Во ВНИИ льна проводились исследования по культивированию гипокотильных сегментов и калусной ткани восприимчивого к фузариозному увяданию сорта льна-долгунца Славный 82 на селективной среде. Выполненная работа показала, что добавление в питательную среду культурального фильтрата возбудителя фузариозного увядания льна в концентрации 2,5—5,0 % позволяет проводить отбор калусной ткани, на устойчивость к данному патогену.

Работы по клеточной селекции растений на устойчивость к септориозу малочисленны и носят поисковый характер. Так, Е. Михайл с соавторами сделали попытку определить устойчивость 10 видов тополеи к *Septoria musiva*. В качестве первичного экспланта они использовали изолированные листья, которые культивировали в условиях *in vitro* на питательной среде, содержащей КФ гриба. Устойчивость определяли по образованию бурых пятен по всей листовой пластинке. Однако добиться регенерации растений им не удалось.

Келлар В. и др. сравнивали токсическое действие культурального фильтрата гриба и токсина «миланин» на девяти сортах пшеницы. Первичным эксплантом служили изолированные незрелые зародыши, которые культивировали на питательной среде МС, содержащей 2,4-Д в концентрации 2 мг/л, с целью получения первичной калусной ткани. Учет действия КФ и токсина осуществляли на 9-е сутки после введения эксплантов в культуру *in vitro*. Авторы пришли к выводу, что КФ имеет большее токсическое действие на зародыши, чем токсин «миланин». Использование КФ даже в концентрации 10 % было токсичным для зародышей для всех исследуемых генотипов пшеницы. Исходя из этого в своих дальнейших исследованиях по клеточной селекции В. Келлер и др. использовали только КФ гриба.

Американскими учеными проведена работа по клеточной селекции сельдерея к грибу *Septoria apicola* с использованием калусной и суспензионной культур, которые были получены из молодых че-

решков. В качестве селектирующего фактора применяли КФ гриба или совместное культивирование эксплантов с патогеном. В результате проведенной работы были получены растения-регенеранты, устойчивые к *Septoria apicola*.

Д. Семал и Д. Визер (1988) в результате клеточной селекции пшеницы на устойчивость к септориозу получили растения-регенеранты. Однако анализ полученных растений не был проведен.

Важным представляется изучение корреляции устойчивости к патогену у растений и культивируемых *in vitro* клеток. Так, А. Варди с соавторами предостерегают использовать КФ *Phytophthora citrophthora* в качестве селективного фактора для отбора *in vitro* устойчивых клеток лимона. Чувствительность четырех исследуемых сортов лимона к КФ была противоположной тому, что наблюдалось при тестировании этих сортов *in vivo* и, таким образом, указывало на непригодность КФ данного патогена как селективного агента. Подобные результаты получены и для других культур. Вероятно, это связано с тем, что в данных работах не был отработан способ получения КФ и не изучено проявление его инфекционных свойств, которые зависят от ряда факторов.

В противоположность негативным результатам для многих комбинаций «патоген — хозяин» селекция *in vitro* к КФ является положительной. Например, прямая корреляция отмечалась у гвоздики между устойчивостью *in vivo* к *Fusarium* и на уровне клеток к КФ этого патогена. Во ВНИИ кормов установлено, что в потомстве растений-регенерантов клевера лугового, полученных после селекции *in vitro*, показатель устойчивости к раку растений изменялся от 1 до 70 %.

В настоящее время известно незначительное количество работ по селекции *in vitro* на устойчивость к альтернариозу. Например, в результате селекции *in vitro* на основе высокочувствительного к *A. solani* сорта Талалихин-186 получены формы томата, устойчивые к КФ этого гриба. Установлено, что устойчивость к *A. solani* сохраняется в первом и втором потомстве от самоопыления растений-регенерантов. КФ гриба получали путем выращивания *A. solani* с калусной тканью томата в течение 6 суток. Такой нетрадиционный подход в получении КФ связан с тем, что, развиваясь совместно с калусными клетками, гриб *A. solani* синтезирует больше экзометаболитов, которые образует патоген при поражении растений.

Аналогичные исследования были проведены на хлопчатнике, а также на моркови. Для моркови селекция *in vitro* проводилась с использованием КФ таких патогенов как *A. alternata*, *A. clauca*, *A. dauci*, *A. solani*.

На кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА также ведутся исследования по получению форм растений, устойчивых к патогенам: пшеницы к септориозу, моркови — к альтерна-

риозу, картофеля — к ризоктониозу, подсолнечника — к фомопсису. В качестве селектирующего фактора используют культуральные фильтраты грибов (рис. 5.9). В результате проведенных исследований были получены растения-регенеранты пшеницы (сорт Энита, Саратовская 29, Московская 35, Фортуна, Gaterin) (рис. 5.10). Семена первого поколения были проверены на устойчивость к патогену *Septoria nodorum* (по прорастанию). В результате было установлено, что у отобранных семян повышалась устойчивость к культуральному фильтрату гриба на 10—15 % по сравнению с исходными генотипами. Аналогичные работы были проведены на пяти генотипах моркови. Клеточную селекцию проводили на суспензионной культуре, а в качестве селектирующего фактора использовали культуральный фильтрат гриба *Alternaria radicina*, в результате чего были отобраны устойчивые клетки, из которых получены растения-регенеранты (рис. 5.11).

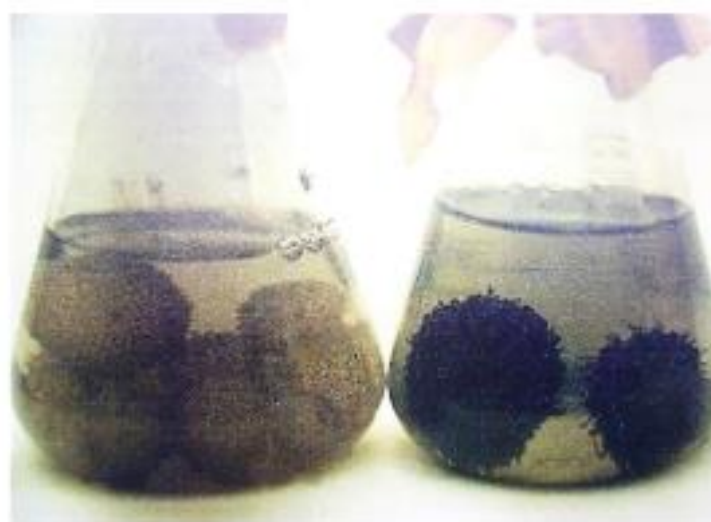


Рис. 5.9. Выращивание изолятов фитопатогенных грибов в жидкой питательной среде с целью получения культурального фильтрата



Рис. 5.10. Растения-регенеранты пшеницы (сорт Энита), полученные после клеточной селекции на устойчивость к *Septoria nodorum*

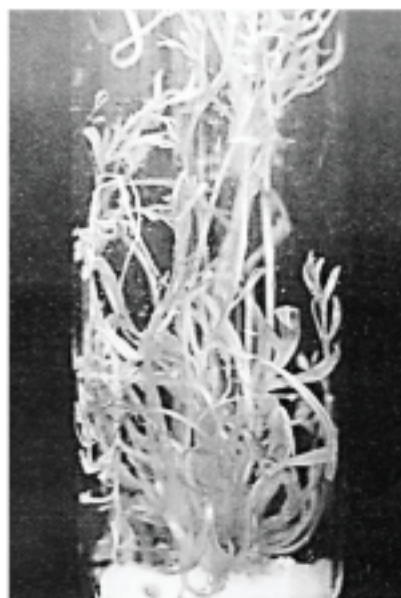


Рис. 5.11. Растения-регенеранты моркови, устойчивые к *Alternaria radicina*, полученные после клеточной селекции

Интерес к работам по клеточной селекции в последнее время возрастает, и имеются положительные примеры применения КФ в качестве стресс-фактора в селекции растений на устойчивость к болезням (табл. 5.5).

Таблица 5.5

Клеточная селекция на устойчивость растений к КФ патогенов

Патоген	Хозяин	Полученные результаты
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
	<i>Solanum tuberosum</i>	
	<i>Medicago sativa</i>	
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	
<i>Alternaria solani</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>	
<i>Fusarium</i>	<i>Medicago sativa</i>	
Корневые гнили	<i>Hordeum vulgare</i>	Регенеранты
	<i>Triticum aestivum</i>	Клеточные линии
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trifolium pratense</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Sclerotinia trifolium</i>		
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Linum usitatissimum</i>	Регенеранты

21.4. Участие фитогормонов в клеточной селекции растений на устойчивость к экзометаболитам патогенных грибов

Под действием факторов различной биотической природы в растениях происходит быстрый синтез и интенсивное накопление стрессовых фитогормонов. Прежде всего, к таким фитогормонам относятся соединения различной химической природы, а именно абсцизовая кислота, этилен, жасмоновая кислота, салициловая кислота, брассиностероиды и системин. Как правило, образовавшиеся стрессовые фитогормоны вызывают синтез различных защитных соединений и повышение устойчивости как в клетках, подвергшихся действию элиситоров (местная или локальная устойчивость), так и на удалении от них (системная устойчивость). Последнее объясняется способностью большинства фитогормонов транспортироваться на большие расстояния или вызывать в клетках появление транспортных вторичных элиситоров.

Для клеток, культивируемых в условиях *in vitro*, в стандартных и в стрессовых условиях, установлено, что процесс адаптации клеток и интактных растений к стресс-факторам находится под контролем гормональной системы. Однако работы, свидетельствующие о существенной роли гормонального баланса в адаптации каллусных и суспензионных культур, длительно культивируемых на питательных средах в присутствии экзометаболитов патогенов, малочисленны, а полученные результаты противоречивы.

Исследования, проведенные на кафедре сельскохозяйственной биотехнологии РГАУ-МСХА, выявили существенные различия по содержанию фитогормонов в клетках суспензионной культуры моркови, культивируемой в стандартных и стрессовых условиях (табл. 5.6). В качестве стрессового (селективного) фактора был взят КФ фитопатогенного гриба *Alternaria radicina*.

Таблица 5.6

Содержание гормонов (мкг/г сух. масса) в суспензионной культуре моркови, культивируемой на среде с содержанием селективного фактора, I пассаж

Генотип	Концентрация КФ, %	Фитогормон			
		ИУК	ЦК	АБК	ГК
Линия 906	Контроль	0,0846	261,65	—	0,3995
	20	0,1083	287,91	—	0,4733
	40	0,029	6,51	—	1,7905
Сорт Rondo	Контроль	0,0397	13,75	—	2,6311
	20	0,0528	346,98	—	2,9412
	40	0,0130	7,48	—	3,1268

Экспериментально установлено, что при культивировании клеток суспензии на средах, содержащих 20 % КФ, наблюдается увеличение содержания ИУК и цитокининов, в то время как на средах с 40%-ным КФ количество этих гормонов были значительно ниже по сравнению с контролем. Синтез же эндогенной ГК с увеличением концентрации КФ у обоих генотипов увеличивался. Это влияло на процесс растяжения клеток и проявлялось в формировании клеток более крупных размеров и вытянутых форм. Абсцизовой кислоты в клеточных культурах ни в одном из исследуемых вариантов обнаружено не было. Кроме того, установлено изменение гормонального статуса клеток суспензионной культуры на разных этапах (пассажах) культивирования. Доказано, что процесс адаптации суспензионной культуры к воздействию стрессового фактора происходит за счет увеличения синтеза ауксинов и цитокининов в процессе длительного культивирования клеток *in vitro* (табл. 5.7, 5.8).

Таблица 5.7

Содержание гормонов (мкг/г сух. масса) в суспензионной культуре моркови линии 906 при культивировании ее в стандартных и стрессовых условиях на разных пассажах

Номер пассажа	Вариант	Фитогормон			
		ИУК	ЦК	АБК	ГК
I	Контроль	0,0846	261,65	—	0,3995
	КФ 40 %	0,029	6,51	—	1,7905
IV	Контроль	0,0138	128,33	—	0,2701
	КФ 40 %	0,102	90,69	—	0,8397
VIII	Контроль	0,0083	8,91	—	0,0952
	КФ 40 %	0,126	92,05	—	0,8759

Таблица 5.8

Содержание гормонов (мкг/г сух. масса) в суспензионной культуре моркови сорта Rondo при культивировании ее в стандартных и стрессовых условиях на разных пассажах

Номер пассажа	Вариант	Фитогормон			
		ИУК	ЦК	АБК	ГК
I	Контроль	0,0397	13,75	—	2,6311
	КФ 40 %	0,013	7,48	—	3,1268
IV	Контроль	0,0154	6,84	—	0,5390
	КФ 40 %	0,018	4,26	1,029	0,3251
VIII	Контроль	0,0106	4,92	—	0,7781
	КФ 40 %	0,0209	16,24	0,72	2,1055

При культивировании суспензионной культуры моркови сорта Rondo в стрессовых условиях в процессе адаптации проявляется роль такого гормона, как АБК (табл. 5.8), что говорит о некоторой разнице в механизмах адаптации у разных генотипов моркови. В контрольном варианте, не содержащем стресс-фактора, при длительном культивировании суспензионной культуры вне зависимости от генотипа наблюдалось снижение содержания всех гормонов-стимуляторов. Видимо, это связано со старением культуры, а разница в количественном уменьшении этих гормонов у линии 906 и сорта Rondo можно объяснить сортовыми особенностями.

В конце VIII пассажа из клеток, культивируемых в контрольном и опытном (после клеточной селекции) вариантах, были получены растения-регенеранты моркови, которые в дальнейшем переносили на питательную среду, содержащую 95 % культурального фильтрата того же патогена (*Alternaria radicina*). Наблюдения показали, что регенеранты, полученные после селекции, имели нормальную морфологию листьев, активный рост побегов и корней. Выживаемость этих растений в стрессовых условиях составила более 50 %, в то время как в контрольном варианте (растения-регенеранты, не прошедшие селекцию) этот показатель находился в пределах 15 %.

Определение фитогормонов в таких растениях-регенерантах показало, что полученные в результате клеточной селекции растения содержат значительно больше ауксинов, гиббереллинов и особенно — цитокининов по сравнению с контрольным вариантом (табл. 5.9).

Таблица 5.9

Содержание гормонов (мкг/г сух. массы) в растениях-регенерантах

Генотип	Вариант	Фитогормон			
		ИУК	ЦК	АБК	ГК
Линия 906	Контроль	0,1936	572,77	—	39,965
	В результате селекции	0,2306	2274,58	—	550,346
Сорт Rondo	Контроль	19,960	28,09	—	186,764
	В результате селекции	23,264	6027,39	—	439,258

Таким образом, полученные результаты выявили роль гормонального баланса и различия между гормональным балансом изучаемых генотипов моркови в разных условиях культивирования суспензионной культуры и длительности селекционного процесса.

В существующей литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что в адаптационной реакции растений на стресс суще-

ственную роль играет гормональная система. При неблагоприятных условиях в растениях меняется гормональный баланс. Данных об изменении содержания фитогормонов в культуре тканей при действии патогена как стресс-фактора, приводящего к адаптации как культуры, так и полученных в результате культивирования регенерантов, малоисчисленны. Существенную роль в адаптации к стрессовым воздействиям у растений играют такие гормоны, как АБК и цитокинины, а в процессах репарации после стресса — и ИУК. Доказана экспрессия генов под воздействием цитокининов и АБК, которая приводит к синтезу стрессовых белков, изменению метаболизма и как результат — адаптации организма к стрессам. Можно предположить, что в результате стресса, каким является культуральный фильтрат патогена, начинаются модификационные изменения, проявляющиеся в виде реакции устойчивости к неблагоприятным факторам, одной из которых и является изменение гормонального баланса культура клеток моркови.

Аналогичные результаты получены и на суспензионной культуре картофеля, культивируемой в стандартных и стрессовых условиях (селективный фактор — культуральный фильтрат патогена *Rhizoctonia solani*) (табл. 5.10, 5.11).

Таблица 5.10

Содержание фитогормонов (мкг/г сухой массы) в суспензионной культуре различных генотипов картофеля, культивируемой в стандартных условиях

Сорт	Номер пассажа	Фитогормон			
		ИУК	ЦК	ГК	АБК
Удача	I	1,05	5,48	1,98	0,36
	IV	0,56	8,73	1,00	0,54
	VIII	0,14	0,90	1,05	0,35
Дезире	I	0,48	1,18	0,33	0,34
	IV	0,42	1,13	1,93	0,31
	VIII	0,40	0,99	2,64	0,31
Невский	I	0,22	2,41	2,10	1,78
	IV	0,72	6,03	13,64	1,69
	VIII	0,58	1,36	14,74	1,02
Жуковский ранний	I	0,61	5,23	1,77	1,59
	IV	0,43	4,40	1,28	1,70
	VIII	0,37	4,31	1,04	1,84

Содержание фитогормонов (мкг/г сухой массы) в суспензионной культуре различных генотипов картофеля, культивируемой в стрессовых условиях (30 % КФ патогена)

Сорт	Номер пассажа	Фитогормон			
		ИУК	ЦК	ГК	АБК
Удача	I	0,76	6,25	1,45	1,67
	IV	0,21	1,51	2,93	2,26
	VIII	— [*]	—	—	—
Дезире	I	3,88	1,17	0,86	1,46
	IV	3,43	1,53	0,41	1,29
	VIII	4,76	1,72	0,35	1,76
Невский	I	0,50	11,15	1,34	1,39
	IV	0,28	6,63	1,65	1,87
	VIII	0,52	4,94	1,91	2,59
Жуковский ранний	I	0,65	10,64	0,55	1,48
	IV	0,68	17,43	0,13	1,61
	VIII	0,70	18,11	0,183	1,85

^{*} — культура погибла.

Устойчивость интактных растений к патогенам может быть обусловлена, по меньшей мере, двумя причинами: 1) ограничением проникновения инфекции в растительную ткань, 2) подавлением развития патогена уже внутри ткани в результате различных механизмов, например в результате защитных реакций, индуцируемых в растениях в ответ на внедрение инфекции. Устойчивость против проникновения фитопатогенов является наиболее важным в эволюционном отношении механизмом устойчивости, который свойственен многим растениям¹.

Усиление защитных реакций растений может происходить, например, за счет накопления и отложения лигнина в местах внедрения патогена. Лигнифицированные ткани устойчивы к ферментативному разрушению, препятствуют диффузии токсинов, создают физический барьер на пути продвижения инфекции. Цитокинины способны усиливать лигнификацию клеточных стенок, что делает растительную ткань менее доступной для экзометаболитов патогенов. Можно предположить, что повышенное содержание цитокининов в клетках, возможно, ведет к некоторому механическому укреплению клеточных стенок, что делает их более устойчивыми

¹ Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений ...

к проникновению патогена или его токсинов. В то же время есть данные о том, что регенеранты с увеличенным содержанием цитокининов характеризуются повышенным, по сравнению с обычными растениями, уровнем активности растительной хитиназы, играющей важную роль в защите растений от фитопатогенных грибов. Более того, в результате контакта патогена и растения-хозяина изменяется и гормональный баланс последнего, что в конечном счете и будет определять либо развитие защитного ответа, либо создание «благоприятных» условий для развития патогена. Например, при изучении индукторов устойчивости к поражению проростков пшеницы корневыми гнилями было установлено, что повышение устойчивости растений связано со стабилизацией баланса ИУК/АБК и увеличением содержания ЦК. Такое соотношение фитогормонов, вероятно, приводит к активации обмена веществ в растении, в результате чего в инфицированных тканях происходит интенсивное накопление лигнина, приводящее к локализации патогена и подавлению его развития. Вероятно, механизм появления устойчивости для клеточной культуры аналогичен механизму устойчивости в интактных растениях.

Полученные нами данные (см. табл. 5.10, 5.11) свидетельствуют о том, что соотношение ИУК/АБК в клетках суспензионной культуры таких сортов, как Дезире и Жуковский ранний, культивируемых в стрессовых условиях (табл. 5.11) на протяжении восьми пассажей, величина постоянная. Для сорта Дезире она составляет 2,60—2,69, а для сорта Жуковский ранний — 0,38—0,43. Эти данные подтверждают результаты, полученные нами ранее, о большей адаптационной способности клеток суспензионных культур данных генотипов к стрессовым условиям. Для остальных исследуемых сортов это соотношение не являлось величиной постоянной. Для сорта Удача оно изменялось от 0,22 до 0,10, а для сорта Невский — от 0,35 до 0,15. Низкая устойчивость клеточных суспензий этих сортов к стрессовому фактору было обнаружена нами и в более ранних исследованиях.

Следует отметить, что в контрольном варианте соотношение ИУК/АБК было стабильным у сортов Дезире и Жуковский ранний при культивировании суспензионной культуры на протяжении восьми пассажей, а для сортов Удача и Невский оно уменьшалось (см. табл. 5.10) к VIII пассажу за счет резкого увеличения уровня АБК в культуре (сорт Удача) и снижающегося уровня ИУК (сорт Невский). Более того, значительное увеличение уровня АБК в суспензионной культуре сорта Удача привело к быстрому их старению и гибели культуры (см. табл. 5.11).

Отмечены некоторые закономерности по содержанию эндогенного цитокинина в клетках суспензионных культур, культивируемых в стандартных и стрессовых условиях. Так, вне зависимости от исследуемого генотипа для клеток, находящихся в стандартных

условиях, было характерно уменьшение, а для клеток, находящихся в стрессовых условиях, увеличение содержания цитокининов, особенно значительное — в суспензионной культуре клеток сорта Дезире и Жуковский ранний.

В проведенных экспериментах было обнаружено, что клетки суспензионной культуры сортов Дезире и Жуковский ранний, отличающиеся повышенной устойчивостью к поражению экзометаболитами патогена, характеризовались утолщением клеточных стенок, что приводило к подавлению роста клеток растяжением. При этом формировались мелкие активно делящиеся клетки, что не было характерно для контрольного варианта. Данные по содержанию фитогормонов показали, что в контрольном варианте синтез эндогенной ГК был значительно выше по сравнению с опытным вариантом (стрессовые условия). Подобное явление, возможно, происходило как за счет более высокого синтеза цитокининов и низкого синтеза ГК, так и за счет лигнификации клеточной стенки.

Таким образом, адаптация дедифференцированных клеток и повышение устойчивости растений-регенерантов к действию экзометаболитов патогенных грибов находится под контролем эндогенного содержания гормонов-стимуляторов, особенно цитокининов и ауксинов, и их соотношения, что необходимо учитывать при проведении работ по селекции *in vitro*.

21.5. Участие фенольных соединений в адаптации клеточных культур *in vitro* к действию экзометаболитов патогенных грибов

Важнейшей проблемой современной биологии является изучение механизмов адаптации растительных организмов к изменяющимся условиям их произрастания. Особое внимание исследователи уделяют изучению ответных реакций клеток растений на действие биотических факторов, таких как: патогены, вирусы, бактерии и паразитирующие на растениях нематоды и насекомые. Результаты, полученные российскими и зарубежными исследователями, свидетельствуют о том, что под действием биотических факторов наблюдается изменение морфофизиологических характеристик растений, подавляется их рост и снижается продуктивность.

Известно, что устойчивость интактных растений к болезням основана на разнообразных механизмах защиты. В целом эти механизмы подразделяют на конститутивные и индуцированные. К числу важнейших индуцированных механизмов защиты относится синтез фенольных соединений — наиболее распространенных в растениях представителей вторичного метаболизма, которые принимают непосредственное участие в защите и адаптации клеток. В настоящее

время достаточно полно изучена структура синтезируемых в растениях фенольных соединений и исследованы их свойства, выяснены пути их биосинтеза, а также ферменты, участвующие в этих процессах. Интерес к фенольным соединениям обусловлен их важной ролью в процессах роста и развития растений. В последнее время все большее внимание исследователей акцентируется на их участии в защитных реакциях растений. Несмотря на существовавшее ранее представление о том, что фенольные соединения накапливаются лишь при старении растений, являясь средством выведения высокоуглеродных компонентов из обмена веществ, в настоящее время все большее число исследований подтверждает их важную роль в жизнедеятельности растительных клеток. Установлено, что поражение патогенами вызывает активизацию синтеза новых фенольных соединений, в том числе и специфических веществ фенольной природы, образующихся только в качестве ответной реакции на стресс.

Спектр фенольных соединений, синтезируемых растениями под действием биотических факторов, довольно широк: например, производные фенилпропана, а также полифенолы, присутствующие преимущественно в виде гликозидов. Важно отметить, что хлорогеновая, коричная кислоты и скополетин участвуют в защитных реакциях тканей растений против болезней. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что заражение растений сопровождается не только повышением накопления в них фенольных соединений, но и изменением их спектра, что проявляется в формировании специфических веществ, относящихся к так называемым фитоалексинам. Измененный фенольный метаболизм в свою очередь вызывает изменения химического состава клетки, обуславливая, таким образом, неполноценность сред обитания для патогена.

Важным моментом в исследованиях по клеточной селекции на устойчивость к биотическим факторам является изучение изменений в метаболизме каллусных и суспензионных клеток, подвергшихся стрессовым воздействиям. Учитывая роль фенольных соединений в защите клеток от стрессового фактора, проводятся исследования по изучению изменений количественного и качественного состава фенольных соединений в клетках суспензионных культур различных видов растений, культивируемых в стандартных и стрессовых условиях. Суспензионная культура является удобной моделью для проведения подобных экспериментов, так как полученные данные проецируются на интактные растения, реакции которых аналогичны реакциям клеточных и тканевых культур в стрессовых условиях.

Исследования, проведенные в РГАУ-МСХА профессором Е. А. Калашниковой совместно с ИФР РАН (Н. В. Загоскина) показали, что при культивировании суспензионной культуры моркови в стандарт-

ных и стрессовых условиях (присутствие в питательной среде экзо-метаболитов гриба *Alternaria radicina* в различных концентрациях) приводит к изменению суммарного содержания растворимых фенольных соединений в зависимости от исследуемого генотипа и условий культивирования. Например, присутствие культурального фильтрата патогена в питательной среде в различных концентрациях приводило к уменьшению синтеза фенольных соединений в среднем на 10—12 % по сравнению с контролем во время I пассажа (рис. 5.12). Причем для линии 906 воздействие селективного фактора (50 % КФ) существенно повлияло на снижение их количественного содержания (на 42 %). В процессе культивирования суспензионной культуры двух изучаемых генотипов на селективных средах способность клеток к синтезу фенольных соединений изменяется. В одних вариантах она постоянно растет (50 % КФ для сорта *Rondo*, 30 % КФ для линии 906) в других — относительно стабильна (30 % КФ для сорта *Rondo*, 50 % КФ для линии 906). Полученные результаты свидетельствуют о разной чувствительности клеток суспензии к действию стрессового фактора, что, возможно, проявляется и в различных механизмах устойчивости клеток к экзометаболитам патогена.

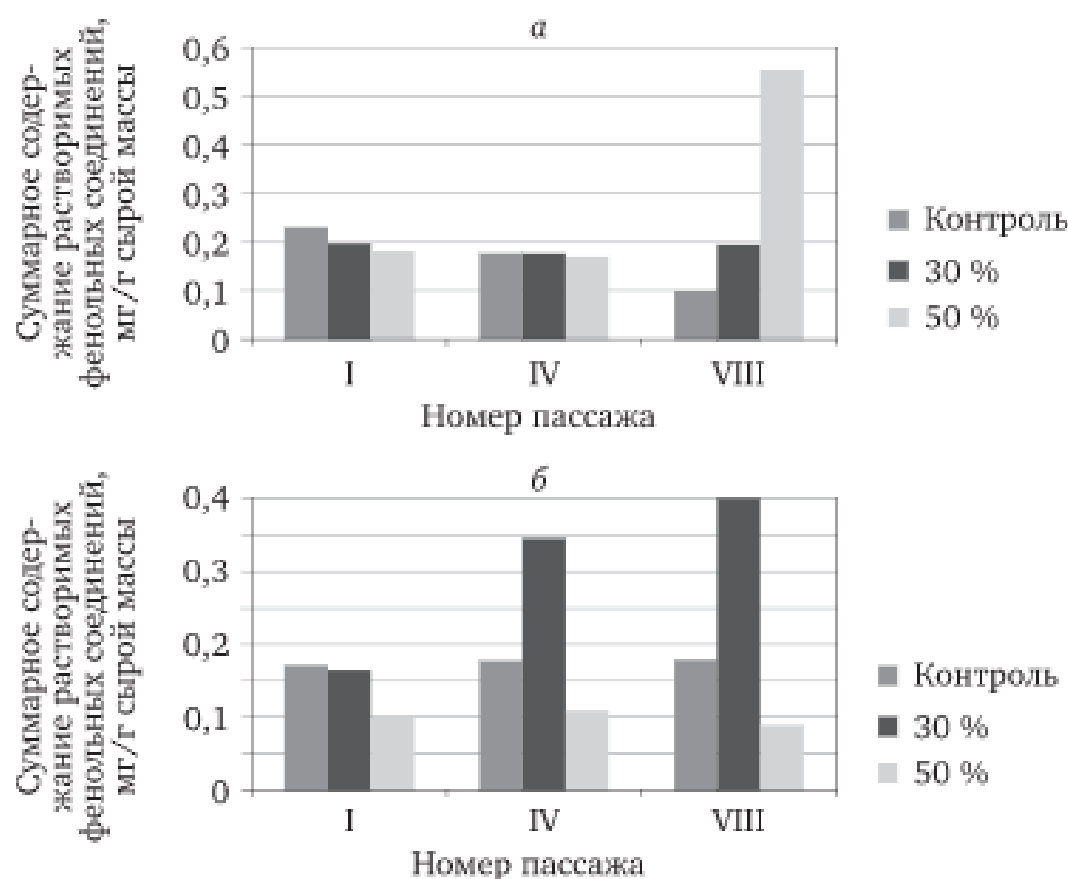


Рис. 5.12. Изменения в суммарном содержании растворимых фенольных соединений в суспензионной культуре моркови, культивируемой в стандартных и стрессовых условиях (присутствие экзометаболитов *A. radicina* — 30 % и 50 % культурального фильтрата — 50 %):
а — сорт *Rondo*; б — линия 906

У растений-регенерантов, полученных в результате клеточной селекции в присутствии экзометаболитов гриба *A. radicina*, уровень фенольных соединений в 1,5—2 раза выше по сравнению с растениями контрольного варианта (рис. 5.13). Причем для растений сорта *Rondo* их количественное содержание превышает таковой растений линии 906.

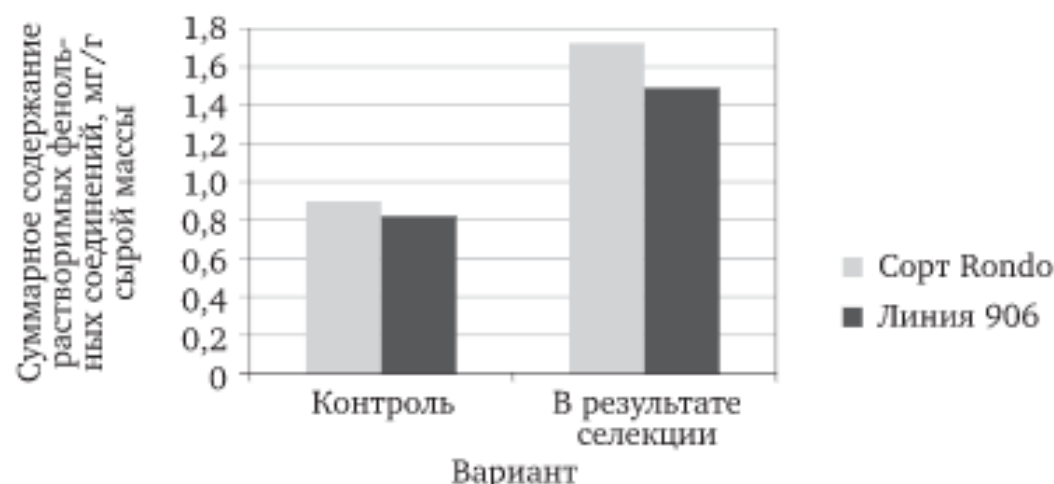


Рис. 5.13. Суммарное содержание растворимых фенольных соединений в растениях-регенерантах, полученных в контрольном варианте и в результате культивирования клеток на селективных средах в присутствии экзометаболитов *A. radicina*

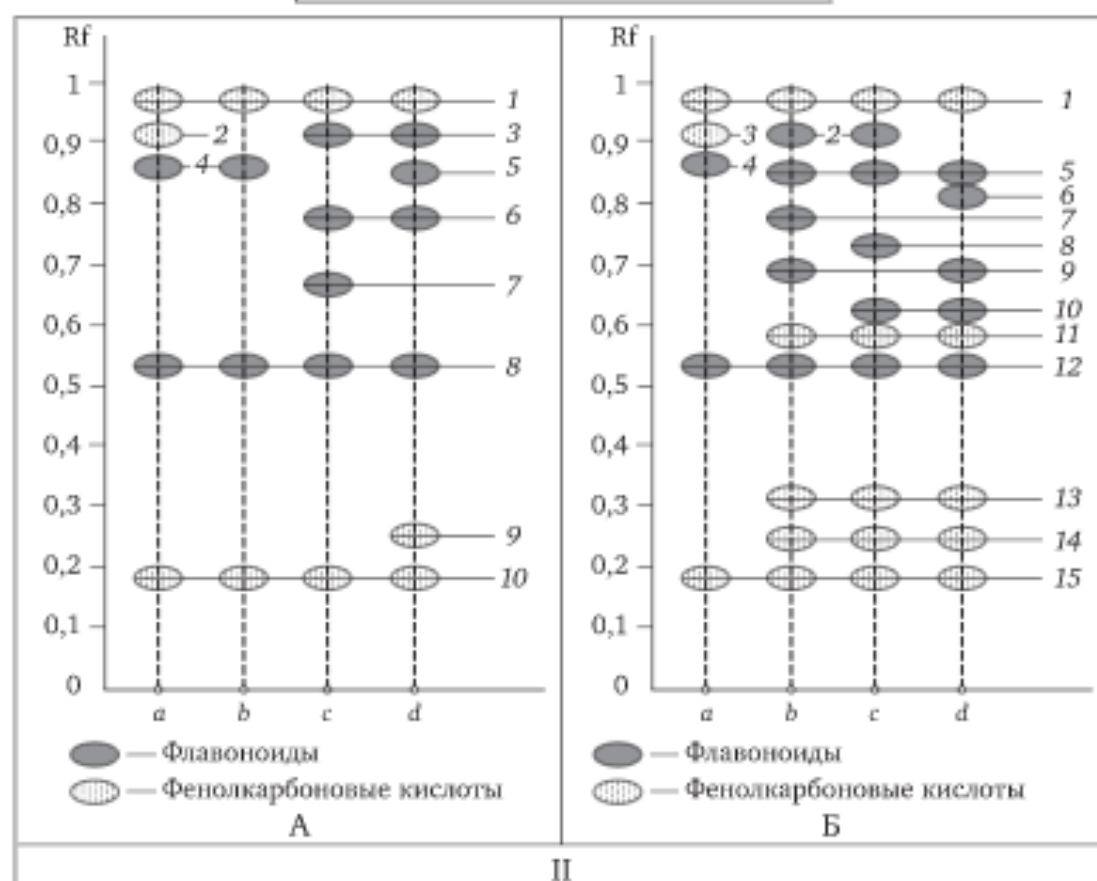
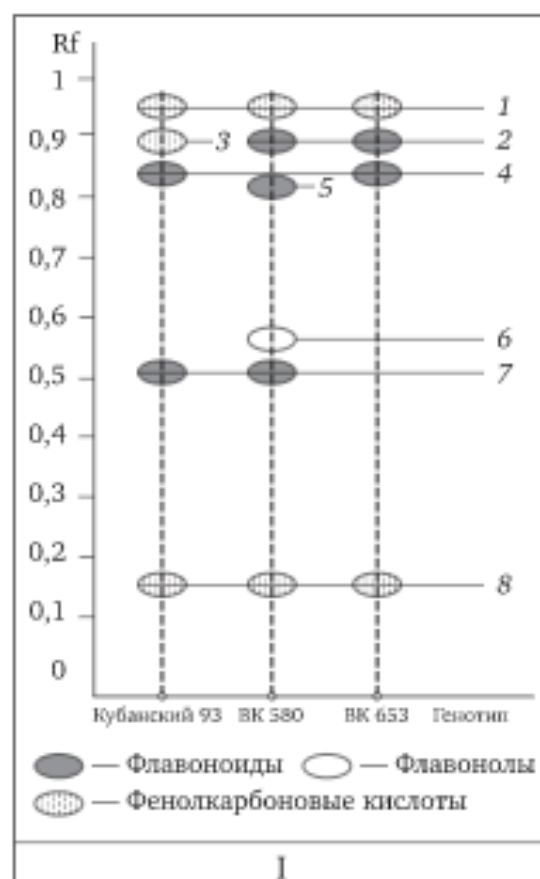
Одномерная хроматография показала, что у растений-регенерантов, полученных после селекции *in vitro*, число соединений фенольной природы увеличивается (рис. 5.14). Вероятно, это связано с изменением фенольного метаболизма, что и проявляется в более разнообразном составе синтезируемых веществ.



Рис. 5.14. Одномерная хроматограмма этанольных экстрактов фенольных соединений растений-регенерантов моркови:

- 1 — растения сорта *Rondo*, не подвергавшиеся действию КФ (контроль);
- 2, 3 — растения сорта *Rondo* и линии 906 соответственно, полученные после клеточной селекции;
- 1 — растворитель — н-бутанол + уксусная кислота + вода (40:12:28)

Аналогичные результаты были получены и при клеточной селекции картофеля на устойчивость к экзометаболитам гриба *Rhizoctonia solane*, а также подсолнечника на устойчивость к экзометаболитам гриба *Sclerotinia sclerotiorum* (рис. 5.15).



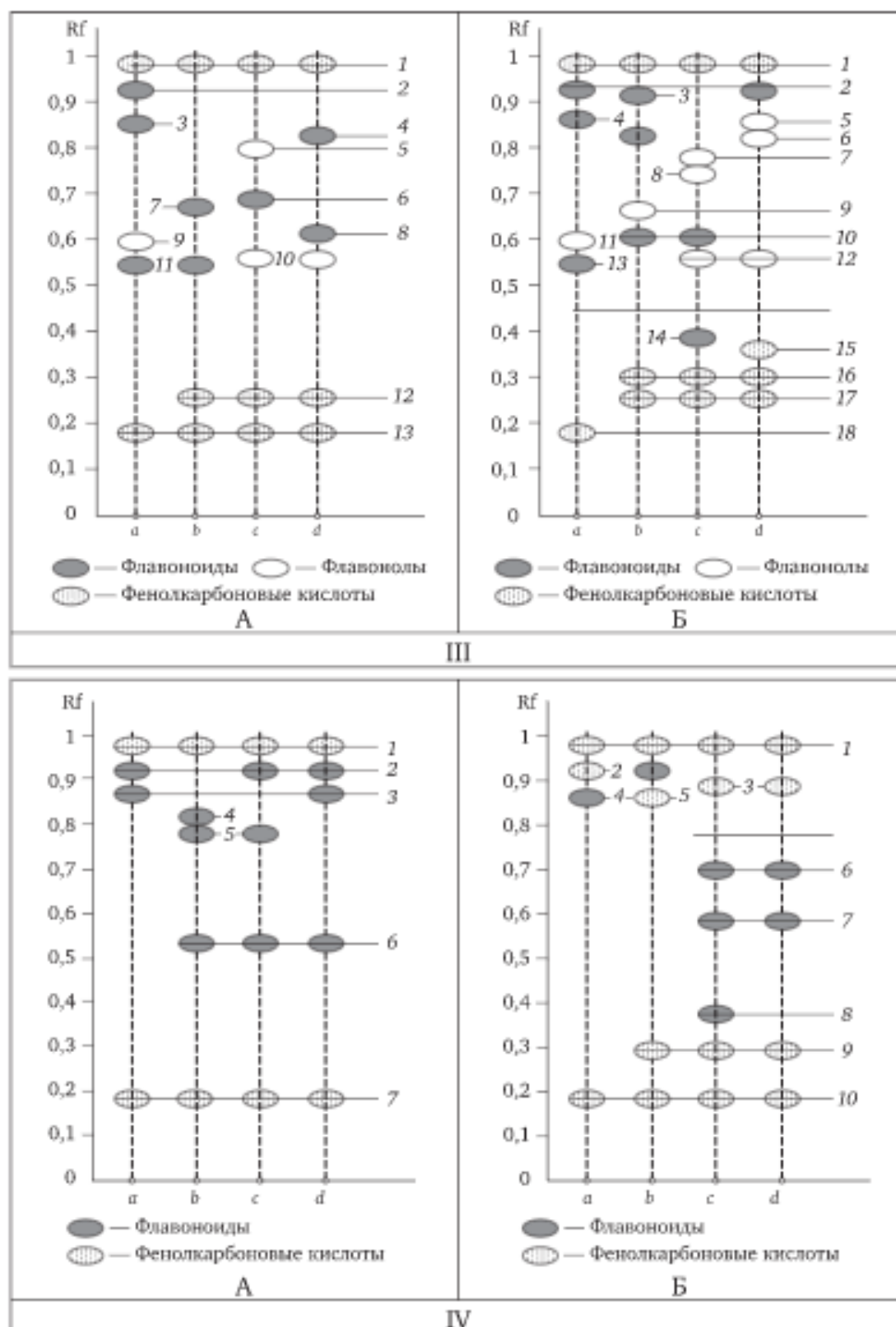


Рис. 5.15. Схема одномерной хроматограммы этанольных экстрактов фенольных соединений:

I — гипокотильные сегменты различных генотипов подсолнечника;
 II — каллусная культура сорта Кубанский 93; III — каллусная культура генотипа ВК 580; IV — каллусная культура генотипа ВК 653;
 А — контроль; Б — среда, содержащая культуральный фильтрат гриба *Sclerotinia sclerotiorum* в концентрации 15 %
 (а — гипокотиль, б — I пассаж, с — III пассаж, d — V пассаж)

Изложенная выше информация позволяет заключить, что присутствие экзометаболитов гриба *Alternaria radicina* при клеточной селекции моркови приводит к изменениям в их фенольном метаболизме. Это проявляется как на уровне накопления этих веществ вторичного метаболизма, так и на их качественном составе.

Контрольные вопросы и задания

1. Расскажите о схеме клеточной селекции, направленной на получение растений, устойчивых к грибным болезням.
2. Какие стрессовые факторы можно применять в работах по клеточной селекции на устойчивость растений к фитопатогенам?
3. Какой из перечисленных выше стрессовых факторов с большей вероятностью позволяет получать растения, обладающие устойчивостью к фитопатогенам?
4. Каково участие фитогормонов в клеточной селекции растений на устойчивость к экзометаболизму патогенных грибов?
5. Какова роль фенольных соединений в адаптации клеточных культур *in vitro* к действию экзометаболитов патогенных грибов?

Глава 22

ДОСТИЖЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ

Клеточная селекция и соматоклональная вариабельность. Изучение растений соматоклональных вариантов показало, что от растения-донора они отличаются не только моногенными качественными признаками, но и (что более важно практически) количественными полигенными признаками, такими как интенсивность роста, продуктивность, толерантность к неблагоприятным факторам окружающей среды (абиотические и биотические). Отмечены случаи появления соматоклональных вариантов, сочетающих признаки, которые невозможно или трудно соединить в одном генотипе методами традиционной селекции. Например, Л. Кучеренко (1986) отселектировала из соматоклональных вариантов, образовавшихся в каллусной ткани риса, растения, сочетающие скороспелость и длиннозерность. На их основе за короткий срок был создан новый сорт риса, названный «Биориза»; в Китае на основе соматоклонов — сорт риса, сочетающий скороспелость и устойчивость к пониженным температурам.

Практические результаты по использованию соматоклональных вариантов впервые были получены у сахарного тростника в начале 1970-х гг. на Гавайских островах. Среди регенерантов были отобраны растения, устойчивые к вирусам мучнистой росы. В результате получены различные формы сахарного тростника, устойчивые к болезням и с повышенным содержанием сахара (до 20 %).

Из длительно культивируемых каллусных тканей герани получены растения-регенеранты с измененной морфологией листовых пластинок и цветков, а также с измененным составом эфирных масел.

В нашей стране успешно развиваются работы по получению и оценке соматоклональных вариантов картофеля. Из большого числа линий, полученных из каллусной ткани двух изучаемых сортов картофеля отобраны и проверены в полевых условиях на стабильность те, которые обладают хозяйственно важными признаками, корректирующими отдельные недостатки исходного сорта. Так, после трехлетних полевых испытаний соматоклонов сорта «Любимец» удалось выделить линии, превосходящие сорт по урожайности, устойчивости к фитофторе и степени устойчивости к вирусам.

Создание соматклонов имеет большое значение для селекции зерновых культур, где традиционными методами создаются сорта на узкой наследственной основе. Анализ соматклонов, полученных разными группами исследователей из каллусной ткани сортов озимой и яровой пшеницы (*T. aestivum*), показал большую изменчивость среди соматклонов и отличие их от исходного сорта по таким морфологическим признакам, как высота растения, интенсивность кущения и число побегов, отношение колоса к солоmine, остистость или безостость колоса, его форма, окраска семян. По физиологическим признакам растения различались по времени вегетации, устойчивости к низким температурам и условиям перезимовывания и устойчивости к болезням.

Соматическая гибридизация. Гибридизация соматических клеток методом слияния протопластов, без сомнения, обогатила клеточную биологию. Появилась возможность изучать поведение гибридных ядерных геномов при разной степени таксономической удаленности партнеров. Межродовая соматическая гибридизация между картофелем (*S. tuberosum*) и томатом (*Lycopersicon esculentum*) позволила Д. Мельхерсу с сотрудниками (1978) получить гибридные растения двух типов, которые авторы называли «томато» и «помато», в зависимости от родовой характеристики хлоропластов гибрида. В первом случае хлоропласты были томатные, во втором — картофельные. Эти растения не обладали хозяйственно-полезными свойствами, но позволили наблюдать проявление признаков партнеров.

Ю. Глеба и Ф. Хоффман (1979) получили еще более отдаленный межтрибный гибрид методом слияния изолированных протопластов из каллусных клеток арабидопсиса (*A. thaliana*) и мезофилла листа турнепса (*Brassica campestris*). Цитологический и биохимический анализ подтвердил гибридную природу шести изученных клеточных клонов. Хромосомы обоих партнеров долгое время сохранялись без элиминации. В трех клонах авторы наблюдали стеблевой органогенез и появление уродливых пробирочных растений. Хромосомный анализ подтвердил их гибридный характер. Эти гибридные уродливые растения не цвели и не образовывали нормальных корней. В некоторых линиях, где большинство хромосом турнепса элиминировалось при субкультивировании, возникали более нормальные, похожие на арабидопсис растения, при сохранении хлоропластного генома турнепса.

Для доказательства того, что полученные растения являются истинными ядерными гибридами, авторы обычно изучают морфологические признаки, состав полипептидов малой субъединицы рибулозобисфосфаткарбоксилазы, кодируемой ядерными генами; проводят изозимный анализ, рестриктный анализ митохондриальной и хлоропластной ДНК для определения того, какие цитоплазма-

тические геномы унаследованы соматическим гибридом от партнеров по слиянию.

При межвидовой соматической гибридизации могут возникнуть как стерильные (*Z. pennelii*, *S. melongena* + *S. tismrifolium*), так и фертильные (*S. tuberosum* + *S. chacoense*, *S. tuberosum* + *S. brevidens*) растения. В последнем случае возникает возможность получить потомство от самоопыления или обратного скрещивания с культурными сортами. Последнее важно, так как часто у гибридов, например между сортами картофеля и дикими видами, преобладают признаки последних.

Соматический гибрид между *S. tuberosum*, сорт Приекульский ранний, и *S. chacoense*, полученный в 1979 г. Р. Г. Бутенко, имел ряд хозяйственно важных признаков. Была сделана попытка вовлечь его в практическую селекционную работу. Однако длительный процесс беккроссирования не позволил получить формы, в которых полностью отсутствовали признаки дикаря, хотя после восьми беккроссов был получен гибрид, несущий полевую устойчивость к Y-вирусу и хорошую продуктивность.

Гаплоидная селекция. Методом культуры пыльников в разных странах созданы высокоурожайные и устойчивые сорта риса (170 000 га) и пшеницы (70 000 га) — Китай. В Краснодаре этим же методом получены различные сорта риса, табака. В Поволжье с успехом применялся ячмень и тритикале. В разных центрах России с успехом был использован метод «Бульбозум». Для этого применялся *H. bulbosum* (дикий ячмень). Хромосомы гибридного зародыша F_1 и F_2 скрещивали с определенными формами *H. bulbosum*. При оплодотворении яйцеклетки *H. vulgare* пыльцой *H. bulbosum* отцовские хромосомы элиминируются и развивается гаплоидный зародыш. Нормальное развитие при этом тормозится и выращивание происходит *in vitro*. Гибридные проростки отбраковываются, а гаплоидные — обрабатываются колхицином для удвоения числа хромосом.

В Канаде так созданы новые сорта ячменя. В Одессе вместо 10—12 лет получены этим же методом С. Лукьянюк и С. Игнатовой (1983) сорта ячменя за 4—5 лет. При использовании метода «Бульбозум» эффективность получения негаплоидных растений невелика, растения-альбиносы не возникают. Этим же методом можно получить изогенные линии пшеницы, но для других видов злаков преимущество *bulbosum* не отмечалось.

Широкому использованию техники получения гаплоидов в культуре пыльников мешает низкая эффективность, которую можно считать как: 1) процент изолированных пыльников, образовавших в культуре эмбриониды или каллус из микроспор, 2) процент гаплоидных растений-регенерантов в расчете на изолированный пыль-

ник. Недостатком метода является также появление в большом числе (особенно у злаков) альбиносных растений-регенерантов¹.

Таким образом, создание гаплоидных растений разными методами *in vitro* позволяет быстро создать гомозиготные линии — и в этом ценность данной технологии для селекции. Некоторый скептицизм, проявляемый селекционерами, связан, в частности, с тем, что при использовании F_1 поколения рекомбинации могут произойти только в одном мейотическом цикле, этого недостаточно для обмена признаками, контролируемые полигенно. В качестве решения предлагается использование F_2 поколения либо половая гибридизация полученных *in vitro* регенерантов разных генотипов и повторный цикл получения гаплоидов *in vitro* у отселектированных половых гибридов.

Клональное микроразмножение растений. Во многих странах мира биоиндустрия микрклонального размножения поставлена на поточную промышленную основу и представлена десятками активно функционирующих предприятий. Например, во Франции 94 % всей продукции цветочных культур получают методом культуры изолированных тканей. В США около 100 коммерческих предприятий получают посадочный материал декоративных, овощных, полевых, плодовых и лесных культур методом клонального микроразмножения. Ведущим производителем оздоровленного посадочного материала цветочных растений является Голландия, а подвоев яблони, сливы и персика — Италия (до 250—500 тыс. ежегодно). В нашей стране также ведутся интенсивные работы по клональному микроразмножению растений, и в настоящее время многие научно-исследовательские институты и промышленные лаборатории разрабатывают и совершенствуют методы микроразмножения и оздоровления различных декоративных плодовых, ягодных, овощных, кормовых и древесных культур. Например, методы ускоренного размножения винограда, разработанные во Всесоюзном научно-исследовательском институте виноделия и виноградарства «Магарач», позволяют получать из одного одноглазкового черенка 8 тыс. растений в течение 4 месяцев. Оздоровление промышленных посадок малины от комплекса вирусных заболеваний путем сочетания термотерапии и культуры меристемы повышает продуктивность культуры в 6—8 раз. Размножение и получение безвирусного посадочного материала гвоздики, хризантемы, антуриума Андре, розы, бегонии Элтиор и др. ведется в специализированных цветоводческих хозяйствах «Элита» РФ и в меристематическом комплексе Республиканского концерна «Крымзеленстрой».

За последние десятилетия значительно расширились и углубились исследования по проблеме клонального микроразмножения

¹ Бутенко Р. Г. Биология клеток высших растений ...

винограда. Из-за недостаточной производительности существующих методов размножения посадочного материала продвижение в производство новых сортов затягивается на десятилетия. С учетом этого существует острая необходимость разработки и внедрения новых методов размножения винограда, в частности клонального микроразмножения.

Технология размножения винограда в условиях *in vitro* предусматривает следующие этапы: изолирование апикальной меристемы, которая представляет собой конус активно делящихся клеток высотой 0,2—0,4 мм, с последующим культивированием ее на питательной среде МС, содержащей ауксины и цитокинины в соотношении 1:10. В таких условиях формируется кластер побегов, который делят на отдельные микропобеги и самостоятельно культивируют на соответствующей питательной среде. Укоренение микропобегов осуществляют в условиях присутствия ИМК в питательной среде в концентрации 2 мг/л. Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки растений винограда из пробирки в почвенную смесь — весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом с длинными концами или специальным крючком. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85—90 °С в течение 1—2 ч.

Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1). Исключение составляют семейство орхидных, для которых готовят субстрат, состоящий из сфагнового мха, смеси торфа, листьев бука или дуба, сосновой коры (1:1:1). Приготовленным заранее почвенным субстратом заполняют пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20—22 °С), освещенностью не более 5 тыс. лк и влажностью 65—90 %. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают до полной адаптации растений.

Через 20—30 суток после посадки, хорошо укоренившиеся растения подкармливают растворами минеральных солей Кнудсона, Мурасига и Скуга, Чеснокова, Кнопа (в зависимости от вида растений) или комплексным минеральным удобрением. По мере роста растений их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений со-

ответствует принятой агротехнике выращивания для каждого индивидуального вида растений.

Криоконсервация. Базовые коллекции — криобанки, обеспечивают: 1) практически вечное хранение растительного материала; 2) значительную экономию затрат по сравнению с обычными коллекциями и даже депонированными; 3) гарантируют не только сохранность образца, но и сохранение всех его свойств без исключения; сохранение столь важной и значительной по объему части их генотипа, как блоки генов, отвечающие за рост культуры, пролиферацию клеток и биосинтез вторичных соединений, синтезируемых исходным растением и интересующих промышленность.

В коллекции Института физиологии растений имени К. А. Тимирязева РАН постоянно хранятся в криобанке следующие виды растений: *Daucus carota*, *Dioscorea deltoidea*, *Panax quinquefolius*, *Nicotiana sylvestris*, *Medicago sativa*, *Solanum tuberosum* (cv. Tava), *Triticum timofeevii*, *Triticum aestivum*, *Dioscorea balcanica* (органогенная каллусная ткань), *Dioscorea caucasica* (органогенная каллусная ткань), *Panax ginzeng* *Rhaponticum carthamoides*. Многие из этих растений после размораживания были способны к регенерации. Например, получены растения-регенеранты из каллусной ткани *Dioscorea balcanica* (органогенная каллусная ткань), *Dioscorea caucasica* (органогенная каллусная ткань), *Solanum tuberosum* (cv. Tava), *Daucus carota*. Также получено возобновление роста и формирование растений из меристем после хранения в жидком азоте для следующих культур: *Fragaria* $\times$ *ananassa*, *Solanum tuberosum*, *Rubus idaeus*, *Ribes nigrum*, *Digitalis lanata*, *Chamomila recutita*.

В табл. 5.12 приведены основные этапы и условия криоконсервации меристем земляники и малины.

Таблица 5.12

Криоконсервация меристематических верхушек земляники и малины (Высоцкая, 1997)

Этап и его продолжительность	Питательная среда	Условия
1. Размножение 1—4 месяца	Агаризованная питательная среда МС с цитокининами и сахарозой 3 %	$t = 20\text{—}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 16 ч/сут, освещенность 5—10 клк
2. Закаливание от 1 недели до 4 месяцев	Агаризованная питательная среда МС с цитокининами и повышенным содержанием сахаров 4—6 %	$t = 2\text{—}8\text{ }^{\circ}\text{C}$, темнота или свет до 8 ч/сут, освещенность 0,5—0,8 клк
3. Выделение апикальных верхушек от 2 до 6 ч	Жидкая среда МС с цитокининами и повышенным содержанием сахаров 4—6 %	$t = 15\text{—}205\text{ }^{\circ}\text{C}$, освещенность 0—0,8 клк

Этап и его продолжительность	Питательная среда	Условия
4. Предварительное культивирование апикальных верхушек с криопротекторами 19—36 ч	Жидкая среда МС с цитокининами и повышенным содержанием сахаров 5—6 % и диметилсульфоксидом (ДМС) 5—7 %	$t = 15\text{—}205\text{ }^{\circ}\text{C}$, темнота или свет до 0,8 клк
5. Замораживание: а) прямое: 1—10 мин до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$; б) программное: 2—3 ч до $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$	а) в растворе криопротекторов 5—6 % сахаров, 5—10 % ДМС; б) в криоампулах	а) $t = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$; $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, ледяная баня; б) криобаня от 0 до $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$
6. Размораживание	—	Водяная баня $t = 38\text{—}40\text{ }^{\circ}\text{C}$, оттаивание криоампул
7. Отмывание от криопротекторов	Среда МС с цитокининами	$t = 20\text{—}25\text{ }^{\circ}\text{C}$
8. Рекультивирование		$t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1—3 клк, 16 ч/сут
9. Размножение		$t = 20\text{—}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5—8 клк, 16 ч/сут
10. Укоренение		$t = 20\text{—}25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5—8 клк, 16 ч/сут
11. Высадка в грунт	—	—

Контрольные вопросы и задания

1. Приведите примеры достижений клеточной биотехнологии в растениеводстве.
2. Приведите примеры использования соматической изменчивости растений в растениеводстве.
3. Какие гибридные растения были получены методом соматической гибридизации?
4. Приведите примеры размножения растений в условиях *in vitro* в промышленных масштабах.
5. Какие сорта были получены на основе методов гаплоидии?
6. Какие достижения получены при работе с древесными листовыми культурами?
7. Какие достижения получены при работе с древесными хвойными культурами?
8. Какое практическое применение имеет криосохранение?
9. Что вы знаете о достижениях клеточной биотехнологии в России?
10. Что вы знаете о достижениях клеточной биотехнологии в мире?

Ситуационные задачи

1. Возможно ли создать гибриды путем слияния соматических клеток *in vivo*? В чем преимущество технологии создания неполовых гибридов *in vitro*? На чем основывается данная технология?

2. Для получения изолированных протопластов применяют ферментный раствор, в состав которого входит осмотик. С какой целью его вводят в раствор?

3. Слияние изолированных протопластов может происходить спонтанно, но этот процесс происходит довольно редко. Повысить эффективность слияния изолированных протопластов возможно с применением различных методических подходов. Перечислите факторы и индукторы слияния протопластов.

4. Чем объясняется активная работа исследователя с момента выделения изолированных протопластов до восстановления ими клеточной стенки?

5. Изолированные протопласты были выделены из мезофилла листа и корнеплода моркови. Можно ли на ранних этапах технологии по соматической гибридизации спрогнозировать конечный результат «получен гибрид»?

6. Для создания растений тритикале, устойчивых к засолению почвы, возможно применять методы клеточной селекции *in vitro*. Перечислите этапы и предложите последовательность работ в условиях *in vitro* по созданию солеустойчивых растений.

7. Для создания растений пшеницы, устойчивых к фитопатогену *Septoria nodorum*, возможно применять методы клеточной селекции *in vitro*. Перечислите этапы и предложите последовательность работ в условиях *in vitro* по созданию растений, устойчивых к болезни.

8. Для создания растений подсолнечника, устойчивых к *Sclerotinia sclerotiorum*, в качестве селективного фактора применяют культуральный фильтрат патогенов. Фитотоксичность КФ оценивают по прорастанию семян и их биометрическим показателям. Рассчитайте фитотоксичность КФ, если в контрольном варианте высота надземной части проростков подсолнечника составляет 4,3 см, а в варианте с КФ — 3,7 см. Объясните полученные результаты.

9. Рассчитайте фитотоксичность КФ, если в контрольном варианте длина подземной части проростков подсолнечника составляет 5,1 см, а в варианте с КФ — 6,7 см. Объясните полученные результаты.

Лабораторный практикум

Работа 1. Культура изолированных протопластов

Объяснение. Культуру изолированных протопластов применяют для создания новых гибридов. Метод основывается на слиянии соматических протопластов и называется соматической гибридизацией. Этот метод позволяет скрещивать отдаленные виды и получать гибриды, которые невозможно получить половым путем. При соматической гибридизации, как правило, происходит слияние двух протопластов. При слиянии трех протопластов и более гибриды получить невозможно.

Материалы и оборудование: мезофилл листа картофеля (табак), колбы Эрленмейера, стеклянные фильтры, насос Комовского, качалка, капроновая сетка № 70 (величина пор 93 мкм), центрифуга на 100—1000 об/мин, камера Фукса — Розенталя, чашки Петри, пастеровские пипетки, колбочки со стеклянными воронками, центрифужные пробирки на 10 мл, стерильные инструменты (скальпель, пинцет), реактивы (Д-маннит, НУК, 2,4-Д, сахароза, агар, стерильная питательная среда для культивирования протопластов).

Ход работы. Для опыта используют пробирочные растения картофеля, выращенные в пробирках на модифицированной питательной среде МС.

В стерильных условиях листья картофеля (возраст растений 15—20 суток с момента посадки черенка на среду) нарезают узкими полосками (до 1 мм) и помещают в ферментный раствор в 100 мл колбы Эрленмейера (0,25 г листовой ткани на 10 мл раствора). В качестве фермента наибольший эффект оказывает ксилантаза в концентрации 2 % при pH инкубационного раствора 6,1. Ферментный раствор профильтровывают через стеклянные фильтры в течение 3—4 мин с помощью вакуум-насоса Комовского. Ткань оставляют на поверхности раствора на 5 ч при температуре 25 °С на качалке (80 об/мин). За это время практически все протопласты мезофилла листа освобождаются от клеточных стенок и суспендируются в инкубационной среде.

Для удаления остатков эпидермиса и жилок листа суспензию протопластов профильтровывают, затем отмывают ее от ферментов двукратным центрифугированием в растворе маннита той же концентрации с добавлением 0,05 % $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. На отсутствие клеточной стенки указывает факт того, что в присутствии ПЭГ с молекулярным весом 2000 и концентрацией 25 % протопласты легко сливаются.

Изолированные протопласты очень чувствительны к осмотическому давлению раствора и роду осмотика. Для высева протопласты суспендируют до плотности 130 000 протопластов в 1 мл (плотность определяют в камере Фукса — Розенталя).

Культивируют протопласты в жидкой модифицированной питательной среде МС. Концентрация маннита составляет 0,35 М, НУК — 3 мг/л, 2,4-Д — 2 мг/л, сахарозы — 20 г/л. В чашки Петри стерильно наливают по 1,5 мл суспензии и оставляют в световой комнате. Условия культивирования: 25 °С, 16-часовой фотопериод.

Работа 2. Слияние растительных протопластов. Механическая изоляция и культивирование единичных гетерокариоцитов

Объяснение. Новые, более совершенные растительные формы до последнего времени создавались лишь путем полового скрещивания и последующего отбора желаемых генотипов, что накладывало ряд ограничений как на возможности комбинирования генов, так и на скорость селекционного процесса. Разработка технологии соматической гибридизации путем слияния протопластов и регенерации продуктов слияния до целых растений позволяет обойти часть ограничений, свойственных половому процессу, и открывает перспективы перед генетиками, физиологами, биохимиками и селекционерами.

Материалы и оборудование: инвертированный микроскоп, центрифуга на 1000 об/мин, полуавтоматическая пипетка на 1 мкл, растительный материал (пробирочные растения, каллусная ткань), ферментные смеси для выделения протопластов, стерильные чашки Петри, наконечники для микропипеток, лабораторная посуда и инструменты для выделения и культивирования протопластов по стандартным методикам.

Ход работы. Источником получения каллусных протопластов могут быть как свежееиндуцированные (1—2 пассажа), так и длительно выращиваемые каллусные ткани, предварительно прошедшие 2—3 пассажа на агаризованных или жидких питательных средах в темноте при температуре 25 °С. Материалом для получения мезофильных протопластов могут служить листья растений, выращенные в теплице или поле. Более удобны для работы листья асептически выращиваемых в световой комнате растений.

Для получения большого количества протопластов из каллусной ткани используют ферментную смесь, приготовленную на основе среды W-5, а мезофильных — на 0,45 М растворе маннитола или 0,5 М сахарозы. Ферментацию проводят при температуре 20—25 °С в течение 10—16 ч в темноте.

Изолированные протопласты фильтруют через воронку с капроновой сеткой (диаметр пор 60—100 мкм), фильтрат центрифугируют 3—4 мин при 500—700 об/мин. Надосадочную жидкость сливают,

протопласты ресуспендируют в 10 мл среды W-5 или 0,45 М раствора маннитола, процедуру повторяют 1—2 раза.

Слияние протопластов. Индуцированное слияние протопластов обычно проводят по методике «ПЭГ — высокая pH — высокое содержание ионов Ca».

Отмытые от ферментного раствора каллусные и мезофильные протопласты смешивают в соотношении 1:1 или 2:1 в конечном объеме суспензии 1—2 мл. Суспензию протопластов пипеткой наносят в чашки Петри диаметром 4 см и оставляют на 10—20 мин для осаждения. Диаметр наносимой капли равен приблизительно 1 см. Через 10—20 мин к смеси осевших на дно чашки Петри протопластов осторожно добавляют сверху или сбоку 1—3 капли раствора ПЭГ и выдерживают 5—25 мин. Происходят слипание и агрегация родительских протопластов, сцепленных с дном чашки Петри. Они меняют свою сферическую форму и слегка плазмолизируются с одновременным превращением 2—3-слойного осадка протопластов в однослойную «сеточку».

Через 20—25 мин к препарату добавляют 5—6 капель буферного раствора. С интервалом 10 мин процедуру повторяют дважды. В зависимости от конкретного растительного материала разбавление буферной смесью можно проводить один раз, добавляя при этом 0,5—1,0 мл буферной смеси на чашку.

После 30 мин обработки препарата буферной смесью раствор «ПЭГ — буфер» осторожно отбирают пипеткой, не оголяя слоя протопластов, и троекратно, с интервалом 5—10 мин, отмывают питательной средой МО-1 (общий объем 8—10 мл). В дальнейшем смесь гибридных и родительских протопластов культивируют в тонком слое питательной среды МО-1 (1 мл) на рассеянном свете при температуре 25 °C 3—10 суток.

Механическая изоляция и культивирование индивидуальных продуктов слияния. После слияния смесь гибридных и родительских протопластов культивируют на богатых органическими компонентами питательных средах до наступления первых делений в гибридных клетках. Обычно они активно делятся на питательных средах, индуцирующих деление каллусных протопластов одного из родителей, хотя подбор оптимальной среды почти всегда решается эмпирическим путем. За 2—12 ч до начала работы по механическому «отлову» единичных продуктов слияния культуру протопластов разбавляют свежей питательной средой (в 5—10 раз) и переносят в чашки Петри диаметром 6 см. Одновременно готовят чашки Купрака. Их внешняя камера заполняется раствором 0,25 М маннитола (для создания необходимой влажности). Номерные ячейки внутренней камеры заполняют питательной средой объемом 0,5 мл.

Делящиеся гибридные клетки отбирают полуавтоматической микропипеткой на 1 мл. С помощью инвертированного микроскопа

идентифицируют продукты слияния, претерпевшие два-три деления. Они имеют морфологию каллусных клеток, но содержат вокруг ядра и частично в цитоплазме зеленые хлоропласты, происходящие от мезофильных протопластов второго родителя. Для «отлова» клеток микроскоп настраивают на 100—200-кратное увеличение. Наконечник микропипетки подводят к гибридной клетке и начинают медленно втягивать 1 мкл среды. Отобранную клетку осторожно вдавливают в номерную ячейку внутренней камеры чашки Купрака, микропипетку при этом держат вертикально, не касаясь наконечником дна ячейки. В чашке Купрака делящиеся гетерокариоциты культивируют 6—8 дней, после чего в каждую ячейку добавляют по 1 мкл свежей среды. Через 14—20 дней гибридные колонии помещают в капли (100—200 мкл) свежей питательной среды и постепенно (через 5—6 дней) пересаживают на среду с пониженной концентрацией осмотика (по схеме 0,45 М — 0,3 М — 0,2 М).

После 7-суточного роста на жидкой питательной среде с 0,2 М осмотика колонии гибридных клеток делят на две части. Одну часть переносят на агаризованные питательные среды с цитокининами для индукции органогенеза, а другую используют для цитогенетического анализа с целью изучения числа и морфологии хромосом и доказательства гибридности по клеточному ядру.

В ряде случаев, в зависимости от использования конкретного растительного материала, удастся довольно четко идентифицировать гибридные клоны на стадии 10 клеток и более. Тогда операцию по механическому изолированию можно упростить, высаживая «отловленные» клоны в капли полужидкой среды для культивирования объемом 30—50 мкл. Подобные среды готовят путем добавления к жидкой питательной среде 0,2 % агара. Мини-капли (10—15 шт.) наносят микропипеткой в чашку Петри диаметром 4 см, предварительно заполнив полужидкой средой ее боковое пространство (по периметру) для поддержания необходимой влажности. Через 15—20 суток проводят пересадку микроколоний на среды с пониженной концентрацией осмотика по схеме, описанной ранее.

Работа 3. Высев суспензии на селективные среды с добавлением NaCl

Объяснение. Одним из лимитирующих факторов сельскохозяйственной продуктивности растений является засоление почв. Около 900 млн га всех земель нашей планеты имеют повышенное содержание солей, а количество засоленных почв с каждым годом возрастает.

Материалы и оборудование: суспензионная культура табака или картофеля, стерильные чашки Петри, стерильный цилиндр, среда для роста каллусной ткани: 0; 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 % NaCl (всего пять вариантов), стерильные инструменты, спиртовка, спирт, спички.

Ход работы. Суспензию наливают в стерильный цилиндр и дают отстояться 5 мин. Отбирают 10 мл верхней фракции суспензии (она обогащена одиночными клетками) и смешивают в стерильном цилиндре с 10 мл среды без NaCl (контроль), расплавленной и охлажденной до 40 °С. После этого быстро разливают содержимое цилиндра в пять чашек Петри диаметром 6 см, дают застыть среде и чашки после этого закрывают парафином. Ту же операцию проводят со средами, содержащие 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 % NaCl. Плотность посева суспензии равен 10 000 клеток в 1 мл. Через 4 недели подсчитывают в каждой чашке Петри образовавшиеся колонии клеток размером более 1 мм. Сравнивают количество колоний на селективных средах и в контрольном варианте, принимая при этом контроль за 100 %. Определяют эффективность посева (ЭВ) при каждой концентрации NaCl по формуле

$$\text{ЭВ} = \frac{\text{Число образовавшихся колоний}}{\text{Количество посеянных клеток}} \cdot 100$$

Колонии клеток, образовавшиеся на среде, содержащей NaCl в концентрации 1,5 и 2,0 %, пересаживают на среду для морфогенеза, в которую также добавляют хлорид натрия. Сформировавшиеся растения проверяют на устойчивость к NaCl (1,0 %) и сравнивают их с исходными растениями (из которых был получен каллус для суспензии) или с растениями, регенерировавшими из клеточных колоний, полученных в контрольном варианте.

Работа 4. Получение культурального фильтрата патогенов

Объяснение. Для увеличения производства продуктов питания экономически важной представляется защита растений от болезней и вредителей. Уже сейчас просматриваются реальные перспективы применения клеточной селекции на устойчивость.

Наиболее простой подход в селекции *in vitro* на устойчивость к болезням связан с культивированием клеток непосредственно в присутствии патогенна или культурального фильтрата гриба.

Материалы и оборудование: чистая культура фитопатогена, конические колбы с жидкой питательной средой Чапека, фильтровальная бумага, бактериальный фильтр с порами 0,45 мкм (фирма Millipore), спектрофотометр.

Ход работы. Фитопатоген выращивают в жидкой питательной среде, содержащей минеральные соли по прописи Чапека, сахарозу — 2 %, инозит — 100 мг/л. Культуральную жидкость получают, выращивая изоляты гриба в колбах объемом 100 мл в 50 мл жидкой питательной среды на качалке при скорости вращения 100 об/мин. Срок выращивания 25—30 суток. В каждую колбу вносят по пять кусочков агара размером 0,5×0,5 см, содержащих 10⁵ конидий гриба. Через 25—30 суток содержимое колбы фильтруют через бумажный

фильтр, а затем полученный раствор пропускают через бактериальный фильтр с пораи 0,45 мкм (фирма *Millipore*).

Определяют оптическую плотность культурального фильтрата на спектрофотометре.

Работа 5. Определение фитотоксичности культурального фильтрата патогена

Объяснение. Для проведения работ по клеточной и тканевой селекции растений в условиях *in vitro* в качестве объекта исследования могут быть использованы каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты, а в качестве селективного агента с успехом применяют патотоксины, культуральные фильтраты патогенов и непосредственно патоген. Наиболее простой подход в селекции *in vitro* на устойчивость к болезням связан с культивированием клеток растений на питательных средах в присутствии культурального фильтрата патогена.

Материалы и оборудование: культуральный фильтрат патогена, фильтровальная бумага, чашки Петри, семена пшеницы.

Ход работы. Определение фитотоксичности культурального фильтрата патогена можно проводить на семенах, зрелых зародышах, пробирочных растениях или каллусной ткани. Изучаемые концентрации КФ — 25, 50, 75 и 100 %. В качестве контроля используют дистиллированную воду.

Семена (пшеницы и других культур) раскладывают на фильтровальную бумагу, смоченную КФ патогена в различных концентрациях. Через 7 суток измеряют биометрические показатели проростков: длину надземной и подземной частей проростков. В каждом опыте используют 50 эксплантов.

Токсичность КФ и самого патогена определяют по методике О. А. Берестецкого (Берестецкий, 1973) и рассчитывают по формуле

$$T = 100\% - \frac{l_{\text{оп}}}{l_{\text{к}}} \cdot 100,$$

где T — токсичность КФ или гриба на агаре; $l_{\text{оп}}$ — сумма длин проростков на КФ или агаре; $l_{\text{к}}$ — сумма длин проростков на воде (контроль).

Раздел VI

ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРИИ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТ ПО КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

В результате изучения учебного материала данного раздела обучающиеся должны:

знать

- принципы организации биотехнологической лаборатории;
- необходимое оборудование для работы с культурой клеток и тканей растений;
- расходные материалы для проведения научных исследований в лаборатории;

уметь

- планировать работу в лаборатории;
- рационально использовать приборы и оборудование;
- производить экономические и производственные расчеты, необходимые при организации биотехнологической лаборатории;

владеть

- организаторскими навыками создания лаборатории по биотехнологии растений.
-

Глава 23

МОДЕЛИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ. ПРИНЦИПЫ СОЗДАНИЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

В настоящее время активно работают биотехнологические лаборатории в Нидерландах, США, Бельгии, Польше и других странах мира. Функционирование лаборатории позволяет производить генетически однородный, качественный, к определенному сроку, выровненный посадочный материал, создавать новые формы растений. При организации таких лабораторий необходимо правильно задать параметры производства, на основе чего рассчитать площадь помещений, необходимых для проведения такого плана научных изысканий.

При организации лаборатории необходимо определить: цели и направления исследований; предполагаемое количество размножаемого посадочного материала; знать средний коэффициент размножения растений; штат сотрудников в лаборатории; определить и разделить этапы работ в лаборатории и т. д. Все эти факторы играют важную роль при расчете необходимой площади и планирования помещений в лаборатории.

Главным условием функционирования лаборатории является соблюдение строгой стерильности во всех помещениях.

23.1. Архитектурно-хозяйственная структура лаборатории

Лаборатория клеточной инженерии растений включает в себя несколько помещений, среди которых:

- лаборантская;
- моечная;
- автоклавная;
- комната для проведения стерильной работы;
- световая комната;
- комната для обработки и хранения информации по исследованиям;

- адаптационная;
- раздевалка;
- складская комната.

Лаборантская комната предназначена для приготовления питательных сред. В ней необходимо следующее:

- наличие холодной и горячей воды, где установлены одна-две глубокие раковины-мойки;
- контур заземления, подводка силовой линии (220/380 В);
- лабораторные столы, шкафы для хранения чистой посуды и необходимых реактивов;
- холодильники (холодильники на +4 °С и морозильные камеры) для хранения химических реактивов;
- аналитические (электронные) весы (точность до 0,0001 г);
- электроплитки (или колбонагреватели);
- рН-метр лабораторный любого типа;
- посуда химическая и биологическая для приготовления, хранения и стерилизации питательных сред;
- пипетки и микропипетки (0,01—10 мл);
- инструмент (шпатели, металлические пинцеты, скальпели и т. д.).

Возможна установка дистиллятора для использования дистиллированной воды в приготовлении питательных сред.

Моечная комната используется для мытья химической и биологической посуды. Данная комната оснащена моечными машинами (по возможности), глубокими раковинами-мойками, контуром заземления, подводкой силовой линии (220/380 В); снабжена холодной и горячей водой, дистиллированной водой для споласкивания чистой посуды (дистиллятор и (или) бидистиллятор любой марки с производительностью не менее 3 л/ч, бутылки для хранения дистиллированной воды); желательно использовать закрывающиеся шкафы для временного хранения грязной и чистой посуды; ультрафиолетовые лампы для периодического обеззараживания комнаты. Желательно располагать моечную комнату изолированно, без контактирования со стерильными материалами, посудой, растениями. При выходе из комнаты необходимо использовать специальный коврик, пропитанный стерилизующими компонентами.

Автоклавная комната предназначена для стерилизации питательных сред, инструментов и вспомогательных материалов, оборудуется контуром заземления, подводкой силовой линии (220/380 В); вертикальными или горизонтальными автоклавами, сушильными шкафами для стерилизации сухим жаром посуды и инструментов, стеллажами для временного хранения стерилизуемых и стерильных сред и материалов, возможна установка дистиллятора для использования дистиллированной воды в приготовлении питательных сред

и автоклавирования. Желательно установить УФ лампы для периодической стерилизации комнаты.

Комната для проведения стерильной работы (бокс, операционная комната) предназначена для введения растительного материала в культуру *in vitro* и пересадки микрокультуры. Просторное помещение, изолированное от источников загрязнения, снабженное временным реле с УФ лампами для периодической стерилизации комнаты. Стерильность можно также поддерживать с помощью воздухоочистительных кондиционеров или специального оборудования. Все манипуляции с растительным материалом проводятся в ламинар-боксах, желательно 2-го класса защиты. Стены, полы и потолок покрывают быстросохнущими материалами, которые легко мыть, не разрушающиеся под действием УФ излучения.

Световая (культуральная) комната используется для выращивания растительных тканей в условиях *in vitro*. Для регулирования температурного режима и влажности удобно использовать кондиционер или систему климат-контроля, при этом относительная влажность воздуха должна составлять 70 %. При необходимости данную комнату оснащают установками для культивирования клеточных суспензий (качалки), климатическими камерами. Для выращивания растительного материала *in vitro* чаще всего используют стеллажи с двумя — четырьмя полками, оптимальный размер которых составляет: длина — 60—80 см, высота полок — не менее 40 см. При необходимости соблюдения режима день/ночь устанавливают таймеры (временные реле). Для длительного хранения (депонирования) микрокультуры используют холодильные установки с температурным режимом от -5°C до $+14^{\circ}\text{C}$ с подсветкой. Удобно иметь отдельную небольшую световую комнату для культивирования растительного материала на этапе введения в культуру тканей.

Комната для обработки и хранения информации по исследованиям необходима для планирования, обработки и хранения экспериментов.

Адаптационная комната используется для адаптации микрорастений к почвенным или гидропонным условиям выращивания. Для этого применяют стеллажи для ящиков (горшочков) с грунтом или гидропонные установки. Если адаптацию проводят в течение всего года, то необходимо применять дополнительное освещение для растений. Данное помещение необходимо оснастить горячей и холодной водой, а также выделить место для пересадки растений из условий *in vitro* в *in vivo*.

Раздевалка необходима для смены одежды и обуви.

Складская комната используется для хранения химических реактивов, запасной биологической и химической посуды, моющих средств, запаса расходных материалов, возможно хранение герметично закрытого грунта и чистой тары для адаптации растений.

23.2. Расходные материалы, необходимые для проведения работ по клеточной инженерии растений

Необходимые расходные и другие материалы:

- на этапе введения в культуру *in vitro* удобно использовать биологические пробирки с ватными пробками. Следовательно, количество штативов должно соответствовать количеству и диаметру пробирок. Ватные пробки изготавливают из негигроскопичной нестерильной ваты и марли;
- при автоклавировании для колб и стаканов делают крышечки из фольги и плотной (крафт) бумаги;
- матрасики — плотная бумага для манипуляций и хранения инструмента во время работы в ламинар-боксе;
- парафильм или полиэтиленовая пленка для заматывания чашек Петри, пробирок, культуральных сосудов;
- оберточная плотная бумага (крафт) для упаковывания инструментов, матрасиков и других материалов для стерилизации;
- спирт (96 %) для стерилизации рук, инструментов, перчаток (если используются), растительного материала, рабочей поверхности ламинар-бокса;
- вата для дезинфекции рук и рабочей поверхности ламинар-бокса.

Инструменты в настоящее время представлены как одноразовыми (уже стерильными), так и многоразовыми скальпелями, пинцетами. Для работы с биологическими пробирками необходимо иметь по два скальпеля и длинных узких пинцета на одного сотрудника. При этом скальпели бывают одноразовые пластмассовые в стерильной упаковке и многоразовые металлические цельные (брюшистые) и со съемными лезвиями. Удобнее использовать одноразовые или со съемными лезвиями скальпели.

Для стерилизации инструментов обжигом при работе в ламинар-боксе используют керамические стаканчики или устойчивые бутылочки из толстого стекла.

При изолировании почек удобно применять металлические иглы.

Для приготовления питательных сред используют металлические и пластиковые шпатели и ложечки.

Навески сухих порошкообразных реактивов удобно взвешивать в легких пластиковых емкостях. Для ядовитых веществ, таких как сулема и диацид (ртутьсодержащие), емкости для взвешивания используют однократно, затем их утилизируют.

Посуда химическая и биологическая изготавливается из различных видов пластика (полипропилен, полистирен, полиэтилен) и стекла. Если нет возможности все время контролировать, что можно и что нельзя для пластика, лучше пользоваться стеклянной посудой, так как нет ограничений по использованию моющих аген-

тов, времени и температурного режима сушки и стерилизации. Например, посуда из полистирена не выдерживает воздействие фенола, хлороформа, ДМСО, диметилформамида; полипропиленовые пробирки и банки можно автоклавировать при 121 °С, они выдерживают воздействие большинства кислот, спиртов и щелочей, но не выдерживают влияния органических растворителей.

Для приготовления и выращивания растений в культуре *in vitro* подойдет стекло любого качества. В работе обычно используют:

- колбы Эйленмейера (конические) на 0,5; 1; 2; 3; 5 л;
- колбы мерные на 50, 100, 200, 250, 500 мл и 1 л;
- стаканы химические на 50, 100, 200, 250, 500 мл и 1 л;
- цилиндры мерные от 10 мл до 1 л;
- пробирки биологические (длина 20 см, диаметр — не менее 20 мм);
- банки стеклянные из темного стекла для хранения маточных растворов (на 0,5, 1 и 2 л);
- стаканы стеклянные для стерилизации растительного материала (на 150—250 мл);
- чашки Петри, чашки Анумбра;
- банки для стерилизации дистиллированной воды (на 0,3—1 л);
- микропипетки (от 0,001 до 1,0 мл) и носики к ним;
- пипетки от 0,1 до 5 мл (можно использовать одноразовые стерильные шприцы на 1—20 мл);
- спиртовки (если пламя спиртовки в ламинар-боксе не прямое (ровно вверх), то использовать лучше металлические спиртовки);
- стаканы для стерилизации инструментов.

23.3. Экономические и производственные расчеты, необходимые при организации лаборатории по клеточной инженерии растений

При создании лаборатории необходимо четко определить:

- цель создания лаборатории (например, получение большого количества растений или создание новых форм);
- предполагаемое конечное количество размноженных растений в год;
- перечень культур;
- средний коэффициент размножения выбранных растений (например, для хризантем — 15—20 растений за один пассаж, где пассаж — 40—45 дней);
- необходимый штат сотрудников (при возможности одного сотрудника пересаживать от 15 до 30 тыс. растений ежемесячно с соблюдением условий стерильности);

- обязанности сотрудников и их размещение по соответствующим рабочим местам.

Таким образом, можно правильно рассчитать площадь, штатные единицы, сроки получения посадочного материала, финансовые затраты на открытие лаборатории по клональному микроразмножению.

Например, когда открывается лаборатория клеточной инженерии, цель которой — получение посадочного материала при предполагаемой производительности лаборатории 1 000 000 растений ежегодно, для организации такой лаборатории необходимы финансовые затраты.

Лаборатория *in vitro* без адаптации микрорастений должна закупить следующее оборудование:

- дистиллятор, производительность 25 л в час — 1 шт.;
- автоклав с горизонтальной загрузкой объемом 100 л (Россия) — 1 шт.;
- ламинар-бокс с горизонтальной или вертикальной подачей воздуха, II класс защиты — 6 шт.;
- сушильный шкаф (для посуды) — 2 шт.;
- металлические инструменты (скальпель, пинцет) — 10 наборов;
- биологическая посуда — выбор по сортименту;
- стеллажи трехъярусные для выращивания растений *in vitro* (размер 1500×2500×700 мм) — 15 шт.;
- весы, pH-метр — по 1 шт.

Расходные материалы:

- минеральные соли для приготовления питательной среды по прописи Мурасига и Скуга;
- регуляторы роста из группы ауксинов и цитокининов;
- витамины (пиридоксин, тиамин, никотиновая кислота);
- сахароза, глюкоза;
- агар;
- стерилизующий агент «Белизна» — по мере необходимости;
- спирт — примерно 200 л/год;
- пищевая пленка для закрытия пробирок и чашек Петри;
- крафт-бумага;
- вата, марля;
- моющие агенты, ершики, губки и т. д.

Растительный материал *in vitro* выращивают в световой комнате, площадь которой¹ составляет, м²:

- одна полка — 625;
- две полки — 312,5;

¹ Под площадью понимается «чистая рабочая» поверхность (то, что занято микрокультурой, без проходов).

- три полки — 208,4;
- четыре полки — 156,3.

Персонал. Для получения 1 млн растений в год лаборатория должна быть оснащена 8—10 штатными единицами: 2—4 лаборанта и 6—8 научных сотрудников. Средняя работоспособность человека — 15—30 тыс. растений ежемесячно в зависимости от вида культуры. Персонал лаборатории не занимается адаптацией пробирочных микрорастений к почвенным условиям.

Расчет сроков получения растений. При введении в культуру *in vitro* продолжительность первого этапа составляет до 2 месяцев — время привыкания первичных эксплантов к условиям *in vitro*, при этом массовое нарастание происходит только к концу субкультивирования, а следовательно, это время не учитывается при расчете и равно единице.

Укоренение можно проводить двумя способами: на питательной среде или непосредственно в почве. В первом случае при расчете коэффициента размножения 1 месяц не учитывается, так как нарастание посадочного материала в этот период не происходит.

На адаптационный процесс отводится 1 месяц, при этом возможно наблюдать максимальную гибель микрорастений.

Контрольные вопросы и задания

1. Перечислите основные помещения, необходимые для создания лаборатории по клеточной инженерии растений.
2. Назовите расходные материалы, необходимые для проведения работ по клеточной инженерии растений.
3. Как рассчитать площадь, необходимую для создания лаборатории по клеточной инженерии растений?

Деловая игра «Судебное дело»

1. Определение задания.

Задание: Компания X подала в суд на лабораторию Y в связи с тем, что полученный посадочный материал (картофель и другие культуры) не соответствует параметрам, прописанным в договоре между этими организациями. Команды «Истец» и «Ответчик» должны привести аргументы в свою защиту.

2. Деление группы на команды «Истец», «Ответчик», выбор судьей 12 присяжных.

3. Проведение судебного разбирательства:

- предъявление иска со стороны команды «Истец» на основании составленного договора;
- выступление капитана команды «Истец» с предъявлением иска;
- ответ капитана команды «Ответчик» на претензии со стороны команды «Истец»;
- судья вызывает свидетелей, выступающих за команду «Ответчик»;
- предоставление в зале суда аргументированных доказательств со стороны команд;
- выступление адвокатов двух сторон;
- выступление присяжных;
- вынесение вердикта судьей.

Кейс-задачи

Задача 1. Для размножения любых растений в условиях *in vitro* применяют четыре способа размножения: 1) активация развития существующих меристем; 2) индукция образования адвентивных почек; 3) соматический эмбриогенез; 4) образование растений из первичной каллусной ткани.

Объясните, почему для злаковых культур возможен только один способ размножения в условиях *in vitro*?

Задача 2. Для оздоровления посадочного материала от вирусов применяют три способа: 1) изолирование меристем; 2) термотерапия; 3) хемотерапия.

Объясните, почему для получения безвирусного посадочного материала картофеля применяют культуру изолированных меристем?

Библиографический список

Основная литература

1. Биотехнология. В 2 частях : учебник и практикум для академического бакалавриата / под общей редакцией Н. В. Загоскиной, Л. В. Назаренко. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2019.
2. Биотехнология растений : учебник и практикум для бакалавриата и магистратуры / Л. В. Назаренко, Ю. И. Долгих, Н. В. Загоскина, Г. Н. Радугина. — 2-е изд., испр. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2019.
3. Бутенко, Р. Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе : учебное пособие / Р. Г. Бутенко. — Москва : ФБК-ПРЕСС, 1999.
4. Калашникова, Е. А. Клеточная инженерия растений : учебное пособие / Е. А. Калашникова. — Москва : Изд-во РГАУ-МСХА, 2012.
5. Калашникова, Е. А. Основы биотехнологии : учебное пособие / Е. А. Калашникова, М. Ю. Чередниченко. — Москва : Изд-во РГАУ-МСХА, 2016.
6. Калашникова, Е. А. Современные аспекты биотехнологии : учебно-методическое пособие / Е. А. Калашникова, Р. Н. Киракосян. — Москва : Изд-во РГАУ-МСХА, 2016.
7. Лутова, Л. А. Генная и клеточная инженерия в биотехнологии высших растений / Л. А. Лутова, Т. В. Матвеева ; под редакцией И. А. Тихоновича. — Санкт-Петербург : Эко-Вектор, 2016.
8. Сельскохозяйственная биотехнология и биоинженерия : учебник / под редакцией В. С. Шевелухи. — 4-е изд., перераб. и доп. — Москва : URSS, 2015.
9. Чечина, О. Н. Сельскохозяйственная биотехнология : учебное пособие для СПО / О. Н. Чечина. — 2-е изд., перераб. и доп. — Москва : Издательство Юрайт, 2019.

Дополнительная литература

1. Генетические основы селекции растений. В 4 томах. Т. 2. Биотехнология селекции растений. Клеточная инженерия / научные редакторы А. В. Кильчевский, Л. В. Хотылева. — Минск : Беларуская навука, 2010.
2. Лабораторный практикум по сельскохозяйственной биотехнологии. — 2-е изд. — Москва : Изд-во РГАУ-МСХА, 2014.
3. Лабораторный практикум по культуре тканей и клеток растений. — Москва : Изд-во РГАУ-МСХА, 2017.

Глоссарий

Адаптация — совокупность приспособительных реакций растений, поддерживающих их устойчивость к различным условиям внешней среды на всем протяжении онтогенеза и обуславливающих возможность существования отдельных индивидуумов и сохранения вида в определенных экологических условиях.

Акклиматизация — приспособление роста, развития и всей жизнедеятельности растения к изменившимся условиям окружающей среды при выращивании растений в непривычных климатических условиях.

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

Акропетальный транспорт — транспорт веществ в растении по направлению к апикальным меристемам стебля.

Анеуплоид — ядро, клетка, организм с числом хромосом, отклоняющимся от X и от чисел, кратных X .

Андрогенез — процесс возникновения растения из микроспоры или пыльцевого зерна через соматический эмбриогенез либо через образование каллуса.

Апекс — верхушечная часть стебля и корня, включающая в себя меристему с активно делящимися клетками.

Апекс стебля — верхняя часть стебля с зонами центральной, субапикальной и органогенной (боковой).

Апекс корня — верхняя часть корня с меристематическими, активно делящимися клетками и с покоящимся центром.

Апикальное доминирование — явление подавления роста верхушечных почек боковых побегов гормонами, вырабатываемыми в апикальной меристеме.

Аутосомы — набор хромосом, не включающий половые хромосомы (обозначаются цифрами: 1, 2, 3 и т. д.).

Базипетальный транспорт — транспорт веществ в растении по направлению к апикальным меристемам корня.

Биотехнология классическая — наука о методах и технологиях производства, хранения и переработки сельскохозяйственной и другой продукции с использованием обычных, нетрансгенных растений, животных и микроорганизмов в природных (естественных) и искусственных условиях.

Биотехнология новейшая — наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования гене-

тически трансформированных (модифицированных) растений, животных, микроорганизмов и вирусов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

Гаплоид — ядро, клетка, организм, характеризующиеся одинарным набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду (символ n).

Генетика соматических клеток — генетические изменения культивируемых клеток и закономерности их наследования при выращивании культур.

Геном — совокупность генов, содержащихся в гаплоидном (одинарном) наборе хромосом данного организма. Диплоидные организмы содержат два генома — отцовский и материнский.

Генотип — конкретный набор генов особи.

Гиногенез — процесс возникновения растения из клеток зародышевого мешка.

Гистогенез — процесс образования в культуре тканей и клеток тканевых элементов ксилемы (ксилемогенез), флоэмы (флоэмогенез).

Гомозиготность — отсутствие различий между идентичными генами родителей.

Дедифференциация — переход специализированных, неделящихся клеток к образованию недифференцированных делящихся каллусных клеток.

Диплоид — ядро, клетка, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленных числом, характерным для данного вида (символ $2n$).

Диплоидизация — превращение гаплоидного набора хромосом в диплоидный путем удвоения каждой хромосомы.

Диплоидный набор хромосом — два гаплоидных набора хромосом, содержащие хромосомы только одного или обоих родителей.

Дифференциация — комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

Индукированное развитие — развитие растительного организма, происходящее на основе внутренних изменений самого развивающегося растения и нуждающееся в индуцирующем влиянии определенных условий внешней среды.

Каллус — ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток органов растений.

Клетки-мишени — клетки, имеющие рецепторы того или иного фитогормона и изменяющие метаболизм при изменении концентрации фитогормона.

Клеточная селекция — метод выделения мутантных клеток и соматических вариаций с помощью селективных условий.

Клональное микроразмножение — получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному растению.

Клонирование — получение генетически идентичных популяций организмов.

Клон — большое число клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.

Компетенция — способность клетки, ткани, органа, организма воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.

Культивирование — выращивание микроорганизмов или отдельных клеток растений и животных: *глубинное* — в жидкой питательной среде; *поверхностное* — на поверхности твердой (агаризованной) питательной среды; *глубинно-поверхностное* — комбинация двух способов.

Культура: автотрофная — независимая от внешних источников органических веществ, создающая собственные органические компоненты из неорганических материалов; *гетеротрофная* — зависящая от одного или нескольких внешних источников органических веществ.

Культура зародышей — стерильное выращивание на питательной среде незрелых или зрелых изолированных зародышей.

Культура органов — стерильное выращивание изолированных корней, стеблевых апексов, листовых примордий, незрелых частей цветка, незрелых плодов.

Культура опухолевых тканей — выращивание в длительной культуре сегментов, изолированных из растительных опухолей разного происхождения и освобожденных от патогенов, индуцировавших развитие опухоли.

Культура первичных эксплантов — инкубация в стерильных условиях на питательных средах сегментов, изолированных из разных органов растений.

Культура «привыкших» тканей — выращивание тканей, возникших путем редифференциации или мутации клеток нормальных каллусных тканей.

Культура тканей *in vitro* — выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, образовавшихся путем пролиферации клеток изолированных сегментов различных органов или самих органов растений.

Меристема — образовательные ткани с активно делящимися клетками.

Метаболизм — промежуточный обмен, т. е. превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов.

Механизмы роста — внутренние физиолого-биохимические реакции, обеспечивающие начальные этапы ростового процесса целого растения и его отдельных частей.

Морфогенез — процесс формирования органов (органогенез), тканей (гистогенез) и клеток (цитогенез, или клеточная дифференцировка).

Мутация — спонтанное или индуцированное изменение гена, последовательности нуклеотидов хромосомы, генома, приводящее к изменению тех или иных признаков и сохранению их в поколениях.

Мутагены — факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций в молекуле ДНК.

Органогенез — процесс возникновения в неорганизованно растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней и побегов).

Полиплоид — ядро, клетка, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символы 3X, 4X и т. д.).

Пролиферация — новообразование клеток и тканей путем размножения.

Протопласт — содержимое растительной клетки, лишенной клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Редифференциация — переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

Рост — необратимое увеличение размеров и массы тела, связанное с новообразованием элементов структуры организма.

Селективные системы — условия, способствующие отбору мутаций определенного типа.

Синергизм — эффект взаимного усиления действия веществ, процессов и других факторов.

Сомаклоны — растения-регенеранты, полученные из соматических клеток и обладающие определенными отличиями от исходных форм.

Сомаклональная вариабельность — размах колебаний в различии признаков у растений, регенерированных из культивируемых соматических клеток.

Соматическая гибридизация — процесс вовлечения в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений.

Соматический гибрид — растения-регенеранты, полученные путем слияния (гибридизации) соматических клеток.

Соматический эмбриогенез — процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре ткани и клеток.

Стерильная культура растений — выращивание в стерильных условиях на питательной среде проростков или взрослых растений.

Субкультивирование — перенос трансплантов (инокулюма) в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Суспензионная культура — суспензия клеток или их агрегатов (небольших групп) во взвешенном состоянии в жидкой среде при

использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

Тотипотентность — свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свою наследственную программу онтогенетического развития при определенных условиях выращивания вплоть до образования взрослых растений и семян.

Фенотип — сумма внешних признаков организмов, определяемых генотипом и условиями выращивания.

Фитогормоны — соединения, образующиеся в малых количествах в одной части растения, обычно транспортирующиеся в другую его часть и вызывающие специфический ростовой или формообразовательный процесс.

Фиторегуляторы — природные препараты, вызывающие различные ростовые или формативные эффекты и не обладающие действием удобрений и гербицидов.

Фотоморфогенез — ростовые и формативные изменения растений, возникающие в результате воздействия света разного качества, интенсивности и длительности.

Эксплант — фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

Ювенильная фаза развития — период заложения, роста и развития вегетативных органов от прорастания семени или вегетативной почки до появления способности к образованию репродуктивных органов.

In vitro — выращивание живого материала «в стекле», на искусственных питательных средах, в стерильных условиях.

In vivo — выращивание живого материала в естественных условиях.

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: gred@urait.ru

Новые издания и дополнительные материалы доступны
на образовательной платформе «Юрайт» urait.ru,
а также в мобильном приложении «Юрайт.Библиотека»

Учебное издание

Калашникова Елена Анатольевна

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Учебник и практикум для вузов

Формат 70×100^{1/16}.
Гарнитура «Charter». Печать цифровая.
Усл. печ. л. 25,84.

ООО «Издательство Юрайт»
111123, г. Москва, ул. Плеханова, д. 4а.
Тел.: (495) 744-00-12. E-mail: izdat@urait.ru, www.urait.ru

