

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/348692272>

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ in vitro В БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ

Основные методы культивирования in vitro в биотехнологии растений

Book · January 2021

CITATIONS

0

READS

696

1 author:



[Lidiya Pershina](#)

Institute of Cytology and Genetics

84 PUBLICATIONS 551 CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Triticum aestivum [View project](#)



Alloplasmic lines (Hordeum)-T.aestivum as an additional source of bread wheat genetic diversity for the development of introgression and double haploid lines [View project](#)

А. А. Першина

**ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
in vitro В БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО ОБРАЗОВАНИЮ
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра цитологии и генетики

Л. А. ПЕРШИНА

**ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *in vitro*
В БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

Учебное пособие

Издание второе, переработанное и дополненное

Новосибирск
2005

ББК Е573.9я73-1
УДК 581.1 : 575.2
П 279

Першина Л. А. Основные методы культивирования *in vitro* в биотехнологии растений: Учеб. пособие. 2-е изд., перераб. и доп. / Новосиб. гос. ун-т. Новосибирск, 2005. 142 с

В учебное пособие включены вопросы культивирования *in vitro* изолированных клеток, органов, каллусных тканей, протопластов, применяемые в биотехнологии растений. Приведены данные об источниках питания растений в условиях *in vivo* и при культивировании *in vitro*. Рассмотрены возможности применения методов культивирования для получения биологически активных соединений, ускорения селекционного процесса и повышения биоразнообразия культурных растений, их оздоровления и клонального размножения, создания нового исходного материала для селекции и генетики на основе хромосомной, клеточной и генной инженерии.

Предназначено для студентов 4-го курса факультета естественных наук НГУ, студентов агрономических факультетов аграрных университетов.

Подготовка учебного пособия поддержана грантом РФФИ (05-04-48600).

Рецензент
акад. РАН В. К. Шумный

ISBN 5-94356-320-2

© Новосибирский государственный
университет, 2005
© Л. А. Першина, 2005

Раздел 1. РАЗВИТИЕ БИОТЕХНОЛОГИИ И ЕЕ ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ

Биотехнология – это совокупность промышленных методов, использующих живые организмы и биологические процессы для производства или модификации различных продуктов, а также направленных на улучшение свойств экономически ценных видов растений и животных, а также микроорганизмов, способных оказывать определенное воздействие на окружающую среду. В общем понимании биотехнология – это наука о практическом применении достижений биологии.

Термин «биотехнология» введен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки для описания крупномасштабного получения свинины (конечного продукта) с использованием дешевой сахарной свеклы (сырье) в качестве корма для животных (биотрансформация). По определению К. Эреки, «биотехнология – все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты».

Долгое время термин «биотехнология» использовали не по назначению, в частности подразумевая под этим понятием промышленную ферментацию.

В 1961 г. шведский микробиолог Карл Герен Хеден предложил изменить название журнала «Журнал микробиологии, биохимической инженерии и биоинженерии» на название «Биотехнология и биоинженерия». В конце 70-х г.г. XX столетия под термином «биотехнология» были обобщены такие понятия, как прикладная микробиология, прикладная биохимия, технология ферментов, прикладная генетика, прикладная биология.

Этот термин применим и к таким давно известным производствам, как пивоварение, производство хлеба, сыра, уксуса, соевого соуса, мыла из жиров, спиртных напитков. Иначе говоря, в историческом смысле биотехнология возникла тогда, когда дрожжи и бактерии впервые стали использовать для производства продуктов.

С разработкой методов получения рекомбинантной ДНК (Berg et al., 1972; Cohen et al., 1973) развитие получила молекулярная биотехнология. Однако масштабная коммерциализация молекулярной биотехнологии началась с 1980 г., когда впервые стоимость

акций биотехнологической компании Genentech (Калифорния) на Нью-Йоркской фондовой бирже поднялись более чем в 2 раза. Это было связано с получением в 1978 г. учеными данной компании человеческого инсулина с помощью *E. coli*. был выделен ген, кодирующий человеческий инсулин, и перенесен в векторы, проявившие способность реплицироваться в клетках кишечной палочки. Эти бактериальные клетки работали как биологические фабрики по производству человеческого инсулина, который после очистки мог использоваться в качестве лекарственного препарата для больных диабетом, взамен ранее использованного инсулина, вырабатываемого клетками свиньи.

В период с 1980 по 1983 г. в США было организовано более 200 небольших биотехнологических компаний. В 1985 г. появилось уже более 400 биотехнологических фирм, среди которых Biogen, Amgen, Calgene и др. К 1989 г. таких фирм только в США насчитывалось свыше 1 500, а во всем мире – более 3 000.

Большой вклад в развитие современной биотехнологии внесли крупные международные химические и фармацевтические компании, в том числе Monsanto, Du Pont, Merk, Eli Lilly и др.

Развитие биотехнологии определяется как успехами в области фундаментальных наук, так и уровнем производства. Ведущая роль в области биотехнологии принадлежит США и Японии. В этих странах программы по производству продуктов, получаемых методами новейшей биотехнологии, рассматриваются как наиболее перспективные и получают большую финансовую поддержку.

В США организовано большое число совместных предприятий с зарубежными фирмами, в том числе с японскими и западноевропейскими. Большие программы реализуются в рамках Международной кооперации по биотехнологии европейских стран. По многим направлениям биотехнологии, в том числе сельскохозяйственной, созданы кооперации в Восточной Европе, странах Восточной Азии, государств Океании, в развивающихся странах Африки.

В целях содействия развитию сельского хозяйства на основе применения естественных методов азотфиксации ЮНЕСКО при участии Программы ООН по окружающей среде (ЮНЕП) и Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО) создала в разных странах центры микробиологических ресурсов.

Вместе с тем с развитием и использованием методов биотехнологии, в том числе трансформации сельскохозяйственных растений и животных, со стороны общественности и правительств в разных странах сложилось неоднозначное отношение к проблеме генетически модифицированных организмов (ГМО).

Так, в США законопроект предусмотрено включение таких организмов в коммерцию, а трансгенные растения выращивают на больших площадях.

В странах Европейского союза на этот счет существуют значительные ограничения; принят закон о необходимости научно обоснованной оценки безопасности растений и животных, получаемых в результате трансгенеза.

В связи с бурным развитием молекулярной биотехнологии возник ряд волнующих общественность вопросов:

- Не будут ли организмы, полученные методами генной инженерии, оказывать вредное влияние на другие живые организмы или окружающую среду?
- Не приведет ли создание и распространение генетически модифицированных организмов к уменьшению природного генетического разнообразия?
- Правомочно ли, используя генно-инженерные методы, изменять генетическую природу человека?
- Не нарушит ли применение новых диагностических методов прав человека на неприкосновенность частной жизни?
- Не будет ли активное финансирование молекулярной биотехнологии сдерживать развитие других важных технологий?
- Не приведет ли стремление к получению максимальной прибыли к тому, что преимуществами молекулярной биотехнологии смогут воспользоваться только состоятельные люди?
- Не нанесет ли молекулярная биотехнология ущерб традиционному сельскому хозяйству?
- Не помешает ли борьба за приоритеты свободному обмену идеями между учеными?

Можно выделить ряд отраслей народного хозяйства, потребности которых обеспечивает биотехнология: медицина, сельское, лесное, рыбное хозяйства, пищевая промышленность, производство химических веществ, материаловедение, экология, электронное машиностроение, энергетика и т. д.

В качестве биологических систем в биотехнологии используют микробиологические системы, соматические клетки млекопитающих, культуру изолированных клеток, органов и тканей растений.

Примерами использования биотехнологических разработок в медицине могут служить использования микроорганизмов для производства лекарств, в том числе стероидов и новых антибиотиков; применение культуры изолированных клеток и тканей растений для массового получения биологически активных веществ; получение моноклональных антител и препаратов на основе технологии рекомбинантных ДНК. Так, первым «генно-инженерным» белком, полученным с помощью такой технологии в начале 80-х гг., стал инсулин человека.

Для сельского, лесного и рыбного хозяйств разрабатываются новые методы селекции растений и животных, включая их клонирование и генетическую модификацию. Кроме того, с помощью биотехнологических подходов ускоряется селекционный процесс, направленный на создание новых ценных сортов сельскохозяйственных растений, сохраняются растения исчезающих видов, массово размножаются и оздоравливаются уникальные генотипы.

Потребности пищевой промышленности удовлетворяются разработкой новых методов переработки и хранения пищевых продуктов, получением большого разнообразия пищевых добавок, в том числе аминокислот и полисахаридов.

Благодаря работам Л. Пастера, определившего роль микроорганизмов в процессах брожения, еще в конце XIX – начале XX в. получило развитие бродильное производство органических растворителей и органических кислот. Один из аспектов технологии, основанной на использовании микроорганизмов, – это выщелачивание руд и контроль за биоразложением, что широко применяется в материаловедении.

Раздел 2. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК, ОРГАНОВ, ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Методы культивирования изолированных клеток, органов и тканей находят широкое применение в экспериментальной биологии и используются во многих биотехнологических процессах, в которые включены высшие растения.

В целом термин «*культура клеток, органов, тканей*» применяется к асептически выращиваемым частям растений:

- 1) изолированным зародышам;
- 2) изолированным органам (кончикам корней, меристемам побегов, листовым примордиям, частям молодых цветков и плодов);
- 3) каллусным тканям на агаризованной среде;
- 4) суспензионной культуре клеток и небольших агрегатов в жидкой среде;
- 5) культуре протопластов.

С использованием методов культивирования решается большое число теоретических проблем, в том числе:

- особенности старения растительной клетки и апоптоз;
- процессы цитодифференцировки и морфогенеза;
- роль фитогормонов, углеводов, витаминов, минеральных веществ при каллусогенезе, органогенезе, морфогенезе;
- взаимоотношение клеток высших растений с клубеньковыми бактериями и микоризными грибами;
- механизмы устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды: абиотическим факторам (засолению, кислой среде, низким температурам и т. д.), биотическим факторам (патогенам разного происхождения, вызывающим болезни растений);
- регуляция вторичного обмена;
- механизмы опухолеобразования;
- механизмы соматической изменчивости;
- популяционные взаимоотношения в клеточной культуре.

Методы культивирования *in vitro* используются в биотехнологических работах в целях:

- получения экономически ценных биологически активных веществ;
- клонального размножения ценных и уникальных генотипов растений;
- получения оздоровленных растений;
- сохранения генофонда в условиях криоконсервации;
- ускорения селекционного процесса;
- генетического улучшения сельскохозяйственных растений.

Раздел 3. ТОТИПОТЕНТНОСТЬ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

Методы культивирования изолированных фрагментов растений основаны на использовании важного свойства растительной клетки – тотипотентности.

Тотипотентность (лат. *Totus* – весь, *potentia* – сила) – это свойство клетки реализовать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма.

Тотипотентностью обладают оплодотворенные яйцеклетка растений и яйцо 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**.

У растений в природных условиях (*in vivo*) тотипотентность могут проявлять и специализированные клетки. Пример тому – вегетативное размножение, в том числе наблюдаемое в результате развития растений из клеток листьев бегонии, Узумбарской фиалки или каланхоэ.

Тотипотентность у растений реализуется и при заживлении ран. В этом случае на раневой поверхности растений в результате неорганизованной пролиферации клеток происходит развитие **каллуса** (рис. 1) (лат. *callus* – толстая кожа, мозоль).

Образование каллуса можно наблюдать при прививках в местах срастания привоя и подвоя. Каллус способствует заживлению ран и первоначально состоит из недифференцированных клеток, начало которым на раневой поверхности дают клетки тканей, способные к дедифференциации (камбий, флоэма, молодые клетки ксилемы). Впоследствии в каллусе может иметь место вторичная дифференциация с образованием специализированных тканей и органов.

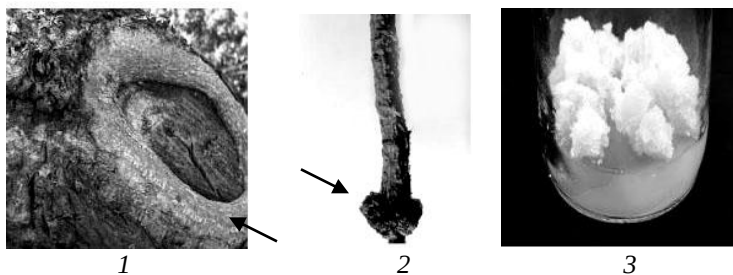


Рис. 1. Каллус, сформировавшийся на раневой поверхности ствола березы (1) и корневого побега винограда в условиях *in vivo* (2), при культивировании изолированных тканей моркови *in vitro* (3)

Однако в природных условиях растения ряда систематических групп тотипотентность не проявляют. Ввиду высокой специализации клеток многие однодольные растения утратили способность к раневой реакции и вегетативному размножению.

Между тем в экспериментальных условиях *in vitro* при выращивании фрагментов тканей, органов (*эксплантов*) или клеток на искусственных питательных средах возможна реализация супрессированной *in vivo* тотипотентности.

Переход специализированных клеток к эмбриональным синтезам, последующему делению с образованием недифференцированных клеток, а затем и к повторной дифференциации осуществляется под действием регуляторов роста и развития – фитогормонов.

Раздел 4. ИСТОРИЧЕСКИЕ ЭТАПЫ РАЗВИТИЯ МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *in vitro*

Образование каллуса впервые было описано французским энциклопедистом Дугамелем (Duhamel, 1756), опубликовавшем результаты по изучению циркуляции клеточного сока и заживлению ран у растений, срастанию тканей при прививках.

Позже выполненный микроскопический анализ срезов каллуса, индуцированного на стеблях декоративных древесных растений (*Robinia*, *Pawlonia*, *Ulmus*), позволил Трекулу (Trecul, 1853) выявить, что образование каллуса может происходить как от камбиальной ткани, так и от флоэмы и очень молодых частей ксилемы.

Тотипотентность теоретически была постулирована клеточной теорией, сформулированной в независимых работах Шлейдена (Schleiden, 1838), проведенных на растительных объектах, и Шванна (Schwann, 1839) – на растительных и животных объектах. В частности, Шванн писал: «У низших растений клетки могут быть отделены и продолжать расти. Таким образом, целые растения состоят из клеток, которые способны к независимой жизни. Хотя и не все клетки, выделенные из организма, дают такой рост».

Классические эксперименты были выполнены немецкими ботаниками Фёхтингом (Vöchting, 1878) и Рехингером (Rechinger, 1893). Фехтинг выявил наличие полярности у изолированных, даже очень тонких фрагментов стеблей, которые во влажных условиях формировали в апикальной части почки, а в базальной – каллус или корни. Рехингер определил минимальные размеры эксплантов, способных продуцировать почки и даже регенерировать целые растения. Он изолировал фрагменты из почек тополя и ясеня, из корней свеклы и турнепса и культивировал их на поверхности сырого песка, наблюдая, как с уменьшением толщины экспланта до 1,5 мм, что соответствовало не более чем 21-клеточному слою, способность к регенерации переставала проявляться.

Термин «**тотипотентность**» как способность растительных клеток к регенерации был введен Гебелем (Goebel, 1902), подтвердившим своими экспериментами результаты Фёхтинга.

Описанные эксперименты относят к культивированию изолированных тканей. Однако для успешного воспроизводства методов культивирования *in vitro* необходимо использование искусственных питательных сред и соблюдение асептических условий.

Впервые такой подход был применен Габерландтом (Haberlandt, 1902). В качестве питательной среды им был взят раствор минеральных солей по Кнопу, используемый с 1865 г. для песчаных культур, с добавлением сахарозы.

Вместе с тем для своих экспериментов Габерландт использовал только высоко специализированные клетки: тычиночные волоски традесканции, железистые волоски медуницы и крапивы, клетки сердцевины черешков водного гиацинта, замыкающие клетки устьиц лилейных, палисадные клетки из листьев яснотки. В условиях культивирования такие клетки оставались живыми в те-

чение месяца. Происходило увеличение их размера, изменение формы, накопление крахмала, но деления клеток не происходило.

Это было связано не только с высокой специализацией клеток, но и с отсутствием в питательной среде веществ, способных индуцировать клеточное деление. Габерландт писал, что у изолированных для культивирования тканей отсутствуют стимулы, исходящие от целого организма или его частей.

Следует отметить, что в начале века успехов добились зоологи, работавшие в области культивирования тканей животных.

Так, благодаря работам Гаррисона (Harrison, 1907), Карреля (Carrel, 1911) и других исследователей была разработана методика выращивания тканей животных на питательных средах природного происхождения (плазме крови, зародышевой жидкости).

Выполненные в те годы работы по культивированию изолированных тканей растений на экстрактах из растительных тканей не были продуктивными.

Значительно позже, в 40–50-е гг., при использовании жидкого эндосперма кокосового ореха – кокосового молока, было показано, что растительные экстракты могут оказывать стимулирующее действие на рост изолированных органов и тканей в условиях культивирования только при их добавлении к основному составу синтетических сред.

На фоне временных неудач по культивированию изолированных тканей и клеток растений с начала века получил развитие **метод культуры изолированных зародышей**, широко используемый в настоящее время для решения многих задач биологии и биотехнологии. Так, Ханниг (Hannig, 1904) провел серию экспериментов по культивированию в асептических условиях практически зрелых изолированных зародышей крестоцветных на растворе минеральных солей и сахарозы. Зародыши, изолированные из незрелых семян, в этих условиях не дифференцировались.

Практическое применение культуры изолированных зародышей для преодоления несовместимости при отдаленной гибридизации было продемонстрировано работами Лайбаха (Laibach, 1925). Лайбах вычленил зародыши из нежизнеспособных гибридных семян льна, завязавшихся в результате скрещивания двух видов *Linum perenne* x *Linum austriacum* и культивировал на фильтровальной

бумаге или вате, смоченных раствором сахарозы. В результате были выращены гибридные растения.

Новый подход к методам культивирования изолированных клеток и тканей растений был заложен одновременно в Германии Котти (Kotte, 1922) и в США Роббинсом (Robbins, 1922). Эти исследователи постулировали необходимость использования для культивирования *меристематических клеток*, изолированных из кончиков корней или почек и применения более сложных по составу культуральных сред с добавлением аминокислот и дрожжевого экстракта.

Эти подходы были удачно реализованы в 30-е гг. в работах американского исследователя Филиппа Уайта и французского исследователя Роже Готре, которых принято считать родоначальниками современных методов культивирования изолированных органов и тканей растений. Успех работ Ф. Уайта и Р. Готре был определен ***оптимальным сочетанием объектов культивирования и состава питательных сред.***

Серия работ Ф. Уайта (White, 1934) была посвящена выращиванию изолированных корней томатов, которые при периодических пересадках (*пассировании*) отрезками кончиков корней на свежую среду могли расти неограниченно долго. Другое направление работ Ф. Уайта связано с изучением опухолей растений, помещенных в условия культивирования.

Большое значение имеют работы Ф. Уайта, посвященные разработке составов питательных сред. *Среда Уайта*, содержащая наряду со смесью минеральных солей и витамины (табл. 1), в настоящее время широко используется для выращивания тканей многих культур. При культивировании ткани табака на этой среде впервые удалось наблюдать спонтанное развитие зачатков стеблевых почек и формирование побегов (White, 1939; 1941).

Основные объекты культивирования в работах Р. Готре – камбиальная ткань стебля древесных и травянистых растений, ткань корнеплодов и клубней. В основе минерального состава среды была использована питательная смесь Кнопа. Р. Готре заменил жидкую среду на твердую – *агаровую* и ввел в состав культуральных сред фитогормон *ауксин* – индолилуксусную кислоту (ИУК). Это способствовало длительной пролиферации каллусной ткани, наблюдаемой в течение 18 мес.

Таблица 1

Состав наиболее часто используемых культуральных сред

Компоненты среды	Среда Уайта	В-5	MS
Неорганический состав			
NH_4NO_3	–	–	1650
KNO_3	80	2500	1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	–	150	440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	750	246	370
KH_2PO_4	–	–	170
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	–	134	–
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	300	–	–
Na_2SO_4	200	–	–
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	19	150	–
KCl	65	–	–
KJ	0.75	0.75	0.83
H_3BO_3	1.5	3.0	6.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.0	–	22.3
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	–	10	–
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3.0	2.0	8.6
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	–	0.25	0.25
MoO_3	0.001	–	–
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.01	0.025	0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	–	0.025	0.025
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	2.5	–	–
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	–	27.8	27.8
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	–	37.3	37.3
Органический состав			
Мезоинозитол	–	100	100
Никотиновая кислота	0.05	1.0	0.5
Пиридоксин-HCl	0.01	1.0	0.5
Тиамин-HCl	0.01	10	0.1
Глицин	3.0	–	2.0

Условные обозначения: В-5 – среда Гамборга В-5; MS – среда Мурасиге и Скуга.

Развитию исследований с использованием методов культивирования *in vitro* способствовало открытие и выделение стимулятора клеточного деления у растений – **кинетина**. Использование этого фитогормона в составе культуральных сред, в том числе в сочетании с ауксинами, позволяет моделировать **процессы органо-генеза** – развития стеблевых почек и корней.

Раздел 5. ИСТОЧНИКИ ПИТАНИЯ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ *in vivo*

5.1. Минеральные вещества

В природных условиях произрастания у растений существует три источника питания:

1) **минеральные вещества**, поступающие с током воды из почвы через корневую систему;

2) **атмосферная углекислота**, превращаемая в процессе фотосинтеза в углеводы – основные источники энергии;

3) **витамины** и регуляторы роста и развития – **фитогормоны**, которые синтезируются в отдельных частях растений.

Для нормального жизненного цикла растению необходима группа основных химических элементов, функция которых не заменима другими химическими элементами. Их 19: углерод, водород, кислород, азот, фосфор, сера, калий, кальций, магний, железо, марганец, медь, цинк, молибден, бор, хлор, натрий, кремний, кобальт.

Из них 16 – минеральные, а углерод, кислород и водород поступают в виде углекислого газа, кислорода и воды, которой в растении содержится около 50–98 %.

Натрий, кремний и кобальт необходимы не всем растениям. Например, некоторые виды растений семейства маревых нуждаются в натрии, так как они адаптированы к условиям засоления.

Универсальными компонентами органических веществ – белков, углеводов, нуклеиновых кислот и т. д. – являются углерод, кислород, водород, азот. На эти четыре элемента приходится около 95 % сухой массы растения. Из них на углерод – 45 %, кислород – 42, водород – 6,5, азот – 1,5 %. Остальные 5 % – это зольные элементы, входящие в состав золы после сжигания тканей растения.

Органические соединения сгорают, а углекислота, вода, аммиак, сероводород улетучиваются.

В зависимости от потребности растений в элементах последние разделяют на **макро-** и **микроэлементы**. Макроэлементы – фосфор, сера, калий, магний, железо, кремний, натрий. Микроэлементы – марганец, медь, цинк, кобальт, молибден, бор, хлор.

Основные функции отдельных элементов:

фосфор входит в богатые энергией фосфатные соединения, которые играют главную роль в энергетическом обмене, а также является составной частью нуклеопротеидов и нуклеиновых кислот;

сера входит в состав многих органических соединений, в том числе в состав ряда витаминов (липоевая кислота, биотин, тиамин), аминокислот (метионин, цистеин, цистин), глюкозидов;

натрий играет важную роль у растений-галофитов, у которых он создает высокое осмотическое давление в клеточном соке, что дает растению возможность извлекать воду из засоленных почв;

кремний необходим для построения клеток соломины злаков, стебля хвоща; соединения кремния повышают жесткость тканей растений; пониженное его содержание вызывает задержку роста кукурузы, ячменя, бобовых растений;

калий как одновалентный элемент повышает гидрофильность протоплазмы и увеличивает ее водоудерживающую способность; активизирует процессы передвижения ассимилятов из листьев к репродуктивным органам у злаков; на аммиачном фоне оказывает положительное влияние на синтез белков и процессы полимеризации углеводов; влияет на метаболизм фосфора;

магний входит в состав хлорофилла, играя основную роль в процессе фотосинтеза; ионам магния принадлежит основная роль в активировании деятельности отдельных ферментов;

кальций наряду с магнием входит в состав ядер и микросом и участвует в связывании нуклеотидов; входит в состав клеточной стенки; наибольшую потребность в кальции проявляют бобовые травы, у которых развитие корней протекает в среде, содержащей кальций;

железо необходимо для синтеза хлорофилла; кроме того, железо наряду с такими микроэлементами, как **медь** и **цинк** в соединении со специфическими белками образует основу ферментных систем;

молибден и **кобальт** участвуют в фиксации атмосферного азота; один из ферментов, участвующих в фиксации азота – молибденсодержащая нитрогеназа, которая превращает азот в аммиак или ионы аммония NH_4^+ , используя энергию гидролиза АТФ;

медь участвует в работе многих ферментных систем; необходима для синтеза хлорофилла, способствует росту и развитию растений, повышая их устойчивость к холоду;

марганец является кофактором ферментов, обеспечивающих образование кислорода в хлоропластах растений в процессе фотосинтеза; недостаток марганца вызывает пятнистость листьев;

бор способствует нормализации процессов минерального питания растений; при недостатке бора у растений не развиваются цветки, сахарная свекла заболевает сердцевидной и сухой гнилью, лен – бактериозом;

хлор необходим при фотосинтетическом выделении кислорода.

5.2. Витамин

Витамины – группа разнообразных по строению химических веществ, принимающих участие во многих реакциях клеточного метаболизма. Биосинтез витаминов осуществляется растениями и микроорганизмами, некоторые витамины синтезируются и в животных клетках. Основная часть витаминов входит в состав ферментов, катализирующих многие метаболически важные реакции. Витамины делятся на **водорастворимые** и **жирорастворимые**.

Водорастворимые витамины – B_1 (тиамин), B_2 (рибофлавин), B_3 (пантотеновая кислота), B_5 или РР (никотинамид), B_6 (пиридоксин), B_9 (фолиевая кислота), B_{12} (цианкобаламин), витамин B_{15} (пангамовая кислота), Витамин B_c (фолиевая кислота), Н (биотин), С (аскорбиновая кислота), Р (рутин), U (S-метилметионин).

Жирорастворимые витамины – А (ретинол), D (эргокальциферол), Е (токоферол), К (филлохинон).

Витамин B_1 (тиамин) был впервые получен в 1912 г. К. Функом из отрубей риса. Тиамин синтезируется растениями и микроорганизмами. Функциональная значимость витамина B_1 в составе ферментов – участие в углеводном обмене.

Содержится в больших количествах в злаковых растениях, говяжьей печени, капусте.

Витамин В₂ (рибофлавин) впервые выделен из молока и получен в кристаллическом состоянии в 1933 г. Р. Куном. Синтез витамина В₂ осуществляют растения, дрожжи, грибы, бактерии. Витамин В₂ в свободном состоянии находится в молоке, в микробных клетках – в виде флавиномононуклеотида (ФМН), в животных клетках – в виде флавинадениндинуклеотида (ФАД). ФМН и ФАД – коферменты около 30 ферментов, осуществляющие перенос водорода на различные субстраты. Особое значение имеют эти ферменты в процессах дыхания, переноса электронов и протонов. Значительные количества витамина – в говяжьей печени, меньше в курином желтке, пшенице, молоке и капусте.

Витамин В₃ (пантотеновая кислота) впервые идентифицирован Р. Вильямсом в 1933 г. Синтезируется микробными и растительными клетками. Активная форма пантотеновой кислоты – коэнзим А (КоА), который переносит кислотные радикалы на различные субстраты. Наибольшее содержание – в печени, яичном желтке, рыбе, картофеле, пшенице.

Витамин В₅ (РР, никотинамид) отнесен к витаминам в 1937 г. Никотинамид осуществляет биохимические функции в составе коферментов НАД и НАДФ, которые являются составной частью окислительно-восстановительных ферментов – дегидрогеназ. Большое количество витамина РР находится в рисовых и пшеничных отрубях, печени, дрожжах.

Витамин В₆ (пиридоксин) открыт П. Дьерди в 1934 г. Синтезируется микроорганизмами, зелеными растениями, а у жвачных животных и человека – микрофлорой кишечника. Пиридоксин в виде фосфорнокислого эфира входит в состав ферментов декарбоксилирования и переаминирования аминокислот, то есть принимает участие в метаболизме аминокислот. Наибольшее его количество в печени, яйцах, дрожжах, моркови.

Витамин В₁₂ (цианкобаламин) впервые получен в кристаллическом состоянии в 1948 г. Е. Рикетсом и Е. Смитом. Цианкобаламин синтезируется в основном микроорганизмами, включая и кишечную микрофлору. Участвует во многих биохимических про-

цессах, в том числе вовлекается в процесс образования форменных элементов крови и в обмен жиров в качестве протектора КоА.

Витамин В₁₅ (пангамовая кислота) впервые выделен Р. Томияма в 1950 г. из печени быка, а в 1951 г. Е. Кребсом из ядер абрикосовых косточек. Обладает липотропным действием. Это связано с процессами деметилирования и переметилирования в организме человека и животных.

Витамин В_с (фолиевая кислота, фолацин) выделен в 1941 г. как фактор, предотвращающий развитие анемии у цыплят, выращиваемых на искусственной диете. Синтезируется микроорганизмами и растительными клетками, участвует в составе кофермента тетрагидрофолиевой кислоты в обмене белков и нуклеиновых кислот. Одной из наиболее важных реакций, в которых принимает участие фолиевая кислота, – это синтез пуринов.

Витамин С (аскорбиновая кислота) в кристаллическом виде получен в 1923 г. Синтезируется растительными клетками и клетками большинства животных (место синтеза – печень и почки). Морские свинки, обезьяна и человек не способны к синтезу витамина С. Витамин С участвует во многих биохимических реакциях, являясь в том числе одним из компонентов антиоксидантной системы организма.

Витамины группы Р (биофлавоноиды) включают рутин, впервые выделенный А. Сент-Дьерди в 1936 г. из кожуры лимона. Известно более 100 биофлавоноидов, сходных по биологическим действиям с аскорбиновой кислотой. К числу биофлавоноидов относятся кумарины, антоцианы, гесперидин и др. Исходным продуктом синтеза биофлавоноидов в растительных клетках является шикимовая кислота.

Витамин Н (биотин) выделил в 1936 г. из яичного белка Р. Кегль. Синтезируется зелеными растениями, грибами, бактериями. В продуктах животного происхождения биотин связан с белками, а в растениях – находится в свободном состоянии. Биохимическая роль биотина в основном проявляется в составе биотиновых ферментов – карбоксилаз. Свободный биотин образует комплекс с токсическим белком куриных яиц – авидином, осуществляя его детоксикацию.

Жирорастворимые витамины группы А были открыты в начале XX в. Растения синтезируют в значительных количествах провитамины – каротины, которые при поступлении в организм человека или животного под действием фермента каротиказы превращаются в витамин А₁. β-Каротин в кристаллическом виде получают из люцерны, моркови, тыквы. Биохимическая функция витамина А в основном связана с влиянием на проницаемость клеточных мембран. Важную роль витамин А играет в фотохимических процессах зрения.

Витамины группы D выделены в первой половине XX в. Предшественники витамина D – вещества стероидной природы – синтезируются в дрожжах, растительных и животных тканях. Провитамин D₂ поступает в организм в готовом виде, а провитамин D₃ синтезируется в животных тканях. Биологические функции витаминов группы D в основном связаны с действием их метаболитов. Так, физиологические концентрации кальция в крови поддерживаются системой, составной частью которой являются гидроксильные формы D₃.

Витамины группы E (токоферолы) открыты в 1922 г. Г. Эвансом и А. Бишо. Имеется три группы токоферолов, отличающиеся биологической активностью. Наибольшей биологической активностью обладает α-токоферол. Биосинтез токоферолов осуществляется только зелеными растениями. Производство витамина E основано на выделении его из зародышей пшеницы методом спиртовой экстракции и отгонкой растворителя при низких температурах. Механизм действия витамина E в первую очередь связан с его антиоксидантными свойствами. Предотвращая процесс перекисного окисления липидов, этот витамин поддерживает целостность биологических мембран, структурным компонентом которых он является.

Кроме того, к жирорастворимым витаминам относятся **витамины группы K, витамин F и убихинон (коэнзим Q)** – витаминоподобное вещество, по строению близкое витаминам K и E.

5.3. Фитогормоны

5.3.1. Общая характеристика

Фитогормоны – это химические соединения, которые вырабатываются в микроколичествах в одной части растения, транспортируются в другие части, где, функционируя в клетках-мишенях, проявляют регулирующее действие на процессы роста и развития растения. Передача и трансформация гормонального сигнала осуществляется, как и у других организмов, в несколько этапов.

- Транспорт фитогормона.
- Образование гормон-рецепторного комплекса.
- Активированный гормон-рецепторный комплекс связывается с ядерными мембранами и перемещается в ядро клетки.
- Взаимодействие гормон-рецепторного комплекса с регуляторными последовательностями структурных генов, что приводит к увеличению транскрипционной активности.
- Отделение гормон-рецепторного комплекса от хроматина. Под действием ферментов происходит диссоциация комплекса на гормон и рецептор.

Весь жизненный цикл растений, начиная от оплодотворения и заканчивая отмиранием, происходит при участии фитогормонов.

Кроме того, фитогормоны играют важную роль в реакции растений на внешние воздействия и в формировании устойчивости растений к экстремальным условиям. В отличие от гормонов животных, фитогормоны гораздо менее специфичны, что проявляется в однотипном действии на одни и те же метаболические процессы различных фитогормонов.

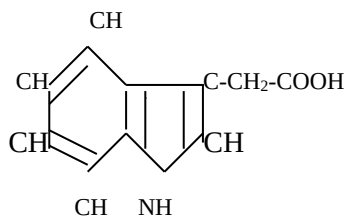
Известны три класса фитогормонов, действующих преимущественно как **стимуляторы (ауксины, гиббереллины, цитокинины)**, и два класса фитогормонов, оказывающих главным образом **ингибирующее действие (абсцизовая кислота и этилен)**.

5.3.2. Ауксины

Термин «ауксин» (от греч. *ауксо–расту*) ввел Ч. Дарвин для обозначения вещества, которое предположительно должно транс-

портиться от верхушки растения вниз, вызывая изгиб колюптыла злаков на одностороннее освещение. Позже это предположение подтвердилось. Ауксин впервые был выделен в 1926 г. немецким исследователем Вентом (Went, 1926), а в начале 30-х гг. выделен в химически чистом виде.

Природный ауксин в растениях представлен в основном в виде β -индолил-3-уксусной кислоты (гетероауксина) – ИУК, в меньших количествах – в виде индолов.



Гетероауксин (ИУК)

ИУК образуется у всех высших, многих низших растений и у бактерий. Многие эпифитные (заселяющие поверхность растения) бактерии синтезируют и выделяют ИУК, благодаря чему у растений повышается его общее содержание.

Биосинтез ауксина. Известны два универсальных пути синтеза ауксинов из триптофана. Первый путь синтеза ИУК из триптофана через индолилпировиноградную кислоту характерен для фасоли, капусты, тыквы: триптофан $\rightarrow$ индолилпировиноградная кислота $\rightarrow$ 3-индолилуксусный альдегид $\rightarrow$ ИУК. Второй путь синтеза ИУК через триптамин выявлен у таких растений, как табак, томаты, овес, ячмень: триптофан $\rightarrow$ триптамин $\rightarrow$ 3-индолилуксусный альдегид $\rightarrow$ ИУК.

Еще один путь синтеза ИУК описан у крестоцветных: 3-индолацетонитрил $\rightarrow$ ИУК. В свою очередь 3-индолацетонитрил может синтезироваться тремя путями, один из которых – из триптофана.

Выделены гены, контролирующие синтез ауксина. Например, у арабидопсиса – это гены NIT1–NIT4, представляющие небольшое семейство, три из которых локализованы на третьей хромосоме арабидопсиса. Эти гены экспрессируются на разных стадиях жизненного цикла и могут быть взаимозаменяемы в случае мутации в одном из них. Установлено, что ген NIT1 экспрессируется в тече-

ние всего онтогенеза, но его продукты не обнаружены в стручках и семенах. Ген NIT2 наиболее активно экспрессируется в период цветения, в том числе в стручках и семенах.

Избыток ауксина разрушается ИУК-оксидазой или переводится в неактивные связанные формы, взаимодействуя с гликозидами, пептидами, некоторыми сахарами. В процессе поддержания ауксинового гомеостаза вовлечено большое число генов.

Место синтеза ауксина – быстро растущие части растений (меристемы побега, верхушки coleoptиле злаков, растущие зародыши и семечки), молодые листья и семядоли. Меристемы кончиков корней образуют небольшие количества ауксина. Значительные количества ауксинов накапливают запасующие ткани семян и пыльцы.

Передвижение ауксина базипетальное, т. е. от верхушки побегов к его основанию по паренхимным и камбиальным клеткам. Из листьев ауксин передвигается по флоэме. В корнях полярность передвижения ауксина выражена слабо. Транспорт ауксина требует энергии и может быть блокирован недостатком кислорода.

Действие ауксина. Ауксин действует практически во всех тканях растения. Наиболее выраженный эффект ауксина проявляется в стимуляции роста растяжением клеток coleoptиле и побегов. Ауксин предотвращает опадание плодов и листьев, притягивая к местам своего накопления питательные вещества. Передвигаясь вниз, ауксин подавляет развитие боковых побегов (явление апикального доминирования). Ауксин играет важную роль в процессах регенерации при размножении каллусных клеток, образующихся на раневых поверхностях; в процессе образования придаточных и боковых корней, луковиц, при заложении вегетативных почек.

Механизм действия ауксина на рост клетки связывают с активацией H⁺-выкачивающего насоса в плазмолемме. Происходит подкисление клеточной стенки, что приводит к разрыву целлюлозных и пектиновых полимеров. Это облегчает растяжение растущей клетки под действием тургорного давления.

Рецепторы ауксина. Как у однодольных, так и у двудольных растений обнаружены мембранные белки, связывающиеся с ауксином. Наибольшее количество таких белков обнаружено в местах активного роста органов растения. Около 90 % всего количества белков, связывающих ауксин, локализовано в эндоплазматическом ретикулуме.

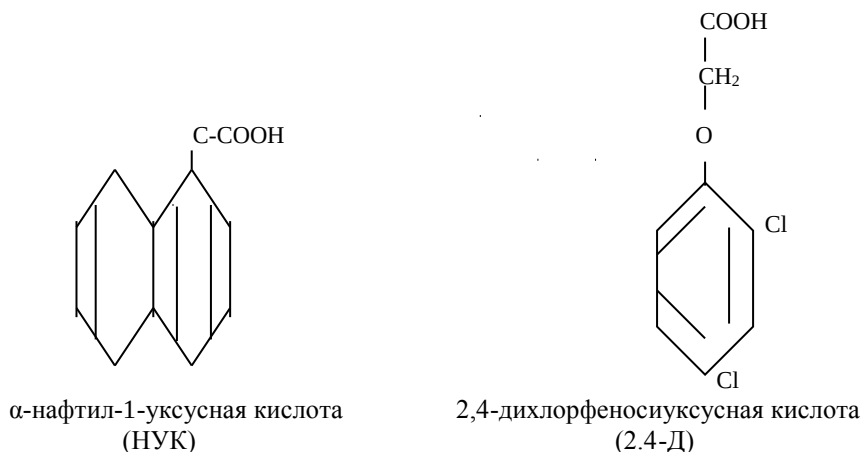
У кукурузы выявлено пять генов, кодирующих ауксин-связывающие белки.

Гены-мишени. Сигнал, переданный с ауксинового рецептора внутрь клетки, способен позитивно или негативно регулировать экспрессию определенных ауксинрегулируемых генов (генов-мишеней). В зависимости от скорости регуляции генов-мишеней их различают на ранние (регуляция в течение нескольких минут) и поздние (спустя час и более после воздействия ауксином на клетки растения).

Семейство генов SAUR, позитивно регулируемых ИУК в развивающихся проростках, клонированы у вигны, арабидопсиса и гороха. Экспрессия этих генов увеличивается в 25–60 раз через 25 мин после применения ИУК. К самым ранним позитивно ауксинрегулируемым генам, экспрессия которых наблюдается через несколько минут после воздействия гормоном, относятся гены арабидопсиса AUX22 и AUX28 и гены гороха Ps-IAA 4, Ps-IAA5.

Синтетические ауксины. Для практических целей в сельском хозяйстве и в работах по культивированию изолированных клеток и тканей растений часто применяют не ИУК, а синтетические ауксины, так как они в растениях не разрушаются ИУК-оксидазой.

Молекулы синтетических ауксинов имеют разную структуру, но содержат ароматическое или гетероциклическое кольцо, боковая часть которого представлена остатком алифатической кислоты.



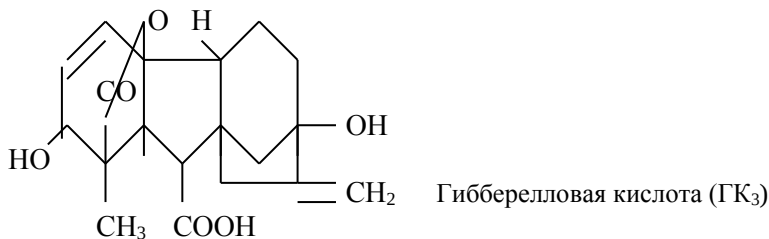
По действию синтетические ауксины относят к сильным: индолил-3-масляная кислота (ИМК), α -нафтил-1-уксусная кислота (НУК), 2,4-дихлорфенокси-уксусная кислота (2,4-Д) и слабым: фенилуксусная кислота (ФУК), фенилмасляная кислота (ФМК). ИМК, НУК, ФУК используют для индукции корнеобразования, а 2,4-Д – в качестве гербицида, селективно убивающего двудольные растения.

5.3.3. Гиббереллины

Гиббереллины обнаружены в 20-е гг. японскими исследователями в виде продуктов обмена веществ *Fusarium moniliforme* – конидиальной (споровой) стадии сумчатого гриба (аскомицета) *Gibberella fujikuroi*. Этот гриб, паразитируя на растениях риса, выделяет большие количества веществ, вызывающих заболевание «баканэ» («бешеные всходы», «глупый рис»). Больные растения характеризуются чрезмерным ростом, приводящим к их гибели.

В 1935 г. одно из таких веществ было выделено и названо гиббереллином. В 50-е гг. гиббереллины были обнаружены и в тканях высших растений. В настоящее время выделено более сотни индивидуальных гиббереллинов, часть из которых обнаружена в грибах, а часть – в тканях растений.

В процессе промышленного производства гиббереллина были выделены физиологически активные индивидуальные компоненты, обозначенные как гиббереллины A_1 , A_2 , A_3 или соответственно в русской транскрипции – ГК₁, ГК₂, ГК₃ и т. д. В экспериментах чаще всего используют гибберелловую кислоту (ГК₃), являющуюся одним из активных гиббереллинов.



Гиббереллины – это дитерпеноиды с тетрациклическим гиббереллановым скелетом из 19–20 С-атомов.

В тканях растений одновременно встречаются несколько гиббереллинов, а в процессе онтогенеза их набор и соотношение изменяются. На последних этапах онтогенеза гиббереллины присутствуют в виде неактивных форм – глюкозидов.

Биосинтез гиббереллинов происходит в интенсивно растущих органах: верхушках побегов, молодых листьях, растущих зародышах и других частях незрелых семян, реже в корнях. Предшественником биосинтеза гиббереллинов является ацетил КоА, из которого затем через мевалоновую кислоту и шикимовую кислоту образуется активный фитогормон.

Передвижение гиббереллинов не полярно, то есть может быть базипетальным, акропетальным, латеральным по клеткам ксилемы, флоэмы, паренхимным клеткам.

Действие гиббереллинов. Подобно ауксинам, гиббереллины оказывают множественные действия: стимулируют рост в фазе растяжения и деления клеток (например, камбия), вызывают рост плодов. Рост в фазе растяжения индуцируется одновременно действием гиббереллинов и ауксина. При этом гиббереллины стимулируют переход клеток из фазы G_1 в S-период. В других случаях гиббереллины могут выступать как антагонисты ауксина, например задерживать рост придаточных корней.

Важное свойство гиббереллинов – вызывать вытягивание стебля у розеточных растений или у растений с укороченным стеблем, т. е. устранять физиологическую и генетическую карликовость. Биосинтез гиббереллинов можно подавлять действием ретардантов.

Эту возможность используют для коммерческих целей, получая искусственные карлики у высокорослых сортов цветов. Гиббереллины, индуцируя экспрессию генов, контролирующих пути биосинтеза антоциана, усиливают пигментацию венчика цветков и контролируют цветение. На субклеточном уровне гиббереллины активизируют транспорт Ca^{2+} через плазматическую мембрану, понижают pH внутри клетки, влияют на ориентацию микротрубочек; изменяют проницаемость мембран растительных клеток. В качестве кандидатов на роль **рецепторов** рассматривают некоторые белки, для которых характерна гиббереллинсвязывающая активность.

Гены-мишени. Описаны как позитивно-, так и негативно регулируемые гиббереллинами гены. Одним из примеров позитивно регулируемых генов могут служить гены, контролирующие синтез α -амилазы и других гидролитических ферментов в клетках алейронового слоя эндосперма злаков. Так, в прорастающих семенах злаков гиббереллины, образующиеся в зародыше, переходят в клетки алейронового слоя эндосперма, где индуцируют образование и-РНК, ответственной за синтез α -амилазы и других гидролитических ферментов. В свою очередь, эти ферменты расщепляют основное вещество эндосперма – крахмал до простых сахаров, которые усваиваются развивающимся зародышем.

Кроме того, к позитивно регулируемым генам относятся гены, кодирующие α - и β -тубулины и функционирующие в процессе растяжения клеток стебля растения под действием гиббереллинов.

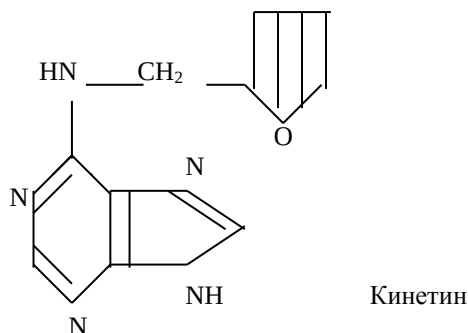
Гиббереллины относят к **условно половым гормонам** растений, так как их высокий уровень, например, у тыквенных способствует образованию мужских цветков. Для практических целей наиболее часто используют гибберелловую кислоту. Обработка гибберелловой кислотой семян и клубней приводит к снятию у них покоя и стимулирует быстрое прорастание. Действие гибберелловой кислоты на озимые злаки заменяет яровизацию, необходимую для таких растений. При обработке цветков винограда происходит увеличение размера ягод.

5.3.4. Цитокинины

Цитокинины – целое семейство близкородственных веществ, производных аденина с разными замещающими группами. В организме различные формы цитокининов могут переходить друг в друга, при этом определенные наборы цитокининов характерны для каждого вида растений и мест их локализации в тканях растения.

Цитокинины были открыты сотрудниками Висконсинского университета под руководством Скуга и Миллера в 1955 г. при изучении активного вещества, содержащегося в дрожжевом экстракте и стимулирующего рост каллуса сердцевины стебля табака (Skoog, Miller, 1955).

В 1956 г. при деградации ДНК путем автоклавирования в кислой среде был изолирован компонент (6-фурфуриламинопурин), активирующий деление клеток в культуре изолированных тканей и названный **кинетином** (от слова «кинез» – деление). Другой природный цитокинин – **зеатин** – выделен в 1964 г. из семян кукурузы в стадии молочной спелости.



Биосинтез цитокининов происходит в кончиках корней, в том числе в придаточных, а также в развивающихся семенах и плодах. В растительном организме существует два варианта синтеза цитокининов: синтез *de novo* и гидролиз тРНК. Выделены гены, ответственные за синтез цитокининов.

Дегградация цитокининов осуществляется под действием фермента цитокининоксидазы, которая отщепляет замещающую группу с освобождением аденина. Другим вариантом инактивации цитокининов является их соединение с низкомолекулярными веществами, такими как сахара и аминокислоты. Инактивированные таким образом цитокинины легко восстанавливают свою активность в результате их выщепления из соединений под действием специфических ферментов. Удобными моделями для изучения путей регуляции скорости синтеза или деградации фитогормонов служат мутантные формы, в том числе и с измененным уровнем цитокининов. Как и мутации по другим фитогормонам, цитокининовые мутации можно разделить на два основных класса: мутанты с измененным уровнем гормона и мутации с нарушениями в процессах рецепции и передачи воспринятого сигнала.

Транспорт цитокининов – от кончиков корней вверх по растению с транспирационным током. Передвижение цитокинина ускоряется ауксином.

Действие цитокининов проявляется, прежде всего, в ускорении деления клеток, стимулируя переход из фазы G2 в фазу митоза.

Благодаря этому замедляется старение клеток и повышается устойчивость растений к неблагоприятным факторам среды.

Цитокинины стимулируют прорастание семян и подавляют рост боковых корней. При избытке цитокининов у растения проявляется цитокининовый синдром: низкорослость и подавление апикального доминирования, приводящего к сильному ветвлению у растений. Во многих случаях для проявления действия цитокининов необходимо присутствие ауксина или одновременно и ауксина, и гиббереллинов. На субклеточном уровне цитокинины стимулируют репликацию ДНК, синтез всех типов РНК за счет активности РНК-полимераз, стимулирует образование митохондрий и хлоропластов. Под действием кинетина происходит увеличение активности многих ферментов, в том числе нитратредуктазы и ферментов, участвующих в биосинтезе антоциана.

Выявлены мембранные белки – **рецепторы** цитокининов. Гены этих рецепторов выделены и секвенированы у *Arabidopsis*.

Гены-мишени. Выявлено более 40 генов, экспрессия которых контролируется цитокининами или позитивно, или негативно как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне.

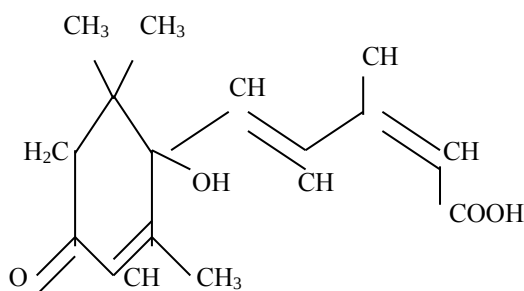
5.3.5. Абсцизовая кислота

Абсцизовая кислота (АБК) (от *abscisio* – опадание) была открыта в 1950 г., а выделена в 1962 г. из пасоки, движущейся в весенний период по стволам древесных растений, а в 1963 г. и из листьев березы. Абсцизовая кислота относится к изопреноидным соединениям.

Описано два пути **биосинтеза абсцизовой кислоты**. Основной путь – из ацетил КоА через мевалоновую кислоту; запасной путь, индуцируемый стрессами – из каротиноидов через ксантофилл.

Место синтеза абсцизовой кислоты – листья и корневой чехлик. В результате быстрого транспорта по флоэме и ксилеме

абсцизовая кислота переносится в почки, клубни и семена, где накапливается.



Абсцизовая кислота

Действие абсцизовой кислоты проявляется в задерживании роста в фазе растяжения и деления клеток, в ускорении опадания листьев и плодов, в индуцировании старения и состояния покоя растений (зимний покой многих древесных растений, покой семян).

Абсцизовая кислота адаптирует растения к стрессу, защищает клетку от потери воды, влияя на замыкающие клетки устьиц, в период засухи и заморозков. Абсцизовая кислота оказывает противодействие ауксину (при опадании листьев и плодов, при росте в фазе растяжения), гиббереллинам (при покое почек, росте в фазе растяжения клеток листа, образовании α -амилазы в алейроновом слое зерновок), цитокининам – при старении.

Выявлены белки, рассматриваемые в качестве претендентов на роль **рецепторов** АБК.

Гены-мишени, регулируемые АБК, выявлены и изучены у пшеницы, ячменя, кукурузы. Например, у пшеницы АБК регулирует экспрессию гена ЕМ (от Embryo Maturation), который относится к семейству Леа-генов. Как правило, белки, кодируемые этими генами, накапливаются в семенах при их высыхании и в вегетативных тканях при стрессовых воздействиях, особенно в период засухи и заморозков.

Леа-белки защищают клетку при потере воды, поддерживая структуру белков и мембран. Экспрессия гена ЕМ обнаруживается через 5 мин после воздействия экзогенной АБК.

5.3.6. Этилен

Этилен ($\text{CH}_2 = \text{CH}_2$) – газообразный гормон, регулятор созревания плодов. Гормональное действие этилена было открыто Д. И. Нелюбовым в Санкт-Петербургском университете в 1901 г.

Биосинтез этилена происходит в клетках растений и грибов, а исходными веществами этилена могут быть метионин, β -аланин и линоленовая кислота. Этилен вырабатывается в зрелых плодах в количестве, способном индуцировать дозревание незрелых плодов, помещенных в одну камеру со зрелыми. В незначительных количествах этилен содержится во всех тканях.

Действие этилена. Этилен играет большую роль в реакциях растений на стрессы и поражение патогенами. Так, этилен способен включать системы защиты растений от патогенов, индуцируя синтез ферментов, разрушающих клеточную стенку грибов, и регулируя синтез фитоалексинов. Под действием этилена при поранении растения активизируется к развитию особая ткань – раневая перидерма, изолирующая здоровую ткань от поврежденной, не давая проникать бактериям и грибам. Этилен стимулирует локальный «листопад», когда поврежденный лист опадает на землю вместе с вредителем. Кроме того, этилен вызывает опадание созревших или поврежденных плодов, старение и опадание листьев.

В коммерческих целях для сохранения срезанных цветов в течение длительного времени их помещают в растворы, содержащие кроме минеральных солей и антисептиков и ингибиторы синтеза этилена.

Этилен **условно женский гормон**, его высокий уровень приводит к образованию женских цветков у тыквенных растений.

Выявлено семейство **этиленовых рецепторов**, которые могут частично замещать друг друга. К числу таких рецепторов относят Cu^{2+} - или Zn^{2+} -содержащие металлопротеины.

Гены-мишени. Показано, что этилен активирует экспрессию генов, связанных с его биосинтезом, и гены, вовлеченные в защитные реакции при поражении патогенами – реакции SAR (системная приобретенная устойчивость).

Интегральное действие всех классов фитогормонов, последовательно индуцирующих активность большого числа генов, хорошо

изучено на примере контроля над процессами развития и созревания плодов томатов. Первый этап – развитие цветка, сопровождающееся активным делением клеток будущего плода. Этот этап находится под контролем ауксинов, цитокининов, гиббереллинов. Позже доминирующее влияние оказывают гиббереллины, стимулирующие растяжение клеток увеличивающегося в размере плода, затем активизируется абсцизовая кислота, индуцирующая начало созревания плода. На этапе увеличения массы плода и его полного созревания отмечена активность ауксинов и этилена.

Помимо описанных пяти групп фитогормонов свойствами регуляторов роста и развития растений, в том числе влияющих на развитие и созревание плодов, обладают и другие вещества – *брасиностероиды, системин, полиамины, салициловая кислота, жасмоновая кислота*.

Раздел 6. ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *in vitro*

Наличие макро- и микроэлементов в составе культуральных сред определяется потребностями объектов культивирования. Широко применяемые в настоящее время среды Гамборга В-5 и Мурасиге и Скуга (MS) содержат по сравнению со средами Уайта значительно большие количества калия, фосфора и микроэлементов (см. табл. 1). В качестве дополнительного источника азота в состав сред добавляют аминокислоты (α -аланин, глутаминовую кислоту, глицин, аргинин, аспарагиновую кислоту) или гидролизат казеина – неопределенный источник аминокислот. В состав сред включают водорастворимые витамины: тиамин, рибофлавин, биотин, пантотеновую кислоту, пиридоксин, аскорбиновую кислоту.

Из фитогормонов в составе сред наиболее часто используют ауксины и цитокинины.

Ауксины необходимы в следующих случаях. Так, 2,4-Д используют для индукции каллуса у злаков, бобовых, томатов, хлопчатника; для роста суспензионных культур многих растений; для индукции эмбриогенеза при культивировании пыльников и зародышей злаков; в сочетании с другими фитогормонами для фор-

мирования у протопластов клеточной стенки и последующего образования клеточных колоний.

ИУК, ИМК, НУК, ФУК и ФМК применяют в качестве индукторов образования корней, а в сочетании с цитокининами эти фитогормоны могут быть использованы для развития проростков при культивировании изолированных зародышей. Кроме того, ИУК необходима для индуцирования каллусогенеза и при культиви-ровании пыльников у двудольных растений.

Из гиббереллинов в составе культуральных сред используют гибберелловую кислоту для индукции побегообразования у цитрусовых и для поддержания роста суспензионных культур.

Цитокинины в составе сред включают для стимуляции клеточного деления в каллусных и суспензионных культурах, в культурах протопластов, при регенерации проростков из соматических эмбриоидов или стеблевых почек.

Абсцизовую кислоту применяют при культивировании протопластов.

Питание культивируемых тканей гетеротрофно, поэтому в состав культуральных сред необходимо вводить источники углерода – углеводы. Наиболее часто используют сахарозу, которая в результате автоклавирования при стерилизации сред гидролизуеться до более доступных к усвоению растительными клетками моносахаридов. Для некоторых тканей показано использование глюкозы, фруктозы, мальтозы или крахмала.

Для приготовления твердых сред чаще всего используют полисахарид – агар. Обычная его концентрация – 8–10 г на литр среды. Агар обеспечивает диффузию питательных элементов из среды в культивируемые ткани. Вместо агара можно использовать биогели.

Необходимо учитывать, что клетки растений и отдельные компоненты среды (витамины, фитогормоны, агар) чувствительны к определенным концентрациям водородных ионов. Так, агар в кислой среде теряет способность образовывать гель. В зависимости от объектов культивирования рН среды может варьировать от 5.2 до 6.6.

Раздел 7. КУЛЬТУРА ОТДЕЛЬНЫХ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ТОТИПОТЕНТНОСТИ

Первые работы по *изоляции клеток* растений и получению изолированных *клонов* выполнены в 1954 г. в Висконсинском университете США. Отдельные клетки выделяли из рыхлой каллусной ткани табака, культивированной в жидкой питательной среде при постоянном встряхивании на шейкере. Предварительные эксперименты показали, что при помещении отдельной изолированной клетки в культуральную среду ее деления не происходило.

Однако клоны из таких клеток удалось получить Мьюиру с соавт. в 1954 г. с использованием *метода ткани-«няньки»*.

В этом случае изолированную клетку переносили на фильтровальную бумагу, смоченную питательной средой и помещенную на поверхность хорошо растущей каллусной ткани. Каллусная ткань индуцировала и поддерживала деление клетки, а затем и развитие клеточного клона.

Позже был разработан метод массового культивирования отдельных изолированных клеток – *метод плейтинга* (от англ. *the plate* – чашка) (Bergman, 1959).

Метод включает следующие процедуры:

- Получение клеточной суспензии в жидкой питательной среде из хорошо растущей каллусной ткани.
- Фильтрация суспензии через сито для удаления крупных клеточных агрегатов.
- Приготовление 0,6–1 % агаровой среды того же состава, который был использован для поддержания роста суспензии.
- Нагревание агаровой среды до жидкого состояния и перемешивание ее с равным количеством суспензии, которую необходимо разлить в чашки Петри слоем около 1 мм.
- Определение местоположения отдельных клеток с использованием инвертированного микроскопа и нанесение пометок об их наличии на крышках чашек.
- Культивирование в темноте при $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и наблюдение за развитием одноклеточных клонов.

В экспериментах Бергмана около 20 % изолированных каллус-

ных клеток табака делилось и образовывало колонии. При данном способе культивирования, даже при недостаточно сбалансированном составе питательной среды может происходить деление клеток. Это обусловлено тем, что в соседних колониях, образованных из мелких клеточных агрегатов, синтезируются ростовые вещества, которые выделяются в среду и стимулируют клеточное деление.

Метод микрокамеры разработан Джонсом с соавт. в 1960 г. (рис. 2), который может быть использован при оптимальной сбалансированности состава среды для культивирования отдельной изолированной клетки.

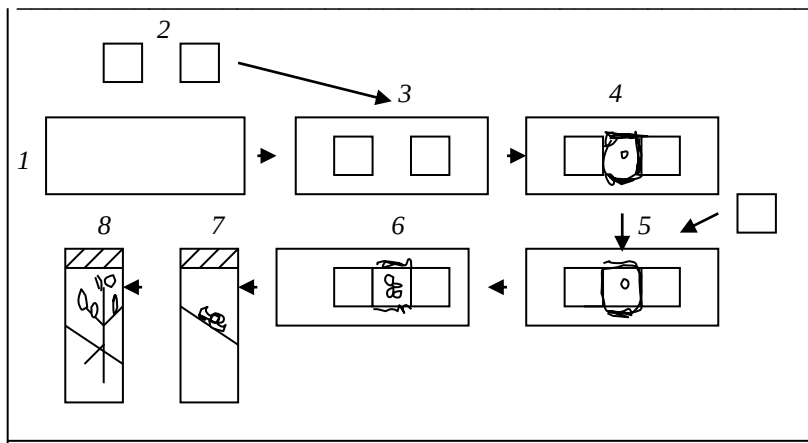


Рис. 2. Схема техники микрокамеры для культивирования изолированной клетки (Jones et al., 1960): 1 — предметное стекло; 2 — покровные стекла; 3 — наклеенные на предметное стекло покровные стекла; 4 — очерченная парафиновым маслом камера и помещенная в камеру клетка; 5 — заклеенная покровным стеклом камера с клеткой; 6 — развитие клеточной колонии; 7 — пассирование клеточной колонии на регенерационную среду; 8 — развитие растения-регенеранта

Последовательность выполнения метода такова:

- На предметное стекло с помощью парафинового масла на небольшом расстоянии наклеиваются два покровных стекла.
- Между покровными стеклами наносится квадрат из парафинового масла.

- В камеру из парафинового масла помещают каплю питательной среды с изолированной клеткой.

- Сверху камеру накрывают третьим покровным стеклом, а за развитием клеточной колонии наблюдают под микроскопом.

Использование микрокамеры Джонса позволило Вэсилу и Хильдебрандту в 1965 г. продемонстрировать возможность получения из изолированной клетки табака нормально развивающегося и достигшего цветения растения. Таким образом, впервые экспериментально была **доказана тотипотентность клетки растения**.

Эксперимент Вэсила и Хильдебрандта заключался в следующем:

- Хорошо растущую каллусную ткань помещали в сосуды с жидкой средой.

- Сосуды устанавливали на шейкер, где при встряхивании происходило образование суспензии, состоящей из отдельных клеток и клеточных агрегатов.

- С помощью пипетки выделяли из суспензии клетку и помещали с каплей питательной среды, содержащей кокосовое молоко и синтетический ауксин - НУК, в микрокамеру.

- Из клетки выращивали каллусную культуру.

- Каллус пассировали из микрокамеры на свежую агаризованную среду, где происходило развитие проростка.

- После пересадки в грунт растение достигло цветения.

В 1966 г. в независимой работе Ф. Стюарда (Steward et al., 1966), наблюдавшего в суспензионной культуре моркови развитие эмбриоидов из отдельных клеток, доказательство тотипотентности отдельной растительной клетки было подтверждено. Выращенные в суспензионной культуре эмбриоиды при пересадке на агаризованную среду развивались в растения.

Раздел 8. КУЛЬТУРА КЛЕТОЧНЫХ СУСПЕНЗИЙ

8.1. Получение суспензионных культур

Под **суспензионными культурами** понимают выращивание в жидкой среде во взвешенном состоянии отдельных клеток или их небольших агрегатов при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

Для получения суспензионных культур используют каллусную ткань рыхлого типа, которая легко фрагментируется на отдельные клетки и небольшие агрегаты при помещении ее в перемешиваемую жидкую среду. С этой целью при культивировании каллуса из среды исключают цитокинины или снижают их концентрацию, а концентрацию ауксинов увеличивают.

Суспензионные культуры, как правило, состоят из отдельных клеток, варьирующих по форме и размеру, и неоднородных многоклеточных агрегатов. Соотношение отдельных клеток и таких агрегатов в суспензии зависит от видовой принадлежности растения и условий культивирования.

В процессе культивирования активно делящиеся клетки не только поглощают питательные вещества, но и выделяют продукты собственной жизнедеятельности, в том числе и ферменты. Так, в суспензионной культуре щавеля и сахарного тростника обнаружена α -амилаза, в среде с культурой табака – фосфогидролазы. Выделяемые в среду ферменты способствуют дисперсности суспензии. Повышать дисперсность суспензионных культур можно и добавлением в среду низких концентраций ферментов – пектиназы и целлюлазы.

Для культивирования суспензий используют несколько систем, в том числе **накопительное (периодическое) и непрерывное культивирование.**

8.2. Накопительное культивирование суспензий

Накопительное культивирование является наиболее простым принципом. В этом случае размножение популяции клеток осуществляется в закрытой системе в постоянном объеме питательной среды. Начальная плотность клеточной популяции составляет от $0,5 \cdot 10^5$ – $2,5 \cdot 10^5$ клеток / мл среды.

Сосуды с суспензией закрепляют на платформе шейкера или устанавливают на качалки ротационного типа. В этих условиях обеспечивается аэрация и, кроме того, нарастающая масса клеточных агрегатов распадается на отдельные фрагменты. В лабораторных условиях обычно используют сосуды объемом 100–250 мл с небольшим объемом питательной среды – 20 и соответственно 70 мл.

Крупномасштабное культивирование осуществляют в сосудах объемом до нескольких десятков литров с продуванием жидкой среды воздухом.

8.3. Фазы ростового цикла в суспензионной культуре

Ростовой цикл, или **цикл выращивания** – это период от помещения **инокулюма** (части суспензионной культуры) на свежую среду до следующего субкультивирования.

Суспензионная культура представляет собой популяцию отдельных клеток и небольших клеточных агрегатов, которые, в свою очередь, являются субпопуляциями, состоящими из нескольких клеток. Несмотря на морфологическую и физиологическую гетерогенность внутри популяции, рост клеточных культур описывается однозначно S-образной кривой (рис. 3).

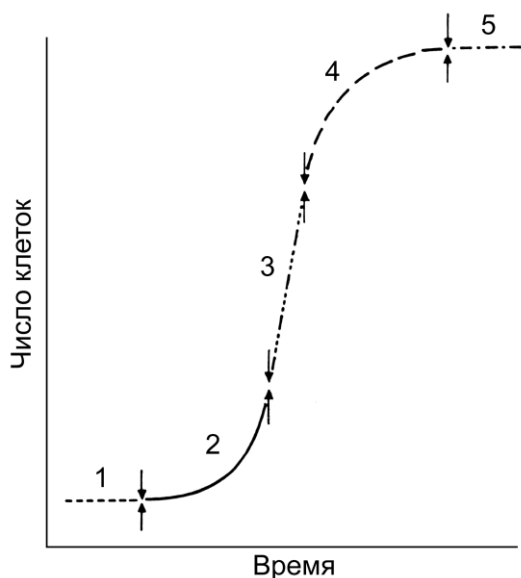


Рис. 3. Рост клеточной популяции при культивировании в накопительном режиме: 1 – латентная фаза; 2 – экспоненциальная фаза; 3 – линейная фаза роста; 4 – фаза замедления роста; 5 – стационарная фаза

Различают следующие *фазы ростового цикла*:

- 1) латентная фаза;
- 2) экспоненциальная или логарифмическая фаза роста;
- 3) линейная фаза роста;
- 4) фаза замедления роста (период зрелости или ранняя стационарная фаза);
- 5) стационарная фаза;
- 6) фаза гибели клеток.

8.4. Характеристика фаз ростового цикла

Латентная фаза (лаг-фаза). В этот период клетки не размножаются, отсутствует их видимый рост, но происходит активный процесс поглощения воды и питательных веществ.

Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста. Это ограниченный период в ростовом цикле накопительной культуры, в ходе которого происходит экспоненциальное (логарифмическое) увеличение количества клеток за счет их интенсивного деления и как следствие – увеличение сухого вещества.

Различают раннюю и позднюю экспоненциальные фазы. В течение ранней экспоненциальной фазы наблюдается ряд цитологических изменений, в том числе увеличивается объем цитоплазмы, число полирибосом и митохондрий.

Наряду с цитологическими изменениями имеет место и активация клеточного метаболизма: увеличивается содержание РНК, белка, ДНК, интенсивность поглощения кислорода. Все эти процессы приводят к активному делению клеток и образованию клеточных агрегатов.

В течение поздней экспоненциальной фазы роста суспензионной культуры наблюдается замедление клеточного деления, но происходит растяжение клеток. Таким образом, увеличение биомассы в этот период происходит в основном за счет растяжения клеток.

Линейная фаза очень короткая. Удельная скорость роста культуры в этой фазе практически постоянная.

Фаза замедления роста (ранняя стационарная фаза). В этот период средний размер клеток продолжает возрастать, отмечается гетерогенность клеточной популяции и начало синтеза вторичных веществ.

Стационарная фаза. К этому периоду ростового цикла суспензионная культура достигает максимума сухого веса. В культуральной среде накапливаются продукты жизнедеятельности клеток, угнетающие рост культуры. Культуральная среда истощается по наличию основных компонентов, обеспечивающих азотное, фосфорное, углеводное питание.

Чтобы не наступила гибель клеток, необходимо *субкультивирование*, т.е. перенос части суспензионной культуры на свежую среду. В среднем от начала культивирования до стационарной фазы роста проходит 21–28 дней. Продолжительность ростового цикла зависит от условий культивирования, исходной плотности, возраста инокулюма, состава и объема питательной среды, видоспецифичности исходной культуры.

8.5. Непрерывное культивирование

Другой метод выращивания клеточных культур – *непрерывное культивирование* – основан на поддержании баланса между разбавлением питательной среды и удалением части суспензии.

Установлено, что если при накопительном культивировании клеточных суспензий в экспоненциальной фазе роста в культуральную систему добавлять свежую среду, то деление клеток может поддерживаться неограниченно долго. Это послужило основой создания систем, позволяющих осуществлять непрерывное культивирование.

Культуральные системы, функционирующие непрерывно, разделяют на *полупроточные* и *проточные*.

При *полупроточном режиме выращивания* через определенные интервалы времени производится отбор части суспензии и разбавление оставшейся суспензии свежей средой. Через суспензию пропускают стерильный воздух. Культуру перемешивают с помощью магнитной мешалки. Культивирование может продолжаться в течение нескольких месяцев.

Проточный режим культивирования позволяет осуществлять непрерывное снабжение культуральной системы свежей средой с удалением равного объема клеточной суспензии (рис. 4). В таком режиме автоматизированные *биореакторы* могут функционировать в течение нескольких лет.

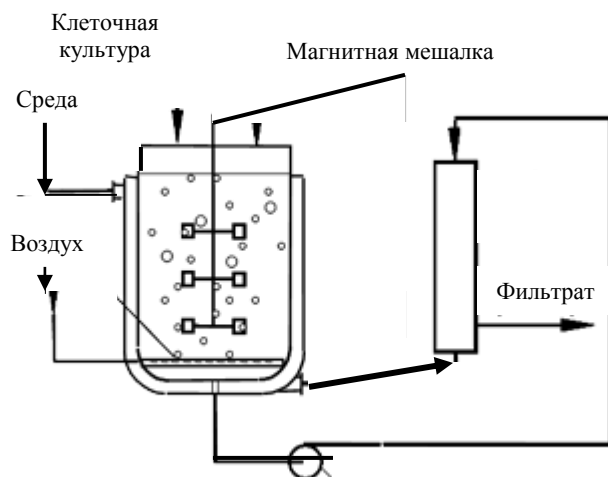


Рис. 4. Схема одного из типов биореактора

Ферментеры (культуральные емкости), используемые для производства больших клеточных биомасс, могут достигать объема до 1 500 л. Для осуществления многостадийных процессов при промышленном культивировании клеток-продуцентов веществ вторичного обмена используют конструкции, состоящие из системы нескольких ферментеров.

Культивирование клеточных суспензий используют для изучения дифференциации клеток, их биосинтетических особенностей, популяционных взаимоотношений, а также для промышленного получения продуктов клеточного метаболизма, используемых в том числе и в фармацевтической промышленности (разд. 14).

8.6. Основные параметры клеточных культур

При выполнении работ с использованием культуры клеточных суспензий необходимо знать их основные параметры.

Плотность клеточной популяции – концентрация клеток в 1 мл суспензии.

Минимальное время удвоения клеточной популяции в накопительной суспензионной культуре. Так, время клеточного удвоения для сахарной свеклы составляет 86 ч, табака – 48, фасоли – 22 ч.

Вес сырого вещества суспензии определяют после помещения ее на предварительно взвешенный фильтр из нейлоновой ткани и промывания водой для удаления остатков питательной среды.

Вес сухого вещества определяют после просушивания определенной навески сырой биомассы при 60–70 °С в течение суток.

Количество клеток. Чтобы установить количество клеток в определенном объеме суспензии, необходимо диспергировать ее содержимое до одноклеточного состояния обработкой 5–10 %-й хромовой кислотой. Подсчет клеток проводят, используя 1 мл одноклеточной суспензии, нанесенный на сетку счетной камеры.

Размер клеток определяют их измерением под микроскопом с помощью шкалы окуляр микрометра.

Жизнеспособность культуры определяют соотношением количества жизнеспособных клеток к общему количеству в миллилитре суспензии. Жизнеспособные культуры характеризуются наличием клеток с ядрами и движением цитоплазмы при окрашивании препаратов красителями: 0,5 %-м раствором синей Эванса или 0,01 %-м раствором флуоресцеинацетата.

Как правило, клеточная популяция суспензионных культур не только гетерогенна, но и асинхронна, так как содержит клетки, различающиеся по времени вхождения в митоз. Для синхронизации клеточных культур используют методы индукции, когда течение клеточного цикла блокируется в определенном периоде под влиянием или физических факторов, например, пониженной температурой, или химических соединений.

Индукторами синхронизации в системе культивируемых клеток могут быть ингибиторы синтеза ДНК – тимидин, 5-аминоурацил, оксимочевина. В результате обработки клеток этими веществами клеточный цикл продолжается только до G₁-периода и клетки накапливаются перед синтетическим периодом. Удаление из среды ингибитора приводит к синхронизированному переходу клеток к синтезу ДНК, а затем и делению.

Другой способ синхронизации заключается в создании условий «голодания» по одному из компонентов культуральной среды, например ауксину, цитокинину, углеводам, азоту. Клетки накапливаются в G₁ или G₂-периоде клеточного цикла. Затем пассирование суспензии на среду с недостающим компонентом приводит к син-

хронизации клеточного деления. С помощью индукции синхронизации клеточных делений удастся повысить митотический индекс с 2–3 % до 30–35 %. Синхронизацию клеточной культуры используют при получении искусственных семян (разд. 11).

Раздел 9. ХАРАКТЕРИСТИКА КАЛЛУСНЫХ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

9.1. Образование каллуса

При помещении фрагмента ткани или органа растения на питательную среду соответствующего состава может происходить дедифференциация соматических клеток с образованием каллусной ткани. Первый этап дедифференциации клетки связан с ее вхождением в клеточный цикл, что происходит под действием фитогормонов – ауксинов и цитокининов. Однотипно образующиеся каллусные клетки в процессе культивирования формируют каллусную ткань, которую характеризует гетерогенность по клеточному составу. Каллусная ткань может содержать клетки следующих типов: паренхимные, меристематические, некротические, а также отдельные клетки или зоны проводящей системы.

Неоднородность по клеточному составу может быть связана: 1) с клеточной гетерогенностью исходного экспланта; 2) с процессами вторичной дифференциации, происходящими при культивировании.

В зависимости от условий культивирования и происхождения исходного экспланта в каллусных культурах могут происходить различные преобразования.

9.2. Образование «привыкшей» ткани

В процессе культивирования под действием факторов среды могут образовываться мутантные клетки – суперпродуценты фитогормонов. Если такие клетки получают преимущественное развитие, то в культуре обеспечивается уровень фитогормонов, необходимый для роста ткани на питательной среде без данного фитогормона.

В результате могут формироваться или ауксин-независимые, или цитокининнезависимые культуры. Их принято называть «привыкшие» ткани, или «химические» опухоли. Такую культуру даже при разной ploидности клеток характеризует морфологическая однородность и выраженная интенсивность клеточного деления.

Впервые «привыкшие» ткани были получены в экспериментах Р. Готре в 1937 г. (рис. 5). По своим особенностям такие культуры сходны с опухолевыми тканями вирусного и бактериального происхождения, способны развиваться на целом растении или в культуре *in vitro*.

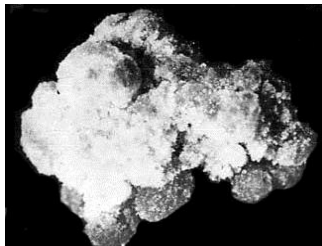


Рис. 5. «Привыкшая» ткань моркови

9.3. Дифференциация элементов проводящей системы в каллусной культуре

В интактном растении дифференциация элементов проводящей системы – ксилемы и флоэмы – видоспецифична и органоспецифична. Ксилема – это водопроводящая ткань сосудистых растений. Функция флоэмы – осуществление транспорта продуктов фотосинтеза от листьев к местам потребления или отложения в запас.

В процессе культивирования клетки каллусной ткани могут специализироваться на образовании адвентивных (добавочных) элементов проводящей ткани. Как правило, такая специализация необратима. Факторами, индуцирующими образование элементов проводящей системы, могут быть сахароза, ауксины, цитокинины.

Впервые экспериментальное доказательство влияния ауксина на образование элементов проводящей системы в каллусе было выполнено французским ботаником Камусом в 1949 г. (Camus, 1949). Камус прививал маленькие почки – источники синтеза ауксина – на поверхность культуры ткани корня цикория. Примерно через месяц в паренхимной ткани ниже привитых почек наблюдалось образование сосудистых узелков и пучков (рис. 6). Позже было показано прямое действие ауксина на ксилогенез.

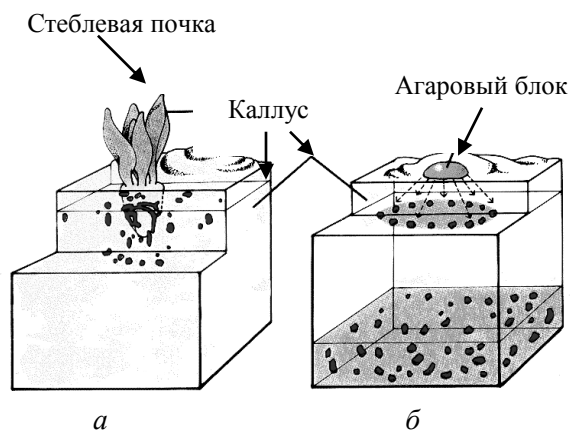


Рис. 6. Формирование элементов проводящей системы в каллусе под действием ауксинов, синтезируемых привитой стеблевой почкой (а) и добавленного в агаровый блок (б)

Вместо развивающейся почки на поверхность каллуса помещали агаровый блок, содержащий ауксин, и наблюдали развитие проводящих пучков.

Эффект ауксина на дифференциацию проводящих элементов в каллуснокультуре тесно связан с влиянием сахарозы. При одной и той же концентрации ауксина (0,05 %), но при разных концентрациях сахарозы в агаровом блоке могут иметь место разные события. Например, добавление раствора 2 %-й сахарозы приводит к образованию элементов ксилемы, 4 %-й – к образованию элементов флоэмы, а 3 %-я сахароза индуцирует формирование элементов и ксилемы, и флоэмы.

9.4. Цитогенетические особенности культивируемых клеток

Культуру каллусных тканей характеризует не только гетерогенность по степени дифференцированности клеток, но и гетерогенность по цитогенетическим характеристикам.

Цитогенетическая гетерогенность в культуре *in vitro* может быть обусловлена двумя причинами.

1. Клетки исходного экспланта имеют разную ploидность. В условиях *in vitro* эти клетки индуцируются к делению и становятся источником отдельных клеточных линий.

2. Клетки исходного экспланта имеют одинаковую ploидность, характерную для меристематических клеток растения, но в условиях культивирования ploидность отдельных клеток может измениться.

Установлено, что примерно у 90 % из числа изученных покрытосеменных растений в процессе дифференцировки клеток происходит их полиploидизация. Такие растения относят к **полисоматическим** или **миксоploидным**, т. е. к растениям, одновременно содержащим и диплоидные, и полиploидные клетки. Это, например, бобовые, пасленовые и т. д. Виды растений, клетки которых при дифференцировке сохраняют исходный уровень ploидности, относят к **неполисоматическим**. К таким видам относятся *Crepis capillaris*, *Ipomoea batatas*, *Ipomea purpurea*, а также ряд видов *Lilium*.

Выделены и промежуточные виды, такие как подсолнечник и топинамбур. У этих видов содержание полиploидных клеток обнаруживают только в определенных тканях и не у всех растений.

Следовательно, у большинства растений только в апикальных меристемах, т. е. в кончиках корешков и верхушках побегов, клетки характеризуются нормальным клеточным циклом: за синтезом ДНК следует деление ядра, а затем и всей клетки с образованием двух дочерних клеток. Таким образом, в апикальных меристемах ploидность поддерживается на одном уровне и характеризует цитотип данного растения.

Клетки с различным уровнем ploидности образуются в результате эндомитоза и эндоредупликации. Оба эти процесса являются такими формами митоза, при которых не происходит деление ядра и клетки, но содержание ДНК в ядре увеличивается в геометрической прогрессии.

В условиях культивирования *in vitro* эндомитоз и эндоредупликация могут иметь место и у неполисоматических видов растений. Например, после года культивирования часть диплоидных клеток каллусной ткани *Crepis capillaris* преобразуется в полиploидные клетки. В условиях культивирования в большей степени,

чем у интактных растений наряду с полиплоидизацией происходит образование анеуплоидных клеток и клеток со структурными изменениями хромосом.

Индукторами цитогенетической изменчивости клеток в культуре могут быть различные компоненты питательной среды.

Наиболее хорошо изучена роль фитогормонов. При этом необходимо подчеркнуть, что действие одного и того же фитогормона в разных культуральных системах может приводить к неодинаковой реакции клеток.

Так, в экспериментах по культивированию сегментов корня гороха на среде, содержащей синтетический ауксин – 2,4-Д, наблюдалось деление диплоидных клеток. При добавлении в питательную среду кинетина начинали делиться тетраплоидные клетки.

В других экспериментах показана роль 2,4-Д как фактора полиплоидизации. Например, в суспензионной культуре гаплопапуса при наличии в питательной среде 2,4-Д в течение 6 мес культивирования происходило превращение диплоидной культуры в тетраплоидную.

Как правило, с увеличением продолжительности культивирования, независимо от состава питательной среды и происхождения культуры, происходит увеличение цитогенетической нестабильности.

Раздел 10. ОРГАНОГЕНЕЗ В КУЛЬТУРЕ СОМАТИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

Реализация тотипотентности соматических клеток лежит в основе вегетативного размножения растений. Отрезки стеблей, корней и листья растений способны к регенерации новых побегов и корней.

При культивировании *in vitro* эти возможности могут быть значительно увеличены, а у растений, не проявляющих регенерационной способности в природных условиях, индуцированы.

Если при культивировании развитие корней, стеблевых или цветочных почек происходит из клеток экспланта без образования каллуса, то такой **путь органогенеза** называют **прямым** (рис. 7).

Непрямой путь органогенеза – формирование структур, приводящих к образованию корней, стеблевых и цветочных почек из клеток каллуса.

Пример прямого органогенеза в условиях *in vivo* и *in vitro* – образование стеблевых почек у льна. Так, если у 15-дневных проростков льна удалить верхушку стебля, то через определенный промежуток времени из эпидермальных клеток гипокотилия происходит образование многочисленных стеблевых почек. Позже одна из почек доминирует в развитии и дает полноценный стебель.

Если сегмент гипокотилия льна размером примерно 15 мм поместить на агаризованную культуральную среду с фитогормонами, то развитие может получить до 170 проростков.

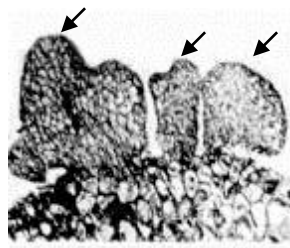


Рис. 7. Прямой путь развития стеблевых почек в культуре изолированного эндосперма *Scurrula pulverulenta* (Bhojwani et Johri, 1970)

Возможные пути преобразования, включая органогенез, при культивировании изолированной ткани представлены на рис. 8.

Предрасположенность клеток культивируемой ткани к определенному пути органогенеза в условиях *in vitro* может зависеть от многих факторов. К числу наиболее хорошо изученных факторов относят следующие:

- таксономическая принадлежность и генотип исходного растения;
- онтогенетический возраст растения;
- локализация ткани, использованной в качестве экспланта;
- действие физических факторов при культивировании;
- длительность культивирования;
- состав питательной среды.

Ниже приведены примеры, подтверждающие эти положения.

Зависимость от таксономической принадлежности наиболее хорошо прослеживается при сравнении особенностей культивирования изолированных органов и тканей у двудольных и однодольных растений. У двудольных растений каллусную ткань, способную к органогенезу, можно индуцировать не только из меристематических клеток, но и из вполне дифференцированных тканей листьев, стебля, корня.

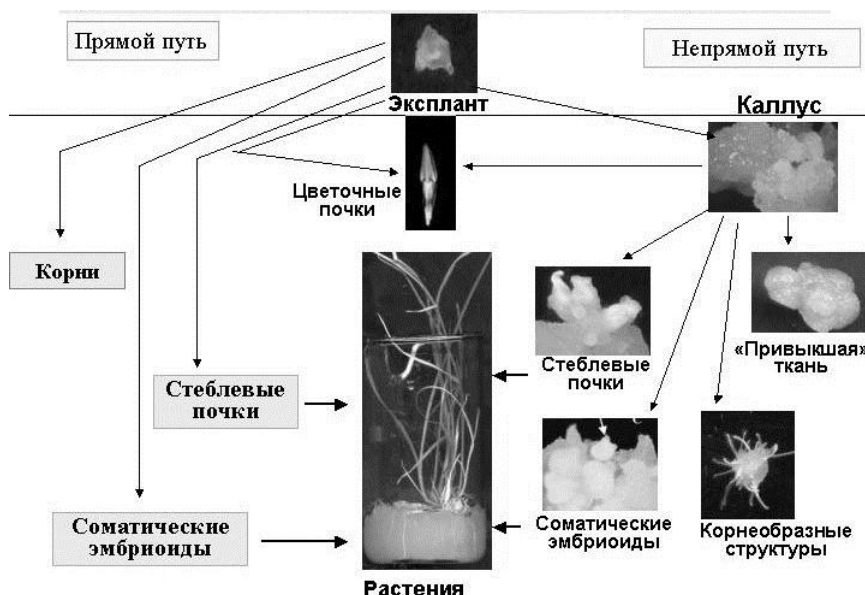


Рис. 8. Возможные пути преобразования при культивировании изолированных тканей

У однодольных растений для получения каллусной ткани в качестве эксплантов можно использовать только ткани, содержащие меристематические клетки. Например, у злаков каллус можно получить из зародышей, гипокотили, корневых и стеблевых апексов, сегментов молодых листьев, молодых соцветий. Возможности получения растений-регенерантов у злаков еще более ограничены. Регенерация растений происходит в основном из каллуса, индуцированного из молодых зародышей и молодых соцветий.

Роль генотипа в проявлении морфогенной способности в культуре тканей хорошо изучена на примере разных сортов, изогенных и мутантных линий табака, моркови, цветной капусты, пшеницы, риса и других растений. Выявлены соответствующие доноры с высоким морфогенным потенциалом в культуре *in vitro*.

Зависимость особенностей органогенеза от онтогенетического состояния растения хорошо показана при изучении особенностей культивирования листовых эксплантов эчеверии из семейства толстянковых и табака.

Так, у эчеверии наблюдали следующие закономерности:

- 1) при культивировании молодых листьев происходит образование корней;
- 2) из листьев, вычлененных у растений, средних по возрасту, индуцируется развитие и стеблевых почек, и корней;
- 3) из листьев, вычлененных из зрелых растений, развиваются только стеблевые почки.

В каллусной культуре, индуцированной из сегментов стебля молодых, не цветущих растений табака, происходила регенерация вегетативных почек. Каллусы, полученные из сегментов стебля цветущего растения, давали преимущественно цветочные почки.

Такие различия в характере органогенеза при культивировании на средах одинакового состава определяются содержанием эндогенных фитогормонов в тканях исходного экспланта.

Уровень эндогенных фитогормонов определяет и *зависимость между типом органогенеза и локализацией ткани*, использованной в качестве исходного экспланта. Например, при культивировании на среде одного и того же состава сегментов стебля, выделенных из разных частей цветущего растения табака, можно наблюдать проявление разных типов органогенеза.

Формирование вегетативных почек, как правило, происходит из сегментов стебля, изолированных от базальной части. Вегетативные и цветочные почки в определенном соотношении регенерируют из сегментов, выделенных из средней части стебля. Только цветочные почки развиваются из сегментов, изолированных от зон, близких к соцветию.

Особенности органогенеза зависят от таких *физических факторов*, как температура, содержание кислорода в культуральной системе, продолжительность и качество освещения.

Так, при культивировании ткани моркови уменьшение содержания кислорода в культуральной системе приводит к образованию стеблевых почек, а его увеличение – к образованию корней. На примере культуры топинамбура выявлено, что при действии голубым светом индуцируется побегообразование, а освещение красным светом вызывает корнеобразование.

Результаты многих экспериментов однозначно продемонстрировали, что с *увеличением продолжительности культивирования*

тканей утрачивается их способность к регенерации стеблевых и цветочных почек. Гораздо дольше сохраняется способность к ризогенезу – развитию корней.

Что касается *факторов питательной среды*, влияющих на особенности регенерации в культуре ткани, то наиболее убедительно показана роль фитогормонального баланса на индукцию стеблевых почек и корней.

В этом отношении классической является работа, выполненная Скугом и Миллером в 1957 г. (Skoog, Miller, 1957). Из сердцевинной паренхимы стебля цветущего растения табака была получена каллусная культура, клетки которой могут размножаться и расти на среде с ауксином (ИУК) и кинетином.

При наличии в среде разного соотношения этих гормонов (табл. 2) наблюдаются следующие особенности:

Таблица 2

**Влияние соотношения ауксина (ИУК) и кинетина
на особенности органогенеза в каллусной культуре табака
(Skoog, Miller, 1957)**

Кинетин (мг / л)	Ауксин (мг / л)		
	0	1	3
0	Каллус не растет	Корне- образование	Корне- образование
0.2	Рост каллуса	Рост каллуса	Рост каллуса
1	Стеблевые почки и побеги без корней	Стеблевые почки, побеги, корни	Каллус с единичными проростками

1. Определенное превышение концентрации кинетина над ауксином в неорганизованно растущей каллусной культуре приводит к образованию стеблевых почек и побегов.

2. Увеличение концентрации ауксина приводит к развитию корней.

3. Среднее, близкое к равному, соотношение концентраций этих фитогормонов поддерживает неорганизованный рост каллусной ткани.

Процессы органогенеза на клеточном уровне могут носить продолжительный характер и быть асинхронными. В каллусной культуре образование меристематических зон происходит в основном в базальной ее части, контактирующей с питательной средой.

Клетки меристематических зон характеризуются интенсивным синтезом РНК и белка и становятся источником формирующихся зачатков органов. Этот процесс контролируется экзогенными фитогормонами, содержащимися в питательной среде, и эндогенными, синтезируемыми самими клетками.

Возможность индуцирования процессов органогенеза и регенерации растений из стеблевых почек в культуре *in vitro* используется для массового размножения растений (разд. 15).

Раздел 11. СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ

При культивировании *in vitro* и из клеток экспланта, и из клеток каллуса могут развиваться **соматические зародыши** или **эмбриониды**, которые, как и стеблевые почки, при прорастании дают целые растения. В зависимости от пути образования соматических эмбрионидов – из экспланта или каллуса различают **прямой и непрямой путь соматического эмбриогенеза** (рис. 8).

Морфологические различия между стеблевыми почками и эмбрионидами заключаются в следующем (рис. 9).

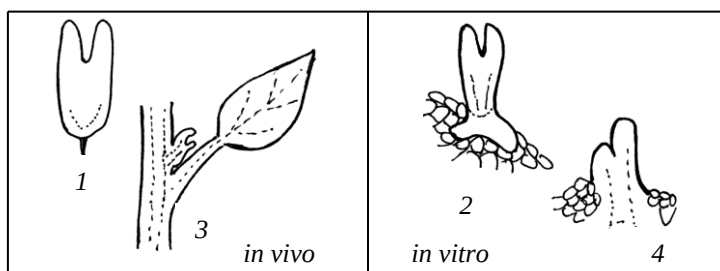


Рис.9. Морфологические особенности зиготических (1) и соматических (2) зародышей по сравнению со стеблевыми почками, развивающимися *in vivo* (3) и *in vitro* (4)

Стеблевые почки, развивающиеся и у интактных растений, и в культуре *in vitro*, монополярны и не автономны, так как связаны сосудистыми тканями с органом растения или каллусной тканью.

Эмбриониды развиваются из отдельных соматических клеток как автономные структуры (рис. 10). Для соматических зародышей, как и для зиготических, характерна биполярность.

Пример соматического эмбриогенеза *in vivo* и *in vitro* – адвентивная полиэмбриония у цитрусовых (рис. 11).

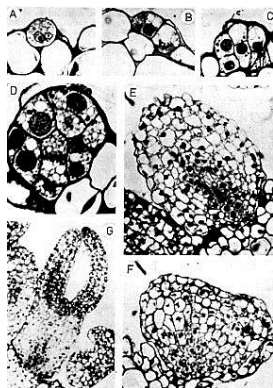


Рис. 10. Последовательное развитие соматических эмбрионидов из эпидермальных клеток стебля лютика ядовитого (Konar et al., 1972)



Рис. 11. Развитие эмбрионидов из нуцеллуса *Citrus reticulata* в культуре изолированных семяпочек (Sabharwal, 1962)

В одном семени может развиваться до сорока зародышей. Обычно один зародыш зиготический. Он формируется от слияния половых клеток и несет признаки материнского и отцовского растения. Остальные зародыши – неполовые, развиваются из клеток нуцеллуса, окружающего зародышевый мешок, и несут признаки только материнского растения. Способность к полиэмбрионии у цитрусовых используют для клонального размножения. Нуцеллус изолируют и культивируют *in vitro* в условиях, где из отдельных клеток индуцируется образование эмбрионидов.

Образование структур, подобных зародышевым, впервые описал Ф. Стюард в 60-е гг. XX столетия. Культивирование клеток корня моркови в жидкой среде с кокосовым молоком приводило к их быстрому делению и образованию клеточных агрегатов.

Внутри этих агрегатов происходила дифференцировка элементов ксилемы, после чего формировались корневые зачатки. При переносе культуры на агаризованную среду наблюдалось образование из этих структур побегов, развивающихся в целое растение.

Источником эмбриогенного каллуса у моркови могут быть разные органы: корень, листья, стебель, зиготические зародыши.

Интересной моделью для изучения соматического эмбриогенеза является лютик ядовитый – *Ranunculus sceleratus*. На среде, содержащей кокосовое молоко, в соматических тканях и пыльниках формируется эмбриогенный каллус. В течение трех недель как внутри каллуса, так и на его поверхности образуются эмбриониды, по своему строению напоминающие зиготические зародыши.

Такие же эмбриониды могут формироваться и из клеток суспензионной культуры. При пассировании соматических зародышей на свежую среду индуцируется развитие проростков, у которых по всему стеблю из отдельных эпидермальных клеток без дополнительной индукции формируются многочисленные эмбриониды.

У злаков в условиях культивирования эмбриогенный каллус может быть получен из клеток щитка молодых зародышей, помещенных на поверхность агаризованной среды, содержащей 2.4-Д. (Щиток – семядоля зародыша злаковых.) Соматический эмбриогенез у злаков на примере культурного ячменя был впервые описан в 1970 г. Норстогом (Norstog, 1970).

Различают три основные критические стадии в развитии и прорастании эмбрионидов, индуцированных в каллусной культуре.

1. *Дедифференциация клеток экспланта.* Этот период связан с активацией генов, контролирующих деление клеток. В культуральную среду необходимо вводить ауксины (например, для злаков) или ауксины в сочетании с цитокининами (для хвойных), стимулирующие как процесс дедифференциации (образование каллуса), так и образования эмбриогенных групп клеток.

2. *Развитие эмбрионидов* происходит в зонах эмбриогенных клеток и контролируется генами, последовательно экспрессирующи-

мися на разных стадиях эмбриоидогенеза. На данном этапе культивирования концентрация ауксинов в питательной среде или снижается, или полностью исключается.

3. *Прорастание эмбриоидов и развитие растений.* В этот период требования к среде и условиям культивирования могут быть различными в зависимости от культивируемого объекта. Так, для развития растений из эмбриоидов цитрусовых в культуре нуцеллуса необходим гиббереллин, а у винограда культивирование проводят при пониженной температуре ($t = 4^{\circ}\text{C}$).

В целях *синхронизации* образования эмбриоидов в суспензионной культуре (рис. 12) используют приемы, описанные ранее (подразд. 8.6).

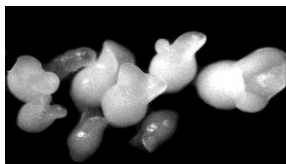


Рис. 12. Образование соматических эмбриоидов в синхронизированной культуре клеток тополя (Merke, 1995)

Чтобы индуцировать прорастание соматических эмбриоидов у злаков и цикламена, необходимо использовать безгормональную среду или среду с низким содержанием ауксинов. Возможность образования соматических зародышей используют для получения *искусственных семян* (рис. 13) или при клональном размножении растений (подразд. 15.2).

Для получения искусственных семян развитие соматических эмбриоидов индуцируют в культуре клеточных суспензий. Формирующиеся зародыши разделяют и инкапсулируют в биогели (рис. 13), высушивают и хранят при низких температурах. Проращивают на искусственных питательных средах.

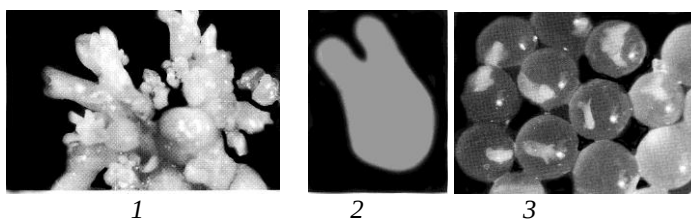


Рис. 13. Последовательные этапы получения искусственных семян *Coptis chinensis*: 1 – развитие соматических эмбриоидов в культуре изолированных семядолей, 2 – соматический эмбриоид с двумя семядолями, 3 – искусственные семена (Ke et al., 1995)

Искусственные семена получены с использованием соматических эмбриоидов лекарственного растения *Coptis chinensis*, кориандра, сельдерея, масличной пальмы и других растений.

Раздел 12. СОМАКЛОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ

Условия *in vitro* являются стрессом для культивируемых клеток и тканей. Это связано с изоляцией от целого организма его фрагментов и помещением их в новые условия.

Подчеркивалось, что в процессе культивирования наблюдается цитогенетическая и генетическая гетерогенность клеточных культур, что определяется:

1) клеточной гетерогенностью исходных эксплантов, связанной с уровнем их полисоматии (миксоплоидии);

2) условиями культивирования, где ведущая роль в индуцировании клеточной изменчивости принадлежит фитогормонам.

Вследствие этого растения, регенерировавшие в условиях *in vitro* из развивающихся соматических эмбриоидов или из стеблевых почек, могут характеризоваться **фенотипической** и **генетической** изменчивостью.

Так, спектр фенотипического разнообразия у растений-регенерантов более выражен, чем у их потомков, полученных после самоопыления. Это связано с физиологическими нарушениями, происходящими в процессе культивирования на искусственной питательной среде, приводящими к подавлению роста и развития растений, снижению их фертильности.

Например, у регенерантов ячменя и пшеницы можно наблюдать формирование сдвоенных колосьев, супротивно расположенных листьев. Такие нарушения, как правило, не наследуются.

Растения-регенеранты предложено называть **сомаклонами** (от: *сома* – тело) (Larkin, Scowcroft, 1981), а проявление генетической изменчивости у растений, регенерировавших в результате культивирования *in vitro*, – **сомаклональной изменчивостью**. Соматклоны, у которых проявляется генетическая изменчивость, относят к **сомаклональным вариантам**.

Приняты следующие обозначения для растений-регенерантов или соответственно для соматклонов и их самоопыленных потомков:

R – растение-регенерант; **R₁**, **R₂** и т. д. – первое, второе и последующие самоопыленные поколения растения-регенеранта;

SC – соматклон; **SC₁**, **SC₂** и т. д. – первое, второе и последующие самоопыленные поколения соматклона.

Выявлены следующие **механизмы, которые могут объяснить соматклональную изменчивость**:

1) грубые кариологические нарушения (изменения числа хромосом – полиплоидия, анеуплоидия; хромосомные перестройки – транслокации, делеции, инверсии, дупликации), которые хорошо определяются цитологическими методами анализа;

2) хромосомные перестройки, не выявляемые при цитологическом анализе и квалифицируемые как точковые мутации;

3) соматический (митотический) кроссинговер и обмен сестринских хроматид;

4) изменчивость цитоплазматических геномов;

5) амплификация и редукция генов;

6) активация ранее репрессированных (молчащих) генов;

7) активация мобильных элементов.

Таким образом, под термином «**соматклональная изменчивость**» понимают разнообразный спектр генетической, цитогенетической, молекулярной изменчивости, обусловленный изменениями в ядерном или цитоплазматических геномах в результате культивирования *in vitro*.

Каждый из указанных выше механизмов, обуславливающих изменчивость у соматклонов, в определенной степени связан с другими и зависит от нарушений клеточного цикла (рис. 14), индуцируемых действием фитогормонов, содержащихся в культуральной среде.

По аналогии с соматклональной изменчивостью изменчивость, проявляющуюся у растений, регенерировавших в результате культивирования протопластов, называют **протоклональной изменчивостью**, а регенерировавшие растения – **протоклонами**.

При работе с соматклонами и протоклонами установлены следующие закономерности:

- Спектр изменчивости у протоклонов выражен в большей степени, чем у соматклонов, так как лишенные клеточной стенки протопласты в большей степени, чем клетки, подвержены воздействиям экзогенных факторов.

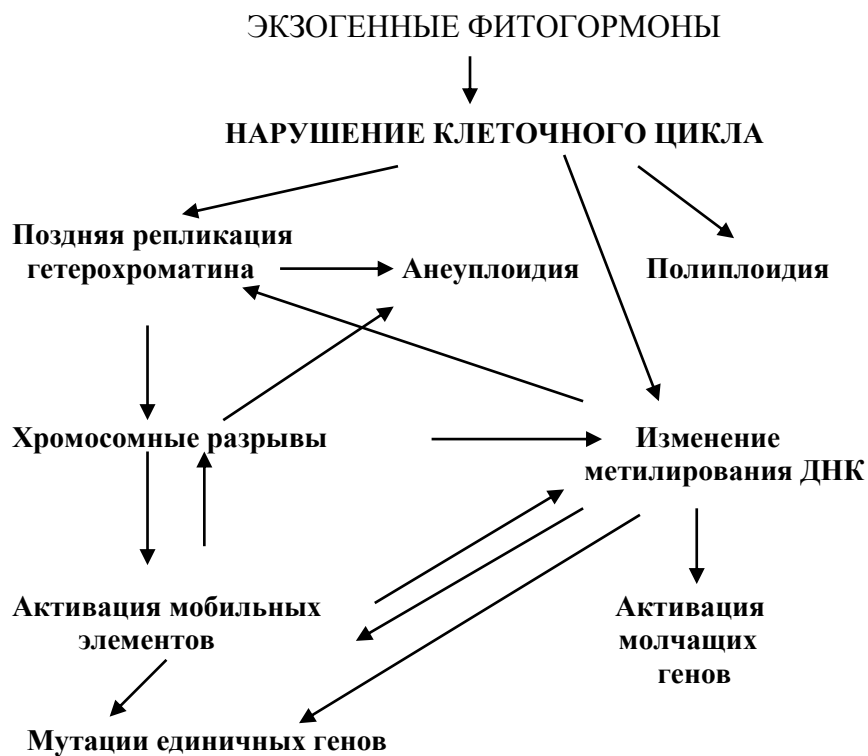


Рис. 14. Возможные взаимосвязи между нарушением клеточного цикла, цитологической изменчивостью, изменением метилирования и генетической изменчивостью в процессе культивирования *in vitro* (частично по Peschke, Phillips, 1992)

- Регенеранты, развившиеся в результате непрямого эмбриогенеза или органогенеза, т. е. из каллусов, характеризуются большей изменчивостью, чем регенеранты, полученные в результате прямого эмбриогенеза или органогенеза.
- С длительностью культивирования частота соматоклональной изменчивости у регенировавших растений увеличивается.
- Степень изменчивости по частоте цитогенетических нарушений у соматоклонов определяется жизнеспособностью растений, несущих эти нарушения.

Например, в каллусной ткани, индуцированной из молодых зародышей диплоидного культурного ячменя ($2n = 14$), может образовываться до 40 % тетраплоидных и до 30 % анеуплоидных клеток.

Однако в процессе регенерации селективное преимущество получают, как наиболее жизнеспособные, диплоидные растения (до 99 %). У аллополиплоидов анеуплоидия может не сказываться на жизнеспособности растений. Так, у гексаплоидных видов злаков ($2n = 42$) – мягкой пшеницы и овса посевного – при высокой частоте анеуплоидных клеток в каллусных культурах значителен и уровень формирования анеуплоидов среди регенерантов (до 30 %).

Для выявления у соматклонов изменений, проявляющихся в виде точковых мутаций, производят их скрещивание с исходными линиями и прослеживают расщепление в ряду поколений.

Показано, что значительная часть соматклональной изменчивости у мягкой пшеницы, томатов, риса обусловлена стабильными генетическими изменениями, описанными ниже.

- У соматклонов мягкой пшеницы и риса выявлены изменения по биохимическим и морфологическим признакам, находящиеся под моногенным (состав глиадинов, цвет зерновок) и полигенным (высота растений, сроки колошения, урожайность) генетическим контролем.

- Соматклоны могут иметь изменения по ряду признаков, которые в потомстве группируются независимо.

- мутации у соматклонов могут быть рецессивными, доминантными, кодоминантными.

- Мутации, обнаруженные у соматклонов мягкой пшеницы, могут затрагивать гены, локализованные во всех семи гомеологических группах хромосом мягкой пшеницы.

- У соматклонов томатов обнаружены новые генные мутации, ранее не индуцированные в результате химического или радиационного мутагенеза.

- Одиночные генные мутации у соматклонов могут проявляться с относительно высокой частотой: в среднем в одном растении на каждые 20–25 растений регенерантов.

Изменчивость митохондриального генома обнаружена у соматклонов разных растений. Наиболее хорошо это явление изучено у растений кукурузы, регенерировавших из каллусной ткани незре-

лых зародышей генотипов, имеющих Т-тип цитоплазмы (Техасский тип). Такие генотипы характеризовала мужская стерильность и высокая чувствительность к грибу *Helminthosporium maydis* расы Т и его токсину. Среди регенерантов были выделены растения, устойчивые к токсину *Helminthosporium maydis*. Признак устойчивости наследовался только по материнской линии. Анализ митохондриальной ДНК показал, что в структуре мт-ДНК соматоклонов произошли изменения, которые определяли их устойчивость к токсину гриба и которые не были выявлены у растений семенных поколений.

Примером изменчивости пластидного генома, вызванными его делециями, служат многочисленные данные по получению альбиносов среди соматоклонов пшеницы, риса, ячменя, сорго, кукурузы.

Амплификация – увеличение дозы гена, приводящее к возрастанию количества соответствующего фермента. Такое явление, в частности, описано в клетках суспензионной культуры люцерны. Была выделена клеточная линия, которую по сравнению с исходной характеризовала более высокая устойчивость к гербициду фосфинотрицину. Этот гербицид является конкурирующим ингибитором фермента глутаминсинтетазы. Оказалось, что устойчивые к гербициду клетки имели повышенный в 3–7 раз уровень данного фермента за счет 4–11-кратного увеличения дозы гена, кодирующего глутаминсинтетазу.

Таким образом, соматоклональную изменчивость можно рассматривать как один из источников увеличения генетического разнообразия растений.

Следует подчеркнуть, что соматоклональная изменчивость нежелательна при применении методов культивирования *in vitro* для клонального размножения растений (разд. 15) и в работах по трансформации (разд. 22).

Примеры практического использования соматоклонов в селекции. В основном это касается растений с вегетативным размножением: сахарного тростника и некоторых цветочных культур.

Так, в селекцию сахарного тростника соматоклоны впервые были включены в начале 70-х гг. на Гавайских о-вах. В качестве нового исходного материала были использованы соматоклоны, устойчивые к вирусам и ложной мучнистой росе.

В 80-е гг. аналогичные работы были проведены на Тайване. Селекционную ценность представили соматклоны сахарного тростника с разнообразием хозяйственно-ценных признаков, в том числе устойчивые к грибным болезням и с увеличенным содержанием сахара.

На о-ве Фиджи длительное время возделывался сорт сахарного тростника *Pindar*, недостатком которого была восприимчивость к ряду заболеваний. В результате культивирования изолированных тканей было получено 38 растений-регенерантов, среди которых было выделено четыре растения с комплексной устойчивостью к заболеваниям. Одно из этих растений превосходило исходный сорт и по устойчивости к болезням, и по урожайности. Эти признаки сохранялись в ряду поколений вегетативного потомства соматклона, который и стал источником нового сорта *Опо*.

Возможность получения соматклонов нашла широкое применение в цветоводстве для получения новых сортов, в том числе с измененной окраской цветков, например, у рододендрона. С использованием соматклональной изменчивости на основании сорта герани *Rober's Lemon Rose* получен новый сорт *Velvet Rose* с удвоенным числом хромосом ($2n = 114$), измененным содержанием эфирных масел, новыми признаками цветков и листьев.

На основе соматклональной изменчивости выделены генотипы кукурузы, томатов, перца, тыквенных, моркови, картофеля, устойчивые к грибным патогенам и использованные в селекции для создания новых сортов.

Раздел 13. КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ И МУТАГЕНЕЗ

Одной из проблем мутационной селекции у высших растений является образование химер, что связано с неодинаковой реакцией клеток многоклеточного организма на мутаген.

Полагают, что эта проблема может быть снята при экспериментировании с изолированными клетками или протопластами, если увеличивать их генетическую гетерогенность в результате обработки мутагенами. В случае же культивирования изолированных гаплоидных клеток, когда возрастает возможность выявления рецессивных мутаций, эта техника может стать весьма продуктивной.

При этом существует возможность получения большого числа растений из отдельных клеток, взятых из небольшого объема клеточной суспензии. Например, 100 мл быстро растущих в суспензии клеток табака содержит 10^7 клеток.

Для селекции клонов применяют предварительную обработку клеточной суспензии не только мутагенами, но и антиметаболитами, и увеличенными дозами солей.

В других случаях клеточную суспензию подвергают воздействию физических факторов: радиации, повышенной или пониженной температуры, определенной интенсивности света или определенному его качеству.

В результате таких воздействий в культивируемых системах могут возникнуть мутантные и соответственно устойчивые к использованным факторам клеточные линии.

Для отбора мутантных линий используют разные приемы отбора: прямую (позитивную) селекцию, непрямую (негативную) селекцию, тотальную и визуальную селекцию.

Метод прямой селекции. После мутагенной обработки клетки высевают на среды, содержащие определенные токсины. В этих условиях выживают только устойчивые к данному токсину клетки.

Может быть использована ступенчатая селекция, когда выделяемые мутантные клеточные клоны повторно культивируют на средах с более высокой концентрацией токсина.

Прямую селекцию применяют при получении линий, устойчивых к солям, гербицидам, антибиотикам и их аналогам, токсинам грибов, вызывающих болезни у растений.

Ниже приведена последовательность процедур с культурой клеток или протопластов при использовании прямого метода селекции.

- Изоляция клеток или выделение протопластов и обработка их мутагенами.
- Культивирование клеток в неселективных условиях в течение трех-пяти клеточных делений.
- Культивирование клеток на селективных средах и отбор клеточных вариантов.
- Культивирование колоний на регенерационных средах с возможной повторной селекцией клонов на устойчивость.
- Регенерация растений и их размножение.

- Тестирование растений на устойчивость к изучаемым факторам.
- Пересадка растений в грунт и последующая проверка на устойчивость семенного потомства растений.
- Изучение генетической природы устойчивости.

Метод непрямой селекции используют для отбора ауксотрофных и чувствительных к температуре мутантов у микроорганизмов, клеток животных и растений.

При таком отборе создаются условия, когда клетки дикого типа делятся, но погибают, а мутантные клетки теряют способность к делению, но не погибают.

Непрямую селекцию проводят с применением аналогов нуклеиновых оснований, в том числе с 5-бром-дезоксимурином. Это вещество – аналог тимидина, который в определенных условиях включается делящимися клетками в ДНК.

После применения 5-бромдезоксимурина клетки освещают флюоресцентным белым светом. В результате ДНК, в которой тимидиновые остатки замещены аналогом, фрагментируется и клетки погибают. Клетки, которые не делились и выжили, переносят на обогащенные среды, где они делятся. Затем проводится дополнительная проверка мутационных изменений у полученных клеточных линий.

При *тотальной селекции* на наличие мутационных изменений тестируют индивидуально все клеточные клоны.

Визуальная селекция основана на отборе среди всей популяции определенных клеточных линий визуально или с использованием биохимических методов.

Для сохранения мутантных клеточных линий их культивируют с периодической проверкой мутантных свойств в присутствии селективного агента. Однако длительное культивирование клеточных линий может привести к накоплению генетических изменений и потере способности к органогенезу. Для длительного хранения клеточных культур можно использовать метод криоконсервации в жидком азоте при $t = -196^{\circ}\text{C}$.

Устойчивость к аминокислотам и их аналогам. Получение мутантов, устойчивых к аминокислотам и их аналогам, проводят в целях получения растений-сверхпродуцентов по определенным

аминокислотам. Мутантные клеточные линии-сверхпродуценты отбирают в культуральных условиях при наличии в питательной среде аминокислот или их аналогов.

Биосинтез аминокислот у растений регулируется путем обратного ингибирования, когда конечный продукт – аминокислота – ингибирует ключевой фермент ее синтеза. Такие аминокислоты, как треонин, лизин, метионин, изолейцин, валин, аспарагин, лейцин имеют общий путь биосинтеза. При введении одной из этих аминокислот или их аналогов в питательную среду у нормально функционирующих клеток происходит ингибирование общего синтеза аминокислот. Для клеток-сверхпродуцентов определенная концентрация экзогенной аминокислоты не оказывается токсичной, и такие клетки выживают.

В этом случае механизмы, обуславливающие устойчивость, могут быть следующими:

- ослабление обратного контроля биосинтеза;
- уменьшение проникновения экзогенной аминокислоты в клетку.

Например, в результате отбора на устойчивость к лизину и треонину получены клеточные линии, а затем и растения-регенеранты кукурузы, у которых отмечено шестикратное повышение свободного треонина и двукратное – изолейцина. Устойчивость к лизину и треонину у этих растений наследовалась как ядерный доминантный и полудоминантный признаки. У риса в аналогичных экспериментах выделены мутанты с повышенным содержанием лизина и белка в семенах. Этот признак наследовался как доминантный.

Отбор сверхпродуцентов можно проводить не только на клеточном уровне, но и используя изолированные зародыши или проростки. Таким способом у ячменя были выделены мутанты, которые характеризовались повышенной в 2,5–6 раз продукцией свободного треонина. При добавлении в питательную среду аналогов аминокислот происходит их включение в состав белка. Такой белок с «ошибочной» аминокислотой приводит нормально функционирующую клетку к гибели.

Клетки, у которых в процессе метаболизма аналог аминокислоты разлагается в нетоксические соединения, или происходит нарушение включения аналога в белок, продолжают синтез аминокислоты.

Так, культивирование клеточных линий табака и моркови на средах, содержащих аналоги триптофана (5-метилтриптофан и 4-метил-триптофан), привело к отбору линий, устойчивых к этим веществам. Отобранные линии табака содержали свободного триптофана на 33 %, а линии моркови – на 27 % больше, чем контрольные.

У кукурузы путем ступенчатой селекции к 5-метилтриптофану получены устойчивые к этому веществу клеточные линии и регенерировавшие из них растения, для которых была характерна сверхпродукция триптофана. Устойчивость к аналогу триптофана и сверхпродукция аминокислоты передавалась семенному потомству растений как простой доминантный признак.

Большой интерес представляют растения, устойчивые к аналогам пролина и способные к накоплению этой аминокислоты. Это связано с тем, что у высших растений накопление свободного пролина обуславливает защитные механизмы (осморегуляцию, защиту клеточных мембран и ферментов) от стрессовых факторов (засоления, экстремальных температур, изменения водного режима).

В качестве токсичных аналогов пролина, добавляемых в культуральную среду, используют гидроксипролин и тиопролин. В результате селекции на таких средах получены клеточные клоны и регенеранты картофеля, устойчивые к этим аналогам. Растения имели повышенное содержание свободного пролина и характеризовались устойчивостью к низким температурам.

Биохимические мутанты – сверхпродуценты аминокислот используют для изучения метаболических путей аминокислот и регуляции их биосинтеза.

Устойчивость к гербицидам. К гербицидам относят разные классы веществ, которые могут влиять на функционирование хлоропластов, митохондрий, клеточных мембран, метаболизм нуклеиновых кислот и синтез белка, приводя к гибели растения. Некоторые гербициды действуют на растения избирательно. Так, 2,4-Д ингибирующее действие оказывает на двудольные растения.

Применение новых классов гербицидов в сельском хозяйстве вызвало необходимость изучать механизмы устойчивости растений к этим веществам и создавать сорта, устойчивые к гербицидам.

В настоящее время для этих целей более широко используют методы трансформации растений (разд. 22), однако клеточную селекцию рассматривают как альтернативный метод.

Так, в работах по клеточной селекции получены клеточные линии и регенерировавшие из них растения томатов, устойчивые к гербициду параквату. Показано, что эта устойчивость обусловлена доминантной ядерной мутацией.

Устойчивость к засолению изучают как на клеточных линиях, так и на растениях. Получены клеточные линии и растения-регенеранты табака, дурмана, риса, люцерны, устойчивые к засолению. Генетический анализ этих растений показал, что солеустойчивость – полигенный признак.

Устойчивость к металлам. Стрессовое состояние растений может быть вызвано ионами таких металлов, как цинк, кадмий, медь, ртуть, алюминий. Так, на растения, произрастающие на кислых почвах, токсическое действие оказывают ионы алюминия.

При низких pH эти ионы превращаются в соединение $Al(OH)_3$, которое не усваивается растениями. С помощью клеточной селекции получены устойчивые к ионам алюминия клеточные линии сорго, моркови. Показано, что устойчивость к этим ионам может контролироваться доминантным геном.

Селекция к патогенам. Патогенные грибы, бактерии, поражающие живые организмы, выделяют в клетки специфические токсины. Один из методов отбора устойчивых к заболеваниям растений основан на селекции клеточных линий и растений на фоне внесенного в питательную среду токсина, выделяемого патогенными организмами. С использованием такого метода получены растения риса, устойчивые к грибу *Helminthosporium oryzae*, и кукурузы, устойчивые к *Helminthosporium maydis*.

Таким образом, клеточная селекция нашла применение для получения новых мутантов, используемых во многих случаях в качестве моделей при изучении генетической природы устойчивости к абиотическим и биотическим факторам среды.

Кроме того, методы клеточной селекции и мутагенеза разрабатывают в целях получения новых ценных генотипов сельскохозяйственных растений и растений-продуцентов биологически активных соединений.

Раздел 14. КУЛЬТУРА *in vitro* ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Растения являются продуцентами многих **биологически активных соединений** – веществ, способных оказывать влияние на биологические процессы в организме. К таким соединениям принадлежат сердечные гликозиды, горечи, сапонины, стерины, каротиноиды, полифенолы, алкалоиды, витамины, хиноны, а также вещества, обладающие специфическим ароматом, вкусом или окраской.

Биологически активные соединения принадлежат к продуктам вторичного обмена, которые иначе называют **вторичными продуктами биосинтеза, вторичными соединениями** или **вторичными метаболитами**. В настоящее время известно более 100 000 вторичных метаболитов, продуцируемых растениями. Многие из вторичных метаболитов, синтезируемых растениями, являются экономически важными продуктами и используются в фармакологической, косметической, пищевой промышленности.

Функция вторичных продуктов биосинтеза. Продукты вторичного обмена у целых растений выполняют определенную функцию. Например, алкалоиды – это соединения, содержащие азот, который сначала накапливается, а затем утилизируется растением.

У некоторых растений накопление алкалоидов происходит в семенах. При прорастании семян алкалоиды деградируют до более простых азотистых веществ, которые усваиваются проростками.

Производные фенола могут предохранять растения от ультрафиолетового облучения. Отсутствие иммунной системы у растений восполняется функцией вторичных метаболитов. Эти вещества выполняют биохимическую защиту растений от вирусных и грибковых инфекций (бетаины, тритерпены, сапонины, фитоалексины), бактериальных инфекций (стероидные гликозиды), насекомых (глюкозинолиты, экдистероиды), травоядных животных (гликозиды, алкалоиды). Например, стероидный сапонин агинозид, синтезируемый в цветках лука-порей, вызывает задержку в развитии личинок луковой моли, паразитирующей на этом растении.

Кроме того, вторичные метаболиты обеспечивают защиту одних видов растений от других. В этом случае имеет место явление

аллелопатии, когда химические соединения, выделяемые растениями одного вида, угнетают развитие растений другого вида.

Так, выраженная аллелопатическая активность характерна сапонином, что позволяет их использовать в качестве гербицидов, подавляющих прорастание семян сорных растений.

Особенности синтеза и накопления вторичных продуктов биосинтеза. В целом в растении биосинтез продуктов вторичного обмена и их накопление ограничены специализированными клетками и тканями.

Продукты синтеза могут накапливаться в тех же клетках, где и продуцируются. Например, у свеклы алкалоиды и синтезируются, и накапливаются в корне и стебле. В корневище североамериканского папоротника *Polypodium glycyrrhiza* синтезируется и накапливается стероидный гликозид полиподозид А, имеющий сладкий вкус.

В других случаях места биосинтеза продукта не совпадают с их накоплением. Так, у красавки, дурмана, табака синтез алкалоидов происходит в корнях, затем транспортируется по ксилеме в надземную часть растения и накапливается в эпидермисе листьев и стебля.

Алкалоиды барбариса синтезируются в корневище, накапливаются в корневище и стебле. Место синтеза кофеина у кофе – зеленые части растения, накопления – листья и плоды. У люпина алкалоиды синтезируются в хлоропластах клеток мезофилла листьев, а затем по флоэме транспортируются в эпидермис.

Эпидермис – место накопления алкалоидов у многих растений (колхицина у безвременника, стероидных алкалоидов у пасленовых, морфинов у маковых и т. д.). В железистых волосках многих видов растений накапливаются масла. Кроме того, масла, терпены, флавоноиды, воск накапливаются в кутикуле стебля.

Некоторые растения являются продуцентами большого числа ценных для фармакологии веществ. Например, барвинок *Vinca rosea* продуцирует свыше 60 алкалоидов, четыре из которых обладают различным уровнем противоопухолевой активности. Синтез алкалоидов барвинка происходит в надземных органах и в клетках корня.

Известен и широкий спектр биологического действия стероидных гликозидов, используемых в различных областях медицины, косметической и пищевой промышленности.

Так, стероидные гликозиды, продуцируемые индийской юккой *Yucca shidigera* и «мыльным деревом» *Dracaena*, используют в качестве антигрибных и антидрожжевых компонентов в косметических средствах для защиты кожи, а также как консерванты, подавляющие развитие пищевых дрожжей и грибов.

Культивирование in vitro растений – продуцентов биологически активных соединений – широко используется как для фундаментальных исследований, так и для развития технологии получения ценных продуктов биосинтеза.

В условия культивирования *in vitro* возможно сохранение клетками способности к синтезу вторичных веществ, свойственных данному виду растения.

Более того, показано, что в условиях культивирования можно получать продукты вторичного обмена в количествах, равных или превышающих их получение из соответствующих растений – продуцентов этих веществ.

Например, содержание серпентина в клеточной массе лекарственного растения *Catharanthus roseus* может быть увеличено в 1 000 раз по сравнению с растением, биотина в культуре клеток лаванды – в 15, аймалина в клеточной массе раувольфии – в 10, а шиконина в культуре клеток воробейника в 10–30 раз.

Впервые культура ткани лекарственных растений была получена в 1945 г. Уайтом из корончатых галлов барвинка розового. В 1947 г. Телл и Готре установили, что каллусная культура белены черной является продуцентом алкалоидов.

Использование методов культивирования *in vitro* в ряде случаев позволило выявить локализацию места синтеза определенных биологически активных веществ у растений.

Так, было показано, что у красавки алкалоиды продуцируются только в культуре корневого происхождения, а местом синтеза никотина у табака являются кончики корней, особенно в период растяжения клеток.

Способность к синтезу никотина сохраняется в каллусной культуре корневого происхождения до тех пор, пока каллус способен к образованию корней. Каллусная ткань табака листового и семенного происхождения, если у нее проявляется способность к корнеобразованию, также способна к синтезу никотина.

Процессы биосинтеза при культивировании *in vitro* можно моделировать, меняя условия культивирования. Например, уровень синтезируемого никотина в каллусных культурах табака стеблевого происхождения можно изменять, регулируя концентрацию и соотношение фитогормонов в культуральной среде. Так, добавление к среде синтетического ауксина 2,4-Д подавляет, а природного ауксина – ИУК – активизирует синтез алкалоидов, в том числе и никотина.

При изоляции фрагментов тканей и клеток происходит нарушение коррелятивных связей между отдельными процессами в клетках, которые могут не восстановиться в условиях *in vitro*. В связи с этим наиболее продуктивно культивирование клеточной массы как биопродукента из таких тканей, которые являются одновременно и продуцентами, и накопителями продукта.

В случае, если у растения осуществляется перенос и накопление синтезированного продукта в других тканях, то в условиях культивирования может происходить его высвобождение из клеток в питательную среду и разрушение под действием ферментов, выделяемых клетками.

В условиях культивирования в процессе дедифференциации клеток (каллусообразования) может происходить изменение качественного состава вторичных продуктов биосинтеза. Так, в каллусной ткани барвинка розового было обнаружено появление 10 алкалоидов, не идентичных алкалоидам растения.

Вместе с тем в результате дедифференциации в условиях культивирования может утрачиваться способность к определенным синтезам. Например, у мяты перечной биосинтез эфирных масел связан с определенными специализированными структурами: волосками, каналцами, вместилищами, которые в условиях *in vitro* не дифференцируются. Однако в некоторых случаях удается скорректировать условия, способствующие дифференцировке специализированных клеток, связанных с синтезом эфирных масел. Так, у руты (*Ruta graveolens*) при определенном освещении в процессе культивирования этот процесс воспроизводился.

Методы повышения эффективности культивирования растений-биопродукентов биологически активных соединений. В целях получения клеточных штаммов с генетически детерминиро-

ванной способностью к сверхсинтезу определенных веществ используют следующие подходы:

- выбор генотипа растения и соответствующих тканей и органов, обладающих наибольшей способностью к синтезу и накоплению необходимого продукта;
- использование генетической изменчивости клеточных культур для отбора наиболее продуктивных штаммов;
- регуляция синтеза вторичных метаболитов за счет изменения состава фитогормонов в культуральной среде;
- разработка методов генной инженерии для увеличения продукции биологически активных веществ у растений, в том числе в условиях культивирования;
- использование клеточной селекции в сочетании с мутагенезом.

Разрабатывают еще один подход для эффективного использования культуры клеток в качестве биопродукторов вторичных метаболитов – **биотрансформация**.

Метод биотрансформации основан на способности растительных клеток превращать вводимые в культуральную среду соединения в определенные продукты. Так, L-фенилаланин и L-тирозин, добавленные в состав среды для культивирования клеток *Coleus blumei*, трансформируются в розмариновую кислоту. В клеточной культуре дурмана резко увеличивается содержание алкалоидов при введении в среду аминокислот, которые являются предшественниками биосинтеза алкалоидов. При добавлении в среду суспензионной культуры клеток *Dioscorea deltoidea* мевалоновой кислоты или холестерина наблюдается значительное увеличение выхода диосгенина.

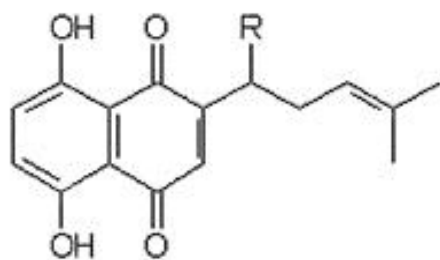
С длительностью культивирования способность клеток к биосинтезам утрачивается. Однако при поддержании клеточных культур пассированием на свежие среды возможно сохранение их биосинтетического потенциала в течение длительного периода. С этой целью необходимо учитывать фазы ростового цикла, в течение которых происходит синтез и накопление продукта, не допуская его деградации.

Один из **примеров промышленного производства вторичных метаболитов** с использованием клеточных культур – производство шиконина из воробейника краснокорневого *Lithospermum*

erthrorhizon. Это многолетнее растение встречается в Приморском и Хабаровском крае, на Сахалине, в Китае, Японии, Корее. Подземная часть растения содержит ряд биологически активных веществ, в том числе шиконин и его различные производные, являющиеся природными антисептиками широкого спектра действия и оказывающими противовоспалительное, регенерирующее действие, повышающие иммунный барьер кожи, обладающие антиоксидантными и УФ-защитными свойствами.

Шиконин, получаемый из культуры клеток, применяют для лечения ожогов, ран, обморожений. Темно-пурпурный натуральный пигмент шиконина используется для изготовления «биологической губной помады» и другой косметики.

Впервые промышленное производство шиконина с использованием клеточных культур было налажено в Японии, а в настоящее время и в России, на Дальнем востоке.



Шиконин

Кроме того, в промышленном производстве нашли применение клеточные культуры природных продуцентов: табака – источника убихинона 10, применяемого в качестве витамина; барбариса – продуцента ятморризина (спазмолитическое лекарственное средство); *Coleus blumei* – продуцента розмариновой кислоты (жаропонижающее средство). В косметической и парфюмерной промышленности при производстве кремов и мыла используют продукты вторичного биосинтеза клеточных культур женьшеня.

Раздел 15. МЕТОДЫ *in vitro* ДЛЯ ОЗДОРОВЛЕНИЯ И РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ

15.1. Методы оздоровления растений

Культурные растения, особенно размножающиеся вегетативно, постоянно подвержены инфекциям, которые вызываются вирусами и патогенными микроорганизмами. Заболевание растений приводит к уменьшению урожайности и снижению его качества. Установлено, что у растений, свободных от патогенов, урожайность может быть увеличена в три раза.

Один из широко применяемых методов оздоровления растений – это клональное микроразмножение с использованием *культуры апикальных меристем*.

Использование этого метода позволяет проводить их массовое клонирование с получением оздоровленных растений.

Этот метод получил развитие с 1948 г., когда впервые удалось освободить от вирусов растения георгина путем их размножения отрезками побегов, вычлененных из инфицированных растений.

Оказалось, что во многих случаях меристематические ткани растений не содержат вирусов. Как правило, в инфицированном растении содержание вирусов снижается по направлению от базальной части к верхушке, а апикальная меристема растения может быть полностью свободна от вирусной инфекции. Это связывают со следующими причинами:

- вирусы в растении распространяются по сосудистой системе, которая не развита в меристеме;
- репликация вирусов ингибируется эндогенными, метаболически активными веществами ауксиновой природы, которые синтезируются в меристеме – в зонах делящихся клеток.

В 1952 г. Морель и Мартин предложили проводить оздоровление растений, выращивая их из культивируемых *in vitro* меристем. Для этой цели вычленили апикальные части меристем георгина размером около 100 мкм и культивировали их на питательной среде. В результате были выращены свободные от вирусов проростки. Так как сами проростки не укоренялись, их прививали на здоровые укорененные растения.

Собственно *апикальная меристема* – это конус активно делящихся клеток высотой около 0,1 мм и шириной – 0,25 мм.

Экспланты такого размера трудно вычленивать без повреждения и из них не всегда удается индуцировать регенерацию проростков. В связи с этим при массовом размножении допускается использование более крупных эксплантов – до 1 мм высоты (рис. 15). В этом случае сохраняется не только собственно апикальная меристема, но и несколько листовых примордий (зачатков листьев), которые в процессе культивирования становятся источником синтеза фитогормонов.

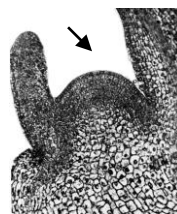


Рис. 15. Продольный срез верхушки стебля картофеля. Стрелкой указана апикальная меристема

На рис. 16 представлена последовательность процедур при культивировании апикальных меристем, в том числе выделенных из спящих почек, для получения оздоровленных растений.

В качестве исходного материала для вычленения меристем используют молодые проростки или молодые побеги. Перед вычлениванием их стерилизуют дезинфицирующими веществами. Эксплантацию апикальных меристем проводят с использованием микроскопа при увеличении в 20–40 раз.

Экспланты высаживают или на агаризованную среду, или на фильтровальные мостики, помещенные на жидкую среду. Для индукции меристем к регенерации проростков в среду добавляют цитокинины, в том числе в сочетании с ауксинами. Для некоторых генотипов используют гибберелловую кислоту.

Выращенные из апикальных меристем одиночные проростки тестируют на присутствие вирусов. Свободные от вирусов проростки продолжают размножать в культуральных условиях, индуцируя развитие многочисленных боковых побегов за счет активации *пазушных почек*, которые формируются в пазухах листьев.

При добавлении в питательную среду цитокининов, подавляющих апикальное доминирование, из пазушных почек проростков развиваются побеги. Эти побеги изолируют и укореняют в условиях *in vitro*, а затем пересаживают в грунт, где продолжают их размно-

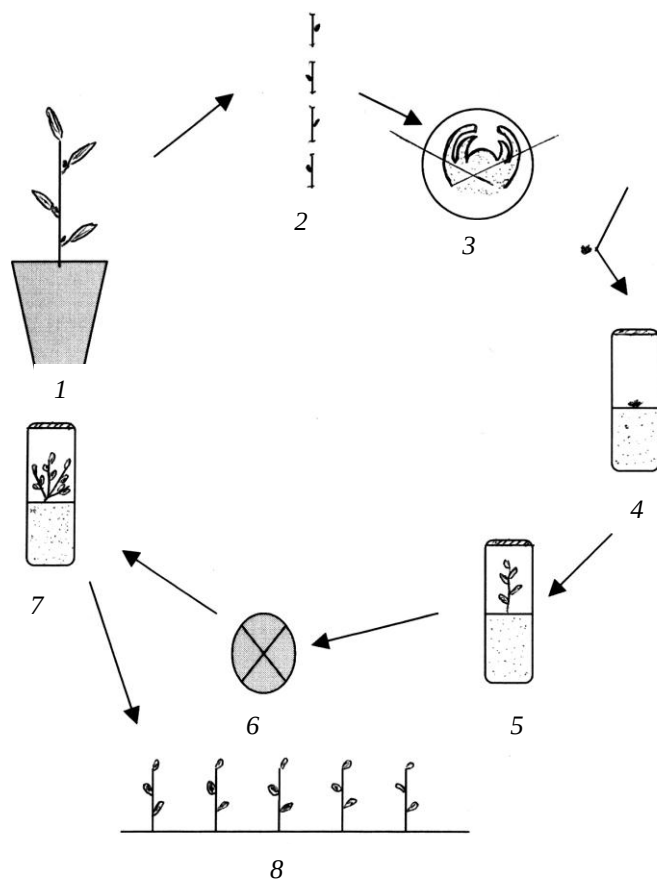


Рис. 16. Последовательность получения растений, свободных от вирусов через культуру апикальных меристем: 1 – инфицированное вирусом растение, 2 – сегменты стебля; 3 – вычленение апикальной меристемы из пазушной почки; 4 – культивирование апикальной меристемы; 5 – растение, развившееся из апикальной меристемы; 6 – тестирование растений на присутствие вирусов, 7 – размножение в культуральных условиях растения, свободного от вирусов; 8 – размножение свободных от вирусов растений в теплице

жение доступными способами (клубнями, луковицами, черенками). Как правило, растения инфицированы разными вирусами. Некоторые вирусы инактивируются при прогревании растений. Другие вирусы можно инактивировать при действии веществами, ингибирующими их репликацию. В связи с этим для повышения эффективности метода оздоровления растений *культивирование in vitro сочетают с термо- и химиотерапией*.

Термообработку растений проводят до вычленения апикальных меристем, используя горячую воду или горячий воздух при температуре 35–40 °С.

Продолжительность обработки — от нескольких минут до нескольких недель. Например, для удаления вирусов у гвоздики необходима термообработка при 38 °С в течение 2 мес.

Многие вирусы растений термостабильны. Так, у картофеля только вирус, вызывающий скручивание листьев, инактивируется при тепловой обработке. Для инактивации вирусов, вызывающих проявление обыкновенной, морщинистой и полосатой мозаики, необходимо сочетать термообработку с культивированием апикальных меристем.

Так, у садовой земляники вирус, вызывающий ксантоз, также можно удалить только при сочетании этих двух методов.

Отмечено, что свободными от вирусов могут быть растения, регенерировавшие из каллусных культур. Полагают, что фитогормоны, добавляемые в питательные среды, оказывают ингибирующее действие на репликацию вирусов.

После размножения безвирусного материала в коммерческих целях используют только растения, прошедшие специальные тесты на отсутствие вирусов в течение 18 мес (период, в течение которого вирус может возвратиться к активности).

В качестве тестов используют видимые симптомы, характерные для действия определенных вирусов. С этой целью производят инокуляцию контрольных растений от проверяемых. Используют серологические и электронно-микроскопические анализы.

При крупномасштабном внедрении безвирусных сортов растений необходима их изоляция от зараженных растений и полная сортосмена безвирусным материалом.

Метод культуры апикальных меристем используют для получения растений, свободных не только от вирусов, но и от микоплазмы, бактерий и грибов.

Технология оздоровления растений в сочетании с их клональным микроразмножением при использовании культуры апикальных меристем разработана и применяется для многих растений. Это прежде всего относится к овощным культурам (картофель, спаржа, цветная капуста, чеснок), цветочным (гладиолус, георгин, гвоздика, антуриум, хризантема, нарцисс, ирис), плодовым и ягодным (яблоня, малина, крыжовник, садовая земляника).

15.2. Особенности культивирования *in vitro* при клональном микроразмножении

Фруктовые, декоративные, ягодные растения в основном являются гетерозиготными, поэтому при их размножении семенами генотип исходного растения утрачивается. Генетически идентичные растения могут быть получены при *клоне* размножении.

Клон – все потомство одного индивидуума, полученное в результате неполовой репродукции. В природных условиях клональное размножение осуществляется при апомиксисе или при вегетативном размножении (корневищами, клубнями, луковицами, видоизмененными побегами, черенками).

Использование клонального размножения необходимо для растений, которые продуцируют мало семян или являются бессемянными, а также для растений с длительным ювенильным периодом (периодом до цветения).

Далее приведены преимущества, которые дают методы культивирования *in vitro*:

- Возможность получения оздоровленного материала.
- Быстрое размножение уникальных генотипов, в том числе гибридов, мутантов.
- Получение большого числа растений от трудноразмножаемых в обычных условиях растений.
- Возможность выполнения работы в течение круглого года.
- Размножение сеянцев без вывода их из ювенильной фазы.
- Возможность создания «банка» ценных форм растений при длительном хранении пробирочных растений при пониженной температуре.

Коэффициент размножения растений при культивировании *in vitro*, как правило, высокий. Так, у садовой земляники при использовании метода культивирования апикальных меристем для клонального микроразмножения составляет миллион растений в год.

Для клонального размножения в условиях *in vitro* используют следующие методы:

- активацию развития побегов из пазушных меристем и спящих почек;
- индукцию образования адвентивных (добавочных) почек и развивающихся из них побегов в тканях экспланта без предварительного образования каллуса;
- индукцию соматического эмбриогенеза в клетках эксплантов;
- стимулирование образования адвентивных почек, а затем и растений в каллусной культуре;
- индукцию образования соматических эмбриоидов в каллусной и суспензионной культурах и выращивание растений из соматических эмбриоидов.

Принцип активации пазушных почек в культуре *in vitro* используют при размножении картофеля, вишни, сахарной свеклы, яблони, груши (рис. 17), садовой земляники, в том числе и при получении оздоровленных растений.

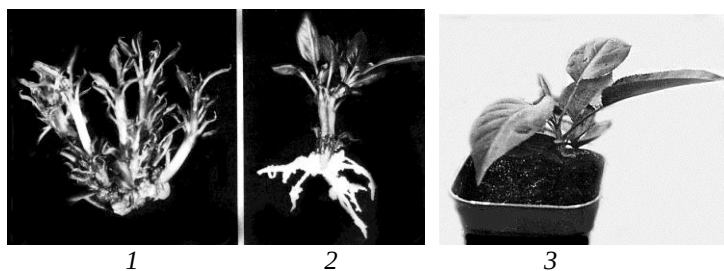


Рис. 17. Микроразмножение груши *Pyrus serotina*: 1 – кластер побегов, развившихся при культивировании пазушной почки, 2 – побег с развившимися корнями, 3 – сформировавшееся в условиях культивирования растение, высаженное в грунт. (Bhojwani et al., 1983)

Особенности развития множественных побегов из адвентивных стеблевых почек и эмбриоидов в культуре *in vitro* прямым путем и

через образование каллуса рассмотрены в первой части учебного пособия. Следует подчеркнуть, что для избежания образования соматклонов с изменчивостью при клонировании растений предпочтительнее использовать прямой путь регенерации *in vitro*.



Рис. 18. Развитие адвентивных луковичек в культуре луковичной чешуи лилии (Cohen, 1983)

Адвентивные почки, в отличие от пазушных, могут развиваться как из меристематических, так и немеристематических клеток. Возможность образования адвентивных почек из листьев и стеблевых отрезков в условиях культивирования используют для массового размножения капусты, хризантемы, томатов. У луковичных и амарилисовых, которые вегетативно размножаются луковичками, многочисленные *адвентивные луковички* в условиях культивирования индуцируют из листьев, цветоносов, отдельных частей луковиц (рис. 18).

Цитрусовые размножают с использованием культивирования пазушных почек и *нуцеллуса* (от лат. *орешек* – центральная часть семечки), в котором как *in vivo*, так и *in vitro* могут индуцироваться к развитию многочисленные соматические эмбриониды (разд. 11, рис. 11).

У растений семейства орхидных метод клонального размножения широко используют в коммерческих целях. Культивируемые орхидеи – сложные гибриды. Некоторые из них сочетают геномы трех – четырех разных родов. В обычных условиях вегетативное размножение этих растений осуществляется сложно, а в случае завязывания семян и их прорастания растение достигает цветения через 3–5 лет.

В 1960 г. Морель (Morel, 1960) предложил метод клонального микроразмножения орхидей в результате индукции в культивируемых тканях *протокормов*.

Протокорм (от греч. *protos* – первоначальный, *cormos* – побег) – первичный побег, который развивается при прорастании зародыша орхидных. В условиях культивирования *in vitro* многочисленные протокормы формируются у основания побегов, из субэпидер-

мальных клеток зачатков листьев, а также из клеток каллуса (рис.19).

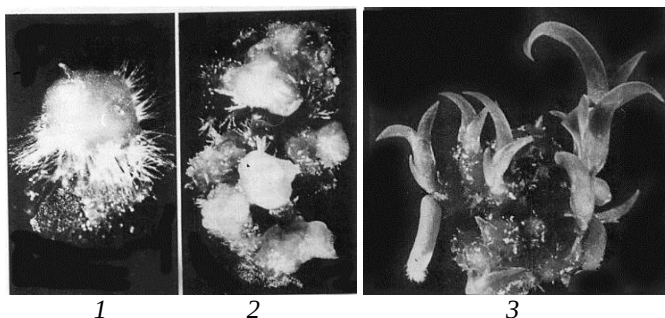


Рис. 19. Микроразмножение орхидных: 1 – протокорм с ризоидами; 2 – группа протокормов, развившаяся при культивировании верхушки побега; 3 – развитие проростков из протокормов в культуре in vitro (Margara, 1983)

Используя такой метод клонального микроразмножения в течение года удастся получить из одного экспланта более одного миллиона растений. Отработаны методы клонального микроразмножения для многих ценных культур, в том числе разных родов и видов пальм, которые практически не размножаются вегетативно. Пальмы во многих ареалах представляют такую же ценность, как во многих других ареалах – злаковые культуры. Так, один из разработанных и используемых методов клонального микроразмножения масличной пальмы *Elaeis guineensis* Jacq заключается в индукции соматических эмбрионидов в каллусных и суспензионных культурах листового происхождения.

Раздел 16. ПОЛУЧЕНИЕ АНДРОГЕННЫХ И ГИНОГЕННЫХ ГАПЛОИДОВ

16.1. Значение гаплоидов

Гаплоиды – это организмы, которые в соматических клетках содержат гаметическое число хромосом. Гаплоидные растения представляют интерес для генетики и селекции, так как каждый

ген у гаплоида представлен единственным аллелем и рецессивные аллели у таких растений проявляются наряду с доминантными. Фенотип гаплоидов полностью отражает их генотип, поэтому среди таких растений удобно отбирать формы с ценными мутациями.

При спонтанном или индуцированном удвоении числа хромосом у гаплоидов происходит восстановление их фертильности. Размножение таких растений приводит к получению гомозиготных линий. В случае практического использования гомозиготных линий значительно ускоряется селекционный процесс при создании новых сортов растений.

Уровень спонтанного возникновения гаплоидов очень низкий – примерно один гаплоид на 10^5 – 10^6 растений. Для повышения частоты образования гаплоидов используют разные приемы:

- Воздействуют на процессы опыления и оплодотворения радиационным облучением или химическими веществами.
- Опыляют растения чужеродной пылью, индуцирующей к развитию неоплодотворенную яйцеклетку.
- Выполняют отдаленные скрещивания с такими генотипами, когда обеспечивается двойное оплодотворение, но в процессе развития зародышей происходит **элиминация** хромосом опылителя, что приводит к развитию гаплоидного зародыша материнского генотипа (метод **гаплопродюсера** изложен в разд. 19).
- Проводят культивирование изолированных пыльников или изолированных незрелых пыльцевых зерен.
- Проводят культивирование неоплодотворенных завязей и семян.

16.2. Культура изолированных пыльников

Впервые гаплоидные растения в условиях *in vitro* получили индийские исследователи Гуха и Мгешвари при культивировании незрелых пыльников дурмана (Guha, Maheshwari, 1964).

В процессе культивирования пыльников в условиях *in vitro* имеет место **андрогенез** – развитие эмбриоидов, а затем и растений из мужских половых клеток – микроспор. Такие растения называют **андрогенными растениями**. В том случае, если такие растения содержат гаплоидный набор хромосом, их называют **андрогенными гаплоидами**.

Принцип андрогенеза *in vitro* заключается в том, что при помещении изолированных пыльников или изолированной пыльцы на питательную среду репродуктивные клетки могут делиться и давать эмбриониды, развивающиеся в растения. Такой **путь андрогенеза** называют **прямым**. На рис. 20 представлены эмбриониды, сформировавшиеся в результате культивирования пыльников ржи посевной и мягкой пшеницы.

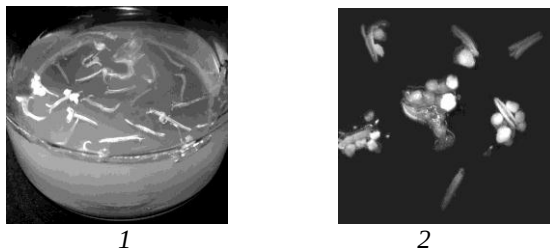


Рис. 20. Прямой путь развития андрогенных эмбрионидов из незрелых микроспор при культивировании изолированных пыльников ржи посевной (1) и пшенично-ржаной замещенной линии (2)

В тех же случаях, когда первоначально формируется каллус, а затем из каллуса – андрогенные эмбриониды, **путь андрогенеза** называют **непрямым**.

Прямой путь андрогенеза является предпочтительным, так как каллус может формироваться не только из микроспор, но и из соматических клеток пыльника. В последнем случае происходит развитие гетерозиготных растений.

Кроме того, каллусная ткань, образовавшаяся из микроспор, не всегда способна к эмбриогенезу и регенерации растений.

Одним из важных условий, определяющих поведение изолированных микроспор при культивировании, является **стадия развития микроспор**, когда пыльники или изолированную пыльцу необходимо вводить в культуру.

У зерновых и крестоцветных растений оптимальной для культивирования пыльников является стадия одноядерных микроспор. Для получения андрогенных растений у пасленовых используют пыльцевые зерна, прошедшие первый митоз после образования тетрады и сформировавшие вегетативное и генеративное ядра (рис. 21).

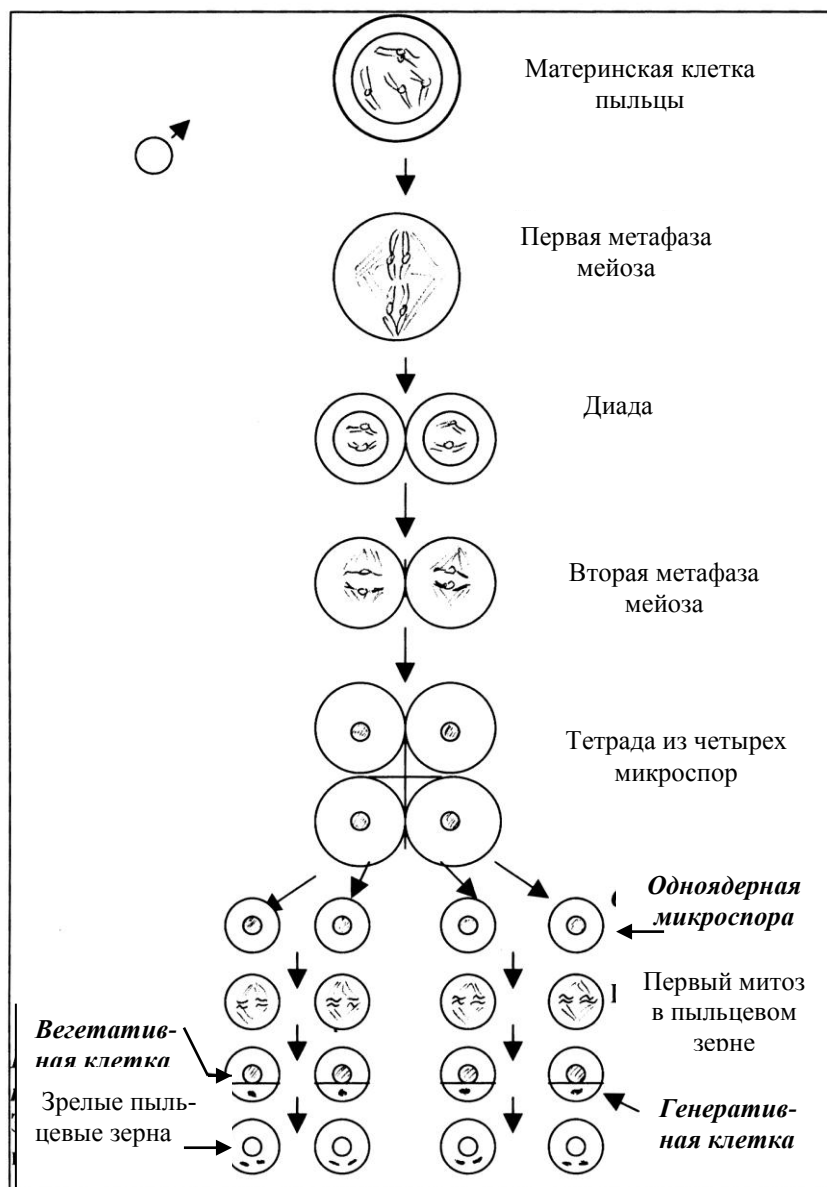


Рис. 21. Образование пыльцевых зерен у цветковых растений (Грин и др., 1990)

При помещении пыльников или пыльцевых зерен в соответствующей стадии развития на культуральную среду микроспоры претерпевают преобразования, которые могут происходить тремя путями (рис. 22).

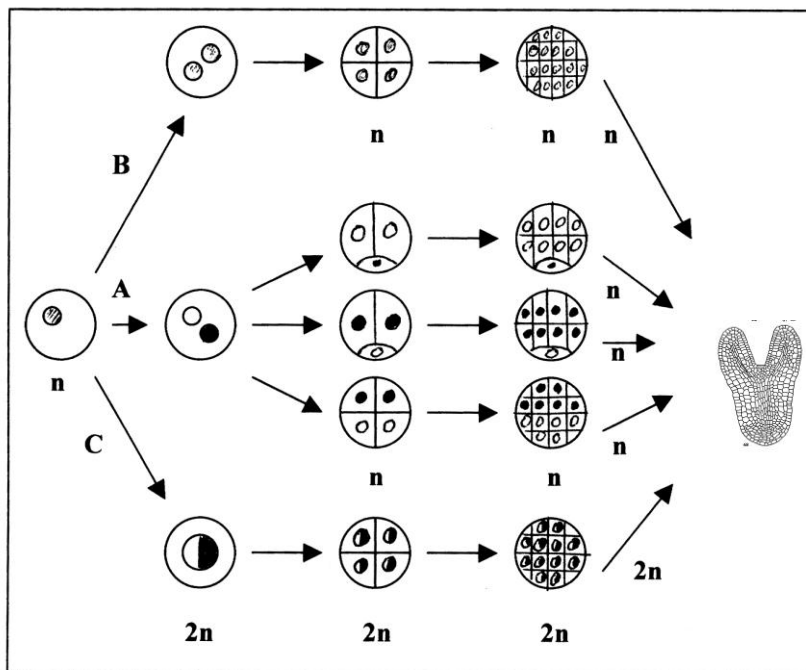


Рис. 22. Схема формирования андрогенных эмбриоидов (Новак, 1986)

Путь А. Ядро микроспоры делится с образованием вегетативного и генеративного ядер. В такой клетке может происходить одно из трех событий:

- 1) деление только вегетативного ядра;
- 2) деление только генеративного ядра;
- 3) деление и вегетативного, и генеративного ядер.

Во всех трех случаях из таких клеток развиваются эмбриоиды с гаплоидным числом хромосом.

Путь В. После деления микроспора содержит равноценные гаплоидные ядра. Последующее их деление и процесс эмбриогенеза

приводят к образованию гаплоидных эмбриоидов, из которых, как и в результате пути А, развиваются *гаплоидные проростки*.

Путь С. После деления ядра в микроспоре происходит слияние вегетативного и генеративного ядер, в результате чего образуется микроспора с диплоидным ядром. В процессе эмбриогенеза в результате пути С формируются диплоидные эмбриоиды, из которых затем развиваются *диплоидные андрогенные растения*. Такие растения, в отличие от гаплоидных, будут фертильными.

Кроме стадии развития микроспор, при культивировании пыльников необходимо учитывать и другие важные факторы: генотип растений-доноров, условия выращивания растений-доноров, возраст растения-донора, холодовая предобработка исходного материала, состав культуральной среды, условия культивирования помещенных на питательную среду пыльников.

Генотип растения. Роль генотипа исходного растения играет важную роль в работах по получению андрогенных растений. К началу 90-х гг. XX столетия андрогенные растения были получены примерно у 250 видов растений, в основном относящихся к семействам пасленовых, злаковых и сложноцветных. Вместе с тем и внутри видов и сортов отмечается полиморфизм растений по способности к андрогенезу.

Условия выращивания растений-доноров оптимизируют для каждого генотипа для высокой воспроизводимости экспериментов.

Так, для табака *Nicotianum tabacum* показана необходимость выращивания растений-доноров при 8-часовой продолжительности дня и определенной интенсивности освещения (11 тыс. люкс).

Пыльники культурного ячменя более отзывчивы к культивированию при выращивании растений при пониженной температуре (+ 12 °С) и высокой интенсивности света (20 тыс. люкс).

Возраст растения-донора. Изоляцию бутонов и колосьев с пыльниками лучше производить у растений в начале цветения.

Холодовая предобработка исходного материала. Холодовая предобработка пыльников перед их посадкой на питательную среду способствует разрушению матрикса, который включает пыльцевые клетки в пыльнике (рис. 23). В результате нарушаются коррелятивные связи между микроспорами и тканью пыльника, увеличивается проницаемость клеточных стенок микроспор.

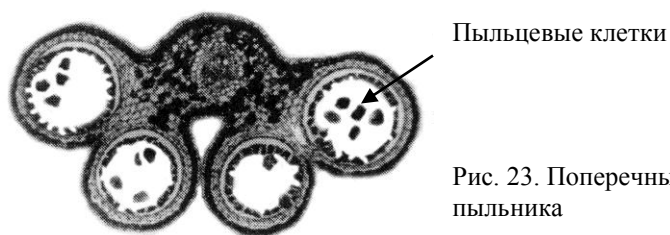


Рис. 23. Поперечный разрез
пыльника

Это приводит к тому, что микроспоры, помещенные на культуральную среду, перепрограммируются на индивидуальное развитие по пути эмбриогенеза.

Согласно методикам, до вычленения пыльников срезанные бутоны или колосья помещают в холодильную камеру. Для некоторых растений семейства пасленовых срезанные бутоны, закрытые изоляторами, содержат при $+3^{\circ}\text{C}$ в течение 48 ч; для мягкой пшеницы и ее гибридов эффективно содержание изолированных колосьев в течение 7–9 суток при $+3^{\circ}\text{C}$. В некоторых случаях холодной обработке подвергают уже вычлененные и помещенные на культуральную среду пыльники.

Культуральные среды. Для культивирования пыльников используют агаровые, жидкие или двухфазные среды. В последнем случае поверх агаровой среды помещают тонкий слой жидкой среды. В качестве исходных сред для культивирования пыльников часто используют специально разработанные по составу среды.

Например, для пыльников пасленовых (табак, дурман) – среду Нича, для злаков – среду N-6 или среду Potato II (P-II) с добавлением картофельного экстракта (Chuang et al., 1978).

При культивировании пыльников злаков показано применение высокой концентрации сахарозы или мальтозы, регулирующих осмотическое давление в среде и являющихся источником углерода и энергии. В качестве фитогормонов, стимулирующих развитие андрогенных эмбриоидов, необходимы ауксины. Так, для пшеницы и ее гибридов стимулирующее действие оказывает синтетический ауксин – 2,4-Д.

В состав широко применяемой культуральной среды среды РII входят следующие компоненты: KNO_3 (1 000 мг / л), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (100 мг / л), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (100 мг / л), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (125 мг / л),

KH_2PO_4 (200 мг / л), KCl (35 мг / л), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (27.8 мг / л), $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (37.3 мг / л), тимидин (1мг / л), сахароза (90 г / л), агар (7 г/л), 2,4-Д (0.74 мг / л) и 10 %-й картофельный экстракт как источник микроэлементов.

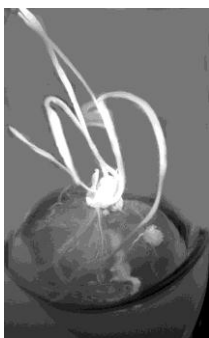
Картофельный экстракт готовят из свежих клубней. Для этого 200 г клубней нарезают на мелкие части, варят в 400 мл дистиллированной воды в течение 30 мин. Затем мацерат фильтруют, кипятят и смешивают с основными компонентами среды.

Условия культивирования. В зависимости от генотипов исходных растений культивирование проводят при $t = 25 \dots 30^\circ\text{C}$ в темноте или при определенных условиях освещения.

С появлением эмбриоидов культивирование продолжают при освещении и при температуре не выше 25°C . Для развития растений эмбриоиды пассируют на среды без фитогормонов или среды с низким содержанием цитокининов и ауксинов.

16.3. Гаметоклональная изменчивость

Как и в случае регенерантов, развившихся в культуре соматических клеток и тканей, андрогенные растения могут различаться между собой по фенотипу и генотипу.



Изменчивость, проявляющуюся у андрогенных растений, принято называть **гаметоклональной изменчивостью**.

Наиболее ярким проявлением гаметоклональной изменчивости является *альбинизм* (рис. 24).

Рис. 24. Дефектные по хлорофиллу проростки, развившиеся из андрогенных эмбриоидов в культуре изолированных пыльников мягкой пшеницы

Альбинизм – дефектность по хлорофиллу у андрогенных растений – может определяться делецией пластидной ДНК, захватывающей до 80 % генома. Другая причина развития альбиносов связана с мутациями ядерных генов. Такие растения нежизнеспособны, их развитие может поддерживаться только в условиях

культивирования на питательной среде. Альбинизм проявляется у андрогенных растений независимо от их пloidности. Частота развития растений-альбиносов зависит от генотипа растений-доноров и от условий культивирования. Так, на увеличение частоты альбиносов влияет высокая температура и длительное культивирование пыльников на инициальной среде, содержащей ауксины.

Основной показатель продуктивности андрогенеза – относительное число регенерировавших зеленых растений к 100 культивированным пыльникам. Например, у мягкой пшеницы в зависимости от генотипа этот показатель может варьировать от 0 до 60. Для практических целей метод культивирования пыльников считают эффективным, если получают не менее десяти жизнеспособных зеленых растений на 100 пыльников.

Среди андрогенных зеленых растений, достигающих стадии колошения, наряду с гаплоидами могут формироваться полиплоиды, дигаплоиды, анеуплоиды, миксоплоиды, растения со структурными перестройками хромосом.

Андрогенные полиплоидные и диплоидные растения могут быть гомозиготными и гетерозиготными. Гетерозиготные полиплоиды и диплоиды развиваются из микроспор, имеющих нередуцированное число хромосом. Образование гомозиготных диплоидных растений (дигаплоидов) при андрогенезе происходит из исходно гаплоидных микроспор:

- 1) после слияния вегетативных и генеративных ядер, как показано на рис. 22;
- 2) в результате эндомитоза в гаплоидных клетках микроспор;
- 3) в результате эндоредупликации, когда число хромосом удваивается у микроспор на ранних этапах культивирования.

Образование спонтанных дигаплоидов, которые характеризует восстановленная фертильность и жизнеспособность, может достигать более 50 % от числа регенерировавших зеленых растений. В таких случаях упрощается технология получения гомозиготных линий, так как нет необходимости обрабатывать андрогенные растения раствором колхицина для удвоения числа хромосом.

Развитие андрогенных растений с миксоплоидией и анеуплоидией обусловлено следующими причинами: цитогенетической изменчивостью в процессе эмбриогенеза и регенерации растений,

продолжительностью культивирования, наличием введенных в культивирование микроспор с измененным числом хромосом.

Цитогенетическая изменчивость может проявляться не только у андрогенных растений первого поколения, но и в последующих поколениях. Кроме того, у андрогенных растений наследуемая изменчивость может происходить по ряду признаков, контролируемых отдельными генами.

Разнообразие по гаметоклональной изменчивости у андрогенных растений, полученных у межсортовых и отдаленных гибридов, более выражено, чем у андрогенных растений, полученных у сортов или чистых линий. Это определяется тем, что микроспоры гибридов гетерозиготны и имеют разные комбинации генов. В связи с этим для увеличения генетического разнообразия при получении гомозиготных рекомбинантных линий, вовлекаемых в селекцию, в качестве растений-доноров используют гибридные растения.

16.4. Практическое использование метода культивирования пыльников

На основе получения гомозиготных линий в результате культивирования пыльников разработана технология ускоренного создания сортов сельскохозяйственных культур (рис. 25).

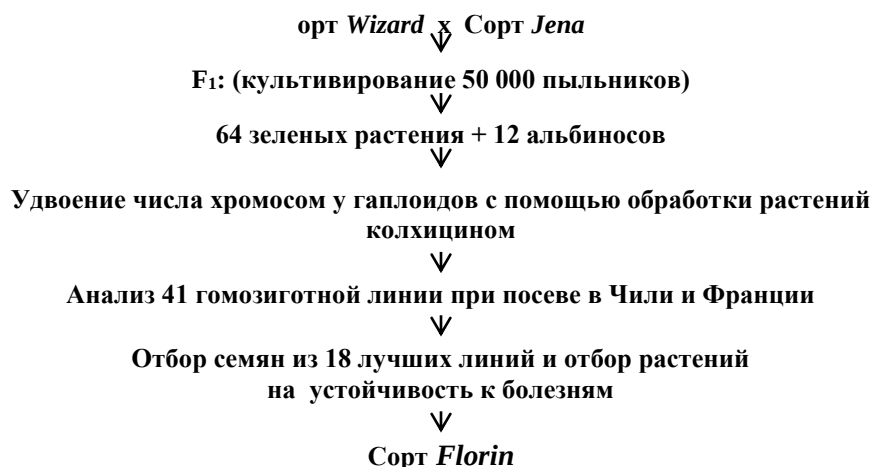


Рис. 25. Схема создания сорта озимой мягкой пшеницы *Florin*

Среди первых сортов мягкой пшеницы, полученных с помощью такой технологии, был сорт мягкой озимой мягкой пшеницы *Florin*. Этот сорт характеризует высокая урожайность и комплексная устойчивость к болезням. Сорт был создан за 7 лет. При традиционных методах создания сортов пшеницы требуется 12 лет.

При использовании данной технологии получены сорта и ценные для селекции линии яровой мягкой пшеницы, риса, табака, разных видов капусты, перца. Для получения спонтанных дигамплоидов у цветной и белокачанной капусты эффективен метод культивирования изолированных из пыльников одноядерных микроспор.

16.5. Получение гиногенных гаплоидов

Культивирование женского гаметофита или зародышевого мешка (рис. 26) для получения гаплоидных растений, развивающихся из неоплодотворенной яйцеклетки, гораздо сложнее и используется реже, чем культивирование пыльников. Этот метод может быть единственным для получения гаплоидов у растений с мужской стерильностью.

Так как выделение зародышевого мешка методически затруднено, обычно культивируют неопыленные завязи и семяпочки. Но в этом случае начало развивающемуся растению может дать не только яйцеклетка, но и другие клетки зародышевого мешка – синергиды, антиподы, а также окружающие зародышевый мешок клетки соматических тканей – нуцеллус, интегумент.

При этом клетки соматических тканей становятся источником диплоидных или полиплоидных растений-регенерантов.

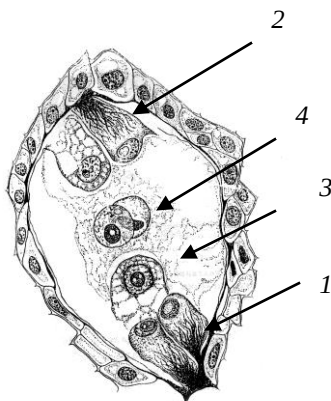


Рис. 26. Зародышевый мешок *Scilla sibirica* после оплодотворения: 1 – синергиды, 2 – антиподы, 3 – яйцеклетка, 4 – полярные ядра (Герасимова-Навашина, Батыгина, 1997)

Впервые гаплоидные растения из неопыленных завязей получены в 1976 г. китайскими исследователями у ячменя.

Гаплоидные растения, индуцированные из неоплодотворенных яйцеклеток, называют **гиногаплоидами**, а процесс их образования – **гиногенезом**. Гиногаплоиды получены у мягкой пшеницы, риса, табака, сахарной свеклы, кукурузы, подсолнечника, лилии, хлопчатника, картофеля. Гиногенез, как и андрогенез, может быть прямым по циклу: гаплоидная клетка – эмбриоид – растение; и непрямым, когда образованию эмбриоида предшествует формирование из яйцеклетки каллуса.

У гиногенных растений альбинизм выражен в меньшей степени, чем у андрогенных растений. В селекции использованы гиногенные гаплоиды подсолнечника и сахарной свеклы.

Раздел 17. КУЛЬТУРА *in vitro* ИЗОЛИРОВАННЫХ ЭНДОСПЕРМОВ

Примерно 85 % покрытосеменных растений, за исключением представителей семейств *Orchidaceae*, *Podostemaceae* и *Trapaceae*, формируют эндосперм. Эндосперм – это уникальная ткань, которая у покрытосеменных растений развивается в результате слияния в зародышевом мешке двух гаплоидных полярных ядер центральной клетки и гаплоидного спермия. В результате образуется триплоидная клетка, дающая начало триплоидному эндосперму.

Функция эндосперма – обеспечение питательными веществами развивающегося, а в некоторых случаях и прорастающего зародыша. У одних растений в эндосперме накапливается крахмал, у других – масла. В зрелых семенах эндосперм имеют почти все однодольные растения, за исключением некоторых водных и болотных растений. У таких двудольных растений, как бобовые, сложноцветные, тыквенные, крестоцветные эндосперм отсутствует, так как на ранней стадии развития поглощается развивающимся зародышем.

Эндосперм является интересной моделью для культивирования *in vitro*, так как представлен однородной паренхимной тканью, в которой отсутствуют дифференцированные элементы проводящей системы. Кроме того, регенирирующие при культивировании эндо-

сперма растения, как и исходная ткань, могут иметь триплоидное число хромосом.

Первая попытка культивирования тканей эндосперма из незрелых семян кукурузы была предпринята в 1933 г. (Lampe, Mills, 1933). В этом эксперименте наблюдали пролиферацию ткани эндосперма.

Успешное культивирование длительно растущей каллусной ткани незрелого эндосперма кукурузы было проведено в 1949 г. в Мичиганском университете (La Rue, 1949). Для культивирования была использована минеральная среда с разными добавками: томатным соком, дрожжевым экстрактом, виноградным соком. Максимальный рост обеспечивался при добавлении в среду томатного сока.

Позже разными авторами была получена культура незрелых эндоспермов лилии (начало культивирования через 9–10 дней после опыления), мягкой пшеницы и ячменя (культивирование через 8 дней после опыления), риса (культивирование через 4–7 дней после опыления).

У многих растений установлена критическая фаза для развивающегося после опыления эндосперма, когда его клетки способны к росту и делению в условиях культивирования *in vitro*. Это связано с тем, что в этих условиях клетки эндосперма, за исключением алейронового слоя, становятся мертвыми, выполняя только запасную функцию.

Однако у растений некоторых семейств (*Euphorbiaceae*, *Santalaceae*, *Loranthaceae*) при определенных условиях культивирования происходит пролиферация и зрелого эндосперма. В результате образуется каллусная ткань, в которой развиваются отдельные элементы трахеид. В культуре тканей эндосперма может быть сильно выражена цитогенетическая нестабильность: при делении клеток наблюдается образование мостов, фрагментов хромосом, несинхронное расхождение хромосом. Могут встречаться клетки, измененные по ploидности.

Вместе с тем можно подобрать условия к объекту культивирования, позволяющие поддерживать культивируемые клетки эндосперма на триплоидном уровне. Так, в опытах Норстога ткань эндосперма райграсса в течение десяти лет культивирования содер-

жала преимущественно триплоидные клетки (Norstog et al., 1969). Органогенез в культуре тканей эндосперма впервые был описан индийскими исследователями *B. M. Johri* и *S. S. Bhojwani* в 1965 г.

У экзocarпоса кипарисовидного в культуре зрелого эндосперма было индуцировано развитие стеблевых почек, а в культуре эндосперма *Scurrula pulverulenta* – стеблевых почек и побегов. Установлено, что стеблевые почки могут развиваться в результате прямого органогенеза – прямо из клеток эндосперма или в результате непрямого органогенеза – из клеток каллуса, образовавшегося из эндосперма.

Триплоидные растения в культуре эндоспермов были получены у цитрусов, яблони, сандалового дерева.

У триплоидных растений, как правило, сильно выражены нарушения в мейозе, и они не завязывают семян.

Однако получение триплоидов может иметь практическое значение в целях улучшения культивируемых сортов в тех случаях, если семена у растений не представляют коммерческого интереса и если, как у фруктовых деревьев, бессемянность является предпочтительной и есть возможность вегетативного размножения растений.

Например, известны коммерчески ценные триплоиды яблони, груши, банана, сахарной свеклы, чая, арбуза, шелковицы.

Традиционно триплоиды ($3n$) получают в результате скрещивания тетраплоидных растений ($4n$) с диплоидными ($2n$).

Культивирование эндоспермов рассматривают в качестве альтернативного метода получения триплоидных растений.

Раздел 18. КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАВЯЗЕЙ И СЕМЯПОЧЕК

18.1. Культура завязей

Культура изолированных завязей и вычлененных из них семязпочек применяется в качестве объектов исследования в эмбриологии. В контролируемых условиях воспроизводят процессы опыления и эмбриогенеза и на этих моделях изучают причины и условия клеточного деления в зародышевом мешке, последователь-

ность процессов формирования зародыша, эндосперма, семени и всего плода.

Культивирование **завязей** технически легко осуществляется и используется для изучения влияния частей цветка на развитие завязи в плод, влияния отдельных компонентов культуральной среды на эти процессы, для преодоления несовместимости при отдаленной гибридизации. (На рис. 27 представлено схематическое изображение цветка двудольного растения.)

Первые исследования в этом направлении провел Нич (Nitsch, 1949; 1951), культивировавший цветки томатов на фильтровальных мостиках, помещенных на жидкую питательную среду. Среда содержала минеральные соли, 5 % сахарозу, витамин В₁ (1 мг / л), цистеин (10 мг / л), ИУК (1 мг / л) и сок из зеленых или красных томатов. Опыленные на материнском растении цветки через несколько дней изолировали и после стерилизации помещали в культуральные условия.

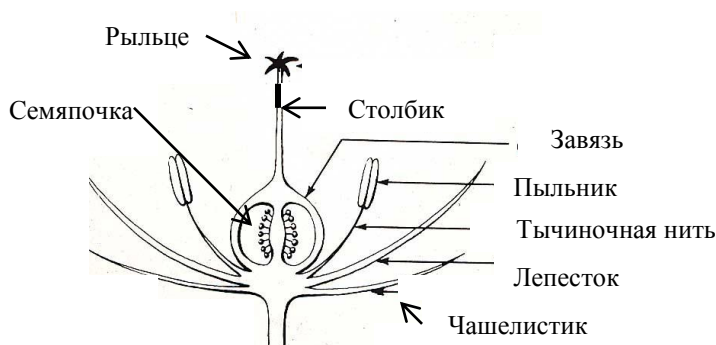


Рис. 27. Схематическое изображение цветка

Наблюдалось постепенное развитие и разрастание завязей с последующим формированием плодов. Через 35 дней с начала культивирования плоды краснели. Большая часть плодов содержала жизнеспособные семена. Из неопыленных цветков в тех же условиях на среде с 2,4-Д (0,1 мг / л) развивались партенокарпические плоды, т. е. плоды без семян.

Проведенные эксперименты по культивированию изолированных завязей растений, показали определяющую роль *околоцветника* в развитии плода и зародышей.

Так, при культивировании завязей двух видов пшеницы (*Triticum aestivum* и *T. spelta*) и культурного ячменя, содержащих после оплодотворения двух-трехклеточные проэмбрио, зародыши развивались только при наличии околоцветника (нижней и верхней цветковых чешуй). При удалении цветковых чешуй клетки зародыша растягиваются, но не делятся. У двудольных растений при удалении околоцветника (чашечки) у культивируемых завязей происходит нарушение развитие плода.

Для практических целей метод культивирования завязей применяют для преодоления несовместимости при межвидовой и межродовой гибридизации *Brassica*. Через 3–7 дней после чужеродных опылений завязи материнских растений изолируют и помещают на агаризованную культуральную среду. В качестве одного из вариантов сред может использоваться среда Мурасиге и Скуга (МС) с добавлением 500 мг / л гидролизата казеина. Через 3–4 недели культивирования гибридные зародыши вычлениют и переносят на среду МС или В-5 без регуляторов роста, где развиваются гибридные растения.

18.2. Культура семяпочек и методы опыления *in vitro*

Культивирование изолированных семяпочек используют для преодоления несовместимости у самонесовместимых видов и для преодоления прогамной несовместимости при отдаленных скрещиваниях путем совместного культивирования неоплодотворенных семяпочек и пыльцы.

Принцип культивирования семяпочек при опылении *in vitro* заключается в следующем:

- У растения из цветков удаляют собственные пыльники.
- Через один или два дня бутоны срезают и удаляют чашелистики и лепестки.
- Проводят стерилизацию бутонов дезинфицирующими растворами.
- Удаляют рыльце, столбик, стенку завязи и освобождают семяпочки вместе с плацентой (местом заложения и прикрепления семяпочек в завязи).
- Культивируют на среде или всю плаценту с семяпочками, или

фрагменты плаценты с отдельными семяпочками и производят опыление стерильной пыльцой.

Плацента является метаболически активной тканью, стимулирующей деление клеток зародыша и ядер эндосперма, что способствует нормальному развитию зародыша и эндосперма. Культуральные среды обогащают аминокислотами и витаминами. С использованием такого метода было произведено опыление и получение жизнеспособных семян при самоопылении у самонесовместимых видов семейства маковых, кукурузы; а также при опылении чужеродной пыльцой при отдаленной гибридизации маковых, пасленовых, гвоздичных.

В экспериментах этих авторов на изолированные из разных сортов *Nicotiana tabacum* наносили пыльцу дикорастущих видов. Из развивающихся на плаценте гибридных семян в одних вариантах в условиях культуры развивались гибридные проростки, в других из гибридных семян получали каллус, из которого на средах с разным соотношением цитокининов и ауксинов регенерировали растения, в том числе и спонтанно развившиеся амфиплоиды с удвоенным числом хромосом и восстановленной фертильностью. Из фертильных амфиплоидов были отобраны растения с комплексной устойчивостью к болезням.

18.3. Культура опыленных семяпочек

Первое сообщение об успешном культивировании семяпочек, помещенных в культуральные условия после опыления, было сделано индийским исследователем Магешвари и его сотрудниками в 1958 г. Через шесть дней после опыления выделяли семяпочки мака, содержащие зиготы или двухклеточные проэмбрио и несколько ядер эндосперма.

При наличии плаценты семена нормально развивались на среде, содержащей минеральные соли, витамины и 5 %-ю сахарозу. Однако в этих условиях до глобулярной стадии зародыши развивались медленнее, чем в условиях *in vivo*, но с достижением глобулярной стадии их развитие нормализовалось. При добавлении в среду кинетина начальная стадия развития ускорялась. Оптимизация среды для успешного культивирования изолирован-

ных семян после опыления показана и для других растений. Так, в работе В. А. Поддубной-Арнольди жизнеспособные зародыши орхидеи развивались при культивировании семян на плаценте с использованием раствора 10 %-й сахарозы. При культивировании семян клевера в питательную среду необходимо было добавлять кокосовое молоко или сок из молодых плодов огурца или арбуза, вычленившихся через десять дней после опыления.

Метод культуры опыленных семян нашел применение при получении межвидовых гибридов хлопчатника. При скрещивании двух видов хлопчатника *Gossypium arboreum* x *G. hirsutum* гибридные зародыши развиваются только в течение 8–10 дней после опыления, затем погибают. Культивирование изолированных 8–10-дневных гибридных зародышей хлопчатника затруднено, так как на этой стадии развития зародыши нуждаются в сложном составе питательной среды.

Для разрешения этой проблемы был разработан следующий метод, позволяющий получать гибридные растения. Производят опыление, через три дня семена, содержащие зиготу или трехклеточный проэмбрио, вычленивают и культивируют на среде Мурасиге и Скуга с добавлением 50 г / л инозитола. Через пять недель зародыши полностью дифференцируются, а через семь недель в 70–80 % семян развиваются гибридные проростки.

Кроме того, культура неоплодотворенных и оплодотворенных семян хлопчатника используется и как модель для изучения процессов образования волокна.

Раздел 19. КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ ЗАРОДЫШЕЙ

19.1. Особенности культивирования зародышей

Впервые возможность культивирования изолированных зрелых зародышей была продемонстрирована в 1904 г. Ханнигом (Hannig, 1904) на примере крестоцветных. Изоляцию и культивирование зародышей проводят на разных этапах их развития в зависимости от цели эксперимента. Различают две фазы развития зародышей.

1. **Гетеротрофная фаза** – в течение раннего развития зародыша, когда он зависим от эндосперма и окружающих материнских тканей.

2. **Автотрофная фаза** – в течение этого периода зародыш, если его поместить в культуральные условия, способен синтезировать вещества, необходимые для его развития, используя минеральные соли и сахарозу искусственной питательной среды.

В связи с этим культивирование зрелых зародышей не представляет методических трудностей при соблюдении асептических условий и использовании простых по составу питательных сред, содержащих минеральные соли и сахарозу.

При культивировании недифференцированных зародышей среду обогащают витаминами, аминокислотами, фитогормонами.

Основным составом питательных сред при культивировании изолированных зародышей служат модифицированные среды Мурасиге и Скуга, Уайта, Гамборга, Крузе. Наиболее подходящим энергетическим источником в этих средах является сахароза. Для культивирования проэмбрио концентрация сахарозы должна быть выше (до 8–12 %), чем при культивировании дифференцированных зародышей (2–3 %).

В качестве источника аминокислот используют гидролизат казеина (от 50 до 500 мг / л) или смесь аминокислот, что наиболее часто применяется для незрелых зародышей пасленовых, злаков и их гибридов.

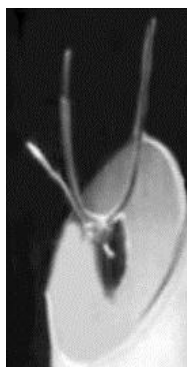
При культивировании незрелых зародышей в среду добавляют витамины группы В, аскорбиновую кислоту, биотин, инозитол.

Зрелые зародыши могут нормально прорасти на средах без гормонов, для культивирования незрелых зародышей необходимо добавление цитокининов и ауксинов.

В ряде случаев неразвитые зародыши, особенно гибридного происхождения, культивируют на средах с добавлением экстрактов незрелых эндоспермов – кокосового молока, эндосперма ячменя; диффузатов из молодых семян (например, люпина); сока плодов (томатов, облепихи).

При культивировании гибридных, слабо дифференцированных зародышей злаков, лотоса, клевера применяют метод предварительной трансплантации зародышей на молодые эндоспермы растений,

чаще материнских, которые вместе с зародышем помещают на агаризованную среду (рис. 28).



В этом случае обеспечиваются условия, более близкие к условиям *in vivo*, так как молодые эндоспермы содержат метаболически активные вещества, оказывающие активное действие на дифференцировку и прорастание трансплантированных на них зародышей.

Рис. 28. Гибридные проростки (*Hordeum vulgare* L. x *Triticum aestivum* L.), развивающиеся в результате культивирования изолированных зародышей на эндосперме-няньке культурного ячменя, помещенном на агаризованную среду Крузе.

Культивирование изолированных зародышей проводят при $t = 25-30^{\circ}\text{C}$. В некоторых случаях, например при прорастании зародышей злаков, свет оказывает ингибирующее действие.

19.2. Применение методов культивирования изолированных зародышей

Культивирование зародышей проводят с разными целями, в том числе:

- для изучения явления покоя семян и возможностей его преодоления;
- для выращивания растений из недоразвитых зародышей, вычлененных из щуплых, но представляющих ценность семян;
- как метод преодоления постгамной несовместимости при отдаленной гибридизации;
- для выращивания гаплоидных зародышей, развившихся при отдаленных скрещиваниях в результате элиминации хромосом одного из родителей.

Культивирование зародышей для преодоления покоя семян. Семена некоторых растений отличаются длительным периодом покоя. В одних случаях это связано с твердосемянностью, при которой причиной затрудненного прорастания является водоне-

проницаемость покровов семени. В других мясистые и сухие плоды, семенные покровы, эндосперм или семядоли содержат ингибиторы, задерживающие рост.

Так, покой семян и зародыша ясеня определяется влиянием семядолей, удаление которых снимает это состояние. У семян ириса длительный период покоя определяется эндоспермом. В обычных условиях эти семена не прорастают до 2–3 лет. В условиях культивирования через 15–20 дней после вычленения зародышей развиваются растения, которые через 3,5 мес пересаживают в грунт.

Для преодоления покоя семян плодовых, например черешни, персика культивирование изолированных зародышей проводят при пониженной температуре.

Проращивание зародышей из недоразвитых семян. Семена с рудиментарными и недоразвитыми зародышами встречаются у представителей 38 семейств покрытосеменных растений.

Кроме того, растения, интродуцированные в новые условия, могут давать шуплые и недозрелые семена с недоразвитыми зародышами. В этих случаях культивирование зародышей дает возможность вырастить растения из таких семян.

Проращивание изолированных зародышей, обработанных мутагенами. В некоторых случаях такой метод дает преимущество перед обработкой семян мутагенами. Это обусловлено тем, что клетки молодых зародышей характеризует высокая проницаемость веществ, а последующее культивирование зародышей ускоряет получение мутантных растений.

Культивирование гибридных зародышей. Отдаленная гибридизация лежит в основе современного направления исследований – *хромосомной инженерии* (разд. 20), задача которого заключается в реконструкции геномов при создании генотипического разнообразия растений. Получение межвидовых и межродовых гибридов связано с большими трудностями из-за несовместимости между растениями разных видов и родов. Несовместимость контролируется генами, функционирующими в период опыления, прорастания пыльцевых трубок, оплодотворения и эмбрионального развития.

Нарушения, которые проявляются после оплодотворения в процессе развития гибридных зародышей и гибридных эндоспер-

мов, являются результатом *постгамной (эмбриональной) несовместимости* и часто приводят к ранней гибели зародышей из-за нарушений в их развитии (рис. 29) или формированию семян с нежизнеспособными зародышами.

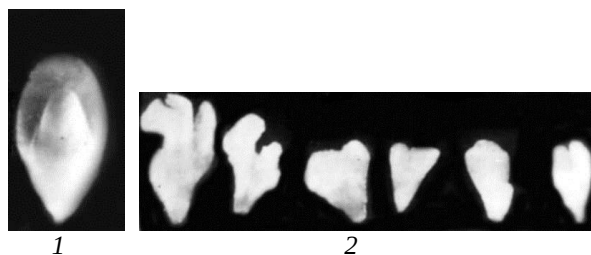


Рис. 29. Нормально развитый зародыш, вычлененный из зерновки, завязавшейся при самоопылении культурного ячменя (1), зародыши с нарушениями в развитии, сформировавшиеся в зерновках, завязавшихся при отдаленном скрещивании культурного ячменя с рожью посевной (2)

При рассмотрении методов культивирования изолированных семяпочек и завязей подчеркивалась возможность использования этих методов для преодоления чужеродной несовместимости при межвидовых и межродовых скрещиваниях. Однако эти методы не нашли такого широкого применения при отдаленной гибридизации как метод культуры изолированных зародышей.

Впервые успешное культивирование изолированных зародышей, завязавшихся при межвидовом скрещивании льна, было выполнено Лайбахом в 1925 г.

Как показывают цитозембриологические исследования, в процессе эмбриогенеза после чужеродных скрещиваний происходят нарушения и замедление темпов деления гибридных клеток в зародыше и эндосперме. Как правило, такие процессы более выражены при развитии триплоидного эндосперма, который, в свою очередь, в еще большей степени угнетает развитие зависимого от него зародыша. В результате наступает ранняя гибель гибридных зародышей или происходит формирование нежизнеспособных семян.

В связи с этим для получения гибридных растений необходимо своевременно изолировать от материнского растения гибридные зародыши и помещать их в культуральные условия *in vitro*.

Культивирование изолированных зародышей как метод преодоления постгамной несовместимости применяется при получении межвидовых, межродовых и межподтрибных гибридов у более 30 родов, в том числе многих цветочных и овощных культур, кормовых трав, зерновых злаков.

Культивирование гаплоидных зародышей. Выявлены комбинации межвидовых и межродовых скрещиваний, когда в результате опыления материнского растения чужеродной пылью происходит двойное оплодотворение, а затем в процессе эмбриогенеза в клетках развивающихся зародыша и эндосперма хромосомы одного родителя постепенно элиминируют.

Это приводит к формированию зародыша с гаплоидным набором хромосом. Генотип родителя, хромосомы которого элиминируют, называют *галлопродюсером*.

Как и в случае гибридных зародышей, для получения гаплоидных растений необходимо культивирование зародышей на искусственной питательной среде. На основе гибридизации с галлопродюсерами разработаны технологии получения гаплоидов у культурного ячменя (рис. 30), мягкой пшеницы, посевного овса.

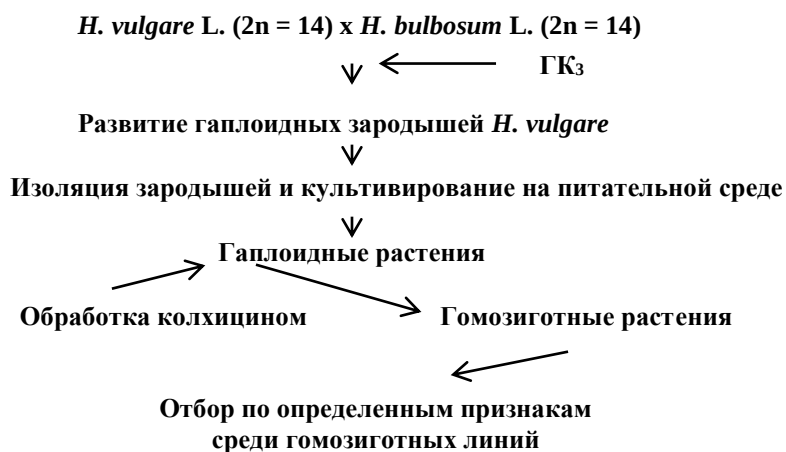


Рис. 30. Схема получения гаплоидных и гомозиготных линий культурного ячменя *H. vulgare* L. (2n = 14) на основе гибридизации с галлопродюсером – дикорастущим видом ячменя луковичного *H. bulbosum* L. (2n = 14)

Для селекционных целей при ускоренном создании генетического разнообразия гомозиготных линий в гибридизацию с луковичным ячменем вводят предварительно полученные межсортовые гибриды культурного ячменя.

Перед опылением у культурного ячменя удаляют пыльники, а после его опыления пылью луковичного ячменя колосья обрабатывают раствором гибберелловой кислоты (0.75 мг / л). Через 14–16 дней после опыления зародыши в асептических условиях культурального бокса извлекают из слабо развитых зерновок, неспособных к самостоятельному прорастанию, и помещают на питательную среду. К этому времени в результате элиминации хромосом луковичного ячменя из гибридных клеток развиваются гаплоидные ($n = 7$) зародыши культурного ячменя.

Для получения гаплоидов у мягкой пшеницы и овса посевного используют их гибридизацию с кукурузой, которая является гаплопродюсером по отношению к этим культурам. В этом случае опыленные колосья мягкой пшеницы или соответственно овса посевного обрабатывают раствором синтетического ауксина 2,4-Д (100 мг / л). Обработка опыленных цветков фитогормонами оптимизирует условия развития зародышей.

Раздел 20. ХРОМОСОМНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *in vitro*

Хромосомная инженерия – комплекс генетических методов, основанных на внутривидовой или отдаленной гибридизации и направлено используемых для интеграции в геном культурных растений близкородственных или чужеродных геномов отдельных хромосом, их фрагментов или отдельных генов.

В зависимости от методов, применяемых для решения задач хромосомной инженерии, можно выделить два основных направления.

Первое включает в себя создание анеуплоидных линий и их использование для межсортового и чужеродного замещения по индивидуальным хромосомам.

Второе направление основано на реконструкции геномов в результате отдаленной гибридизации в целях интрогрессии определенных признаков культурным растениям от их дикорастущих сородичей.

Термин «хромосомная инженерия» в начале семидесятых годов прошлого столетия ввел доктор *E. Sears* (1910–1991) из Университета Миссури, проводивший исследования в области отдаленной гибридизации и анеуплоидии мягкой пшеницы.

Сирс разработал основы моносомного анализа, включающего создание серий моносомных и нуллисомных линий у тетраплоидных и гексаплоидных видов культурных растений, а также использование этих линий для генетического анализа и получения новых форм растений с замещением отдельных хромосом.

По определению, моносомия – это отсутствие одной хромосомы из определенной пары, а нуллисомия – отсутствие пары хромосом.

В отличие от диплоидных растений (например, с геномной формулой: AA), аллотетраплоидные ($AABB$) и аллогексаплоидные ($AABBDD$) с отсутствием одной хромосомы или пары хромосом могут сохранять жизнеспособность и фертильность.

Необходимость использования анеуплоидных линий для генетического анализа определяется следующими причинами.

У культурных растений, имеющих гибридное происхождение, т. е. сложный геномный состав, использование общепринятого генетического анализа для локализации генов и изучения количественных признаков очень затруднено.

Вместе с тем получение и изучение всех возможных вариантов нуллисомных и моносомных линий у амфиполиплоидов позволяет идентифицировать генетически все хромосомы, установить гомеологичные группы, а каждую хромосому отнести к определенному геному.

Следующий этап таких исследований – оценка вклада каждой из хромосом в наследование различных признаков, локализация генов на хромосомах и их картирование по группам сцепления.

Сирс создал серию моносомных и нуллисомных линий, используя сорт гексаплоидной пшеницы *Chinese Spring*. Затем на основе этих линий серии моносомных и нуллисомных линий были получены и у других сортов пшеницы.

К настоящему времени только в странах Европы созданы серии анеуплоидных линий у более чем 40 сортов мягкой и твердой пшеницы. Эти сорта служат реципиентами при межсортовом и межродовом замещении хромосом и модифицируются по многим хозяйственно-ценным признакам.

Таким образом, биотехнологический аспект использования моносомных и нуллисомных линий – межсортовое и чужеродное замещение по любым хромосомам в реципиентном сорте от разных доноров, а именно, других сортов, а также видов или родов растений.

Такой же подход с использованием анеуплоидных линий применяют для генетических исследований и создания новых форм растений в результате замещения хромосом у табака, овса посевного, хлопчатника.

Второе направление хромосомной инженерии сформировалось на основе классических методов отдаленной гибридизации и комплекса современных методов экспериментальной биологии и геномного анализа.

Установлено, что более 50 % покритосеменных растений произошло в результате отдаленных скрещиваний. Только в семействе злаков выявлено около 800 естественных межвидовых и межродовых гибридов, имеющих сложные геномы, которые многократно модифицировались за счет отдаленных скрещиваний в процессе эволюции.

Таким образом, отдаленная гибридизация является естественным инструментом создания новых форм растений с реконструированными геномами.

Чем определяется необходимость вовлечения дикорастущих растений в процесс переноса и встраивания чужеродных геномов, хромосом или отдельных генов в геном культурных растений?

Селекция многих культур длительное время проводилась однонаправленно на проявление ограниченного числа признаков, например у злаков – на продуктивность и качество. В результате произошла потеря ценных по другим признакам генотипов и обеднение генофонда культурных растений. Особенно остро в настоящее время стоит проблема устойчивости культурных растений к биотическим и абиотическим факторам.

Что касается дикорастущих растений, то среди них в природных условиях поддерживается широкий полиморфизм по генам, контролирующим адаптивность и к биотическим, и к абиотическим стрессам.

Так, по данным доктора *G. Fedak* из Канады, среди 25 000 известных сортов пшеницы, в отличие от дикорастущих видов, нет ни одного сорта, который был бы источником генов, контролирующих устойчивость к вирусу желтой карликовости ячменя (*BYDV*), вирусу штриховатой мозаики пшеницы (*WSMV*) и *Cephalosporium stripe*. А из более 40 известных генов, контролирующих устойчивость к листовой ржавчине у пшеницы (*Lr*), 30 были интрогрессированы от дикорастущих сородичей.

Кроме того, многие дикорастущие виды растений являются источниками генов устойчивости к насекомым и нематоде.

Среди дикорастущих видов выявлено большое разнообразие растений, устойчивых к таким абиотическим факторам, как засоление, экстремальные температуры, гербициды, ионы алюминия. Растения ряда дикорастущих видов злаков и бобовых несут гены, контролирующие высокое содержание протеина в семенах.

Вместе с тем широкое вовлечение в гибридизацию дикорастущих видов с культурными ограничено сложностями получения гибридных растений и восстановления их фертильности.

Это связано с функционированием генетически обусловленных барьеров несовместимости, сложившихся в процессе эволюции и контролирующих изоляцию между растениями разных таксономических групп. При этом чем более отдалены виды между собой, тем сильнее проявляется несовместимость как при получении гибридных растений первого поколения, так и при восстановлении фертильности у гибридов первого поколения и их потомков.

Несовместимость, проявляемую при отдаленной гибридизации, делят на следующие типы:

- Прогамная несовместимость проявляется в процессе прорастания пыльцы и цыльцевых трубок.
- Сингамная несовместимость проявляется в период двойного оплодотворения.
- Эмбриональная или постгамная несовместимость проявляется в период развития зародыша и эндосперма.

- Постэмбриональная несовместимость может проявляться с начала прорастания семян, а также в период развития гибридных растений первого поколения, в том числе при восстановлении их фертильности.

Для преодоления прогамной несовместимости материнские растения или опыленные цветки обрабатывают биологически активными соединениями, например фитогормонами (гибберелловой кислотой или ауксинами). Другой способ – культивирование изолированных семяпочек и опыление в условиях *in vitro* (разд. 18). Эмбриональная несовместимость может быть преодолена при использовании методов культивирования изолированных семяпочек (разд. 18) или культивирования незрелых зародышей (разд. 19).

У многих гибридных комбинаций из-за низкой частоты развития жизнеспособных семян формируются единичные и стерильные гибридные растения. Число копий гибридных растений у двудольных можно значительно увеличить, используя метод клонального микроразмножения.

На данном этапе работы с гибридными растениями первого поколения может быть эффективным и другой метод культивирования *in vitro*: получение каллуса из меристематических тканей, а затем индукция из каллуса множественных растений-регенерантов.

Такой подход дает возможность решать следующие задачи:

1. Вегетативно размножать через культуру каллусов единичные и стерильные гибридные растения, получая большое число копий гибридного растения.

2. Индуцировать у регенерирующих растений соматоклональную изменчивость. В условиях культивирования у регенерантов под действием экзогенных фитогормонов увеличивается уровень цитогенетической и мутационной изменчивости, что у отдаленных гибридов приводит к дополнительной изменчивости геномов. Среди соматклонов, получаемых в результате культивирования тканей отдаленных гибридов, особый интерес представляют генотипы, у которых увеличивается образование гамет с нередуцированным (соматическим) числом хромосом, что обуславливает жизнеспособность гамет. Регенеранты, у которых формируются такие гаметы, способны к восстановлению фертильности или при самоопылении, или при беккроссировании (возвратном скрещивании с одной из родительских форм).

3. Процесс культивирования можно сочетать с обработкой регенерирующих растений колхицином, что необходимо для удвоения числа хромосом и получения амфиплоидов с восстановленной фертильностью.

4. В условиях культивирования *in vitro* возможно индуцировать среди растений отдаленных гибридов соматические гибриды, для которых характерна высокая частота конъюгации между чужеродными гомеологичными хромосомами, что увеличивает и частоту переноса и встраивания (интрогрессии) чужеродного генетического материала в геном культурных видов.

Раздел 21. КУЛЬТУРА ПРОТОПЛАСТОВ

21.1. Изоляция протопластов

Изолированный **протопласт** – это часть клетки, которая остается после удаления клеточной стенки. Протопласт имеет характерную сферическую форму, его поверхность защищена только плазмолеммой (рис. 31).

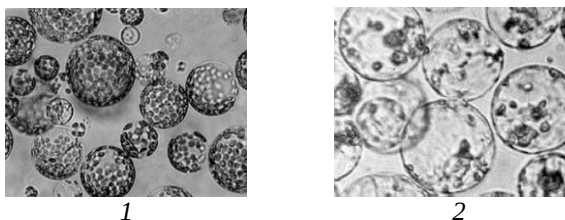


Рис. 31. Протопласты *Arabidopsis* (1) и табака *Nicotiana tabacum* (2)

Впервые изоляция протопластов была произведена механическим способом Дж. Клеркером в 1892 г. (Clerker, 1892). Высоко вакуолизированные клетки запасющих тканей корня редиса и свеклы, чешуй лука подвергались плазмолизу под действием смеси 1 М раствора сахарозы и 0,02 М раствора KCl. После этого ткань разрезали, освобождая протопласты. Этот метод трудоемкий и не дает большого выхода протопластов.

В 1960 г. английский исследователь Коккинг (Cocking, 1960) продемонстрировал возможность ферментативной изоляции боль-

шого числа протопластов. Коккинг выделял протопласты из кончиков корешков проростков томатов при растворении клеточных стенок целлюлазой – ферментом, полученным из плесневого гриба *Myrothecium verrucaria*.

Коммерческие препараты ферментов для разрушения клеточной стенки и изоляции протопластов начали использовать в Японии с 1968 г. Наиболее часто для выделения протопластов используют препараты целлюлаз и пектиназ, получаемых из культур различных грибов – *Myrothecium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* и др. и из пищеварительного сока улитки *Helix pomatia*.

В зависимости от происхождения растения и взятой для изоляции протопластов ткани подбирается вид ферментов, их комбинация и концентрация. Для выделения протопластов используют разные ткани растения, а также каллусные и суспензионные культуры. В целях получения большого числа однотипных протопластов у двудольных используют мезофилл молодых листьев.

Общий принцип изоляции и культивирования протопластов заключается в следующем.

Изолированные листья молодых растений стерилизуют в течение 1 мин в 70°-м спирте, а затем в течение 20 мин в 2 %-м растворе гипохлорита натрия.

После промывания листьев стерильной водой у них удаляют нижний эпидермис и нарезают на мелкие части. Нарезанные фрагменты листьев помещают в чашки Петри в смесь ферментов пектиназы и целлюлазы.

Например, для листьев табака используют смесь 0.5 %-й пектиназы + 2 %-й целлюлазы + 13 %-го сорбитола, pH = 5,4. Инкубируют фрагменты листьев в ферментной смеси в темноте или при рассеянном свете до 15–18 часов при $t = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

После этого следует очистка протопластов от эпидермиса и листовых жилок посредством фильтрации через капроновую ткань. Отмывание протопластов от ферментов производится при последующем трехкратном центрифугировании при 170 g в течение 2 мин.

Отмытые протопласты ресуспендируют в культуральной среде, содержащей 13 % маннитола, до концентрации $4 \cdot 10^5$ протопластов в 1 мл. Плотность протопластов должна быть оптимальной для

каждой культуры. Суспензию протопластов переносят в чашки Петри с жидкой или агаризованной средой. Культивирование проводят при $t = 26-28^{\circ}\text{C}$ в темноте или при рассеянном свете. Образовавшиеся клеточные колонии переносят на поверхность агаризованной среды и культивируют на свету.

Следует отметить, что в процессе получения протопластов могут наблюдаться нарушения целостности протопласта с образованием **цитопластов** – ограниченных мембраной участков цитоплазмы, или **субпротопластов** – изолированных протопластов, потерявших часть цитоплазмы, но сохранивших ядро.

21.2. Тотипотентность протопластов

Показано, что сразу, после того как отмыты ферменты, протопласты начинают регенерировать клеточную стенку. Отмечается появление целлюлозных микрофибрилл, постепенно организующихся в типичную клеточную оболочку. Через 2–4 дня протопласт может утратить сферическую форму и произойдет полное восстановление клеточной стенки. В зависимости от происхождения протопластов и культуральных условий может отмечаться отсутствие синтеза клеточной оболочки в течение нескольких недель или месяцев.

Одним из факторов культуральной среды, обуславливающим синтез клеточной стенки, является сахароза. В ее отсутствие синтеза клеточной стенки не происходит.

Протопласты, не регенерировавшие клеточную стенку, теряют способность к нормальному митотическому делению и образованию клеточных колоний. Такие протопласты или не приступают к делению, или в результате их деления формируются много-ядерные структуры, так как кариокинез не сопровождается цитокинезом.

Формирование клеточной стенки не всегда является условием, достаточным для перехода клетки к делению. В зависимости от объекта и условий культивирования к последующему делению может приступить от 0.1 до 80 % восстановивших клеточную стенку протопластов.

Первые деления могут происходить через 2–10 дней с начала культивирования протопластов. Образовавшиеся клеточные колонии могут стать источником растений-регенерантов.

Первое сообщение о регенерации растений в культуре протопластов мезофилла табака было опубликовано в 1971 г. японскими исследователями. Наиболее хорошо отработаны методы изоляции и культивирования протопластов у представителей семейства *Solanaceae* и отдельных видов *Brassica*.

Более трудными объектами для получения протопластов, способных к реализации тотипотентности, являются однодольные растения, в том числе злаки и хвойные. Вместе с тем отработаны воспроизводимые методы по получению и культивированию протопластов риса, используемых в работах по трансформации.

21.3. Требования к составу сред при культивировании протопластов

Для культивирования протопластов могут быть использованы модификации сред Мурасиге и Скуга или Гамборга (В-5) с добавлением комплекса витаминов и фитогормонов, включая абсцизовую кислоту. До того как протопласты синтезируют клеточную стенку, необходимо обеспечить в среде соответствующий уровень осмотического давления для поддержания стабильности протопластов. В качестве осмотиков используют сахара: глюкозу, маннитол, сорбит, ксилозу, сахарозу или их разные сочетания. После регенерации клеточной стенки и развития клеточных колоний осмотики из среды исключают.

Другой важный фактор успешного культивирования протопластов – плотность их посева, которая может составлять 10^4 – 10^5 протопластов на 1 мм среды.

11.4. Использование культуры протопластов

Отсутствие клеточной стенки у протопластов обуславливает им свойства, отличные от целых клеток. Благодаря тому что протопласты способны поглощать макромолекулы и органеллы, их используют в качестве реципиентов при трансформации в целых

получения трансгенных растений, а также в экспериментах по клеточной селекции и мутагенезу.

Высокий уровень протоклональной изменчивости среди растений, регенерировавших в культуре протопластов, способствует увеличению генетического разнообразия культурных растений. Так, в качестве исходного материала для селекции использованы протоклоны картофеля, которые характеризовала изменчивость по вкусовым качествам, форме и цвету клубней.

Изолированные протопласты служат источником для выделения неповрежденных и функционально активных субклеточных и цитоплазматических структур и органелл (хлоропластов, ядер, хромосом). Способность протопластов сливаться друг с другом нашла широкое применение для получения соматических гибридов.

Раздел 22. СОМАТИЧЕСКАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ

22.1. Основные понятия

Соматическая гибридизация основана на способности протопластов, выделенных из соматических клеток, сливаться между собой с образованием гибридных клеток, из которых могут развиваться *соматические гибриды*.

Таким образом, соматическая гибридизация – это гибридизация в обход полового скрещивания, когда в качестве родительских используют не половые, а соматические клетки.

Термин «соматические гибриды» предложен немецким исследователем Георгом Мельхерсом, получившим в 1978 г. соматические гибриды от слияния протопластов картофеля и томата.

Для обозначения соматических гибридов используют следующие формулы: $A + B$ или $A (x) B$. Как известно, для половых гибридов эта формула записывается как $A \times B$, где A и B – родительские генотипы.

Различия между половыми и соматическими гибридами состоят в следующем.

При половой гибридизации происходит слияние материнского и отцовского ядерных геномов при наличии только материнской цитоплазмы. При соматической гибридизации может происходить

слияние не только ядерных геномов родительских генотипов, но и цитоплазматических геномов материнского и отцовского генотипов.

Половые клетки имеют, как правило, гаплоидные числа хромосом. Соматические клетки, если они не изолированы у гаплоидных растений, имеют диплоидное число хромосом. В связи с этим в результате соматической гибридизации должны развиваться амфиплоиды с восстановленной фертильностью.

В соматическую гибридизацию можно вводить генотипы растений отдаленных таксономических групп, которые не скрещиваются половым путем.

Например, можно производить гибридизацию между разными семействами и даже царствами (клетки млекопитающих сливаются с клетками растений).

В результате соматической гибридизации можно быстро замещать цитоплазму одного вида растений на цитоплазму другого.

22.2. Методы слияния протопластов

Индукцированное слияние протопластов под действием гипотонического раствора нитрата натрия впервые наблюдал Э. Кюстер в 1909 г., когда механически выделял протопласты из тканей разных растений. В 70-е гг. были разработаны методы слияния протопластов с использованием растворов с высоким значением pH (9–11) и высокой концентрацией ионов Ca^{2+} (100–300 мМ) при предварительной агглютинации протопластов с помощью концентрированных растворов полиэтиленгликоля (ПЭГ – молекулярная масса 1 500–6 000). Последовательность процедур при слиянии протопластов по Као (Као, 1977):

- Смесь протопластов двух родительских генотипов наносят в виде отдельных капель суспензии на стеклянную поверхность и оставляют на 5–15 мин для осаждения.
- Готовят смесь из 1 г ПЭГ (молекулярная масса 1 540) и 2 мл раствора, содержащего 0,1 мМ глюкозы, 10,5 мМ CaCl_2 и 0,7 мМ KH_2PO_4 , при pH 5,5.
- Наносят смесь из расчета три капли раствора на одну каплю суспензии клеток.
- Через 10–15 мин. добавляют 0,5 мл раствора с высоким

значением $pH = 10$ и высоким (70 мМ) содержанием Ca^{2+} (в виде $CaCl_2$), процедуру повторяют через 15 мин.

- Через 15 мин протопласты отмывают с интервалами в 5 мин трижды осторожным отсасыванием раствора с добавлением питательной среды (общий объем среды для этой цели – 15–20 мл).

- Протопласты культивируют в тонком слое среды (около 0,5 мл).

Высокое значение pH и высокая концентрация ионов кальция необходимы для нейтрализации отрицательного поверхностного заряда, который имеют протопласты.

Таким образом, при наличии ПЭГ протопласты агглютинируют (слипаются). В местах слипания происходит разрыв плазмалеммы протопластов, приводящий к их слиянию (рис. 32). Эффективность слияния при таком методе достигает 10–50 %.

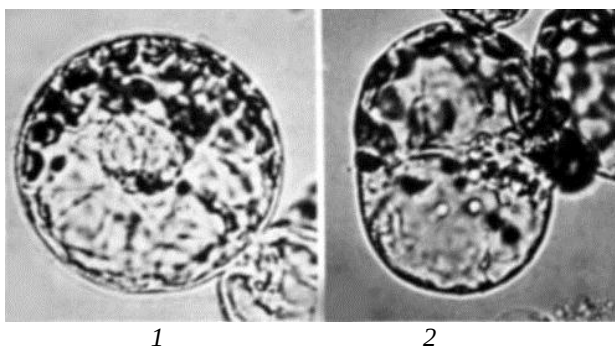


Рис. 32. Агглютинация протопластов табака под действием ПЭГ (1), начало слияния протопластов (2).

Метод агглютинации и слияния протопластов с помощью электрического поля. Суспензию с протопластами помещают в высоко неоднородное переменное поле, где протопласты агглютинируют и образуют цепь из нескольких протопластов между электродами.

Затем при наложении дополнительных единичных импульсов (от одного до трех) в местах слипания происходит разрыв плазмалеммы и слияние протопластов (рис. 33). При данном методе может сливаться до 9 % протопластов.

Эффективность метода слияния протопластов определяют по следующим параметрам:

- частоте слившихся протопластов;
- частоте клеточных клонов, образовавшихся из гибридных клеток;
- частоте образования гибридных проростков.

Следует подчеркнуть, что при низкой частоте слияния протопластов в электрическом поле частота развития жизнеспособных гибридных проростков может быть выше по сравнению с индуцированным слиянием с помощью химических веществ.

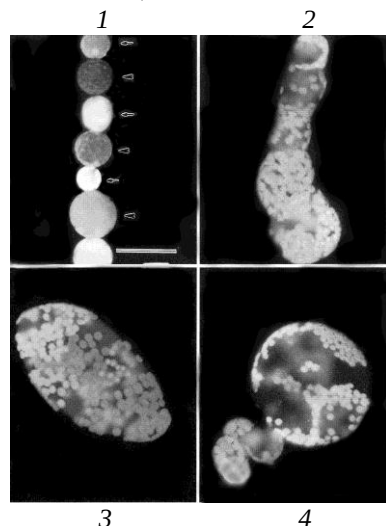


Рис. 33. Слияние протопластов табака с помощью электрического поля (1), образование цепочки из большого числа протопластов сразу после наложения импульса (2), продукты слияния протопластов примерно через час после наложения импульса (3, 4)

В результате слияния протопластов могут быть получены **гомокарионы** – продукты слияния генетически идентичных клеток, и **гетерокарионы** – продукты слияния генетически неидентичных клеток. В случае, если при последующих делениях гибридной клетки хромосомы одного из диплоидных генотипов элиминируются, но сохраняются органелльные геномы обоих родителей или альтернативного родителя, то развитие получит **цибрид** (рис. 34).

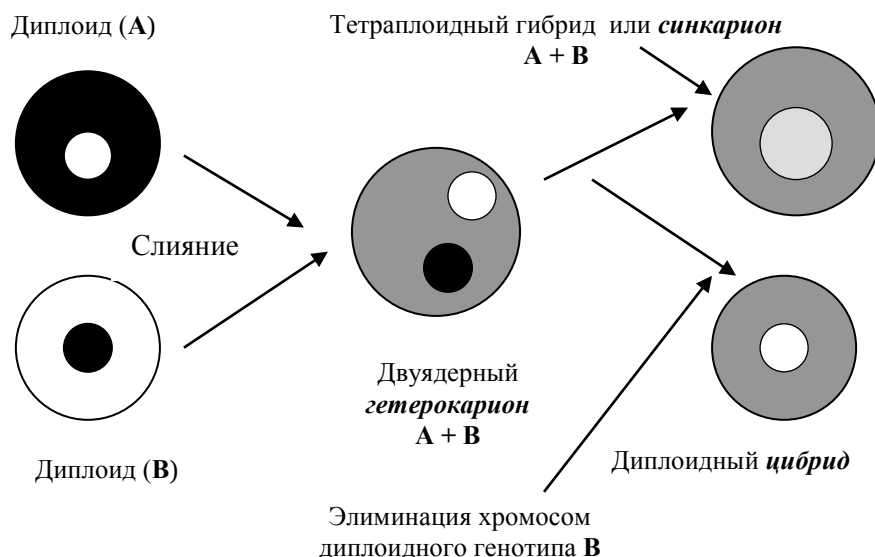


Рис. 34. Продукты слияния протопластов, выделенных из диплоидных соматических клеток.

Для целенаправленного получения цибридов, имеющих ядерный геном одного из родителей, а цитоплазматический геном альтернативного родителя, используют облучение χ - или γ - лучами протопластов одного из родителей перед их слиянием с протопластами другого родителя. Ядро облученных протопластов инактивируется, а в результате слияния протопластов произойдет только гибридизация цитоплазматических геномов.

22.3. Методы селекции продуктов слияния

После слияния протопластов производят отбор продуктов слияния от неслившихся протопластов. Для этого используют следующие методы.

Механическая изоляция гибридных продуктов включает в себя несколько приемов:

- 1) визуальную идентификацию продуктов слияния;

2) механический отбор гетерокарионов;

3) культивирование гибридных клеток.

Этот метод применим, если родительские клетки различаются морфологически.

Например, если протопласты одного родителя выделяют из богатых хлорофиллом клеток мезофилла, а другого – из бесхлорофильных каллусных клеток, то гибридные протопласты хорошо отличаются от родительских по содержанию хлорофилла. Протопласты, различающиеся визуально, можно получить и при их прижизненном окрашивании флуоресцентными красителями.

Метод генетической комплементации основан на использовании мутантных родительских генотипов, клетки которых погибают при определенных условиях культивирования, а гибридные клетки выживают. Такой эффект можно наблюдать при гибридизации между собой мутантных линий по хлорофиллдефектности, когда у гибридов восстанавливается фотосинтетическая способность.

22.4. Цитологические особенности продуктов слияния соматических клеток

Слияние может происходить как попарно, так и с участием разного числа протопластов. Многоядерные продукты слияния разрушаются. Слияние в смешанной популяции изолированных протопластов происходит случайно, поэтому с одинаковой частотой могут образовываться гомокарионы и гетерокарионы.

В течение первых часов после слияния цитоплазма двух клеток смешивается. После регенерации клеточной стенки, наличие которой необходимо для деления клетки, могут иметь место следующие события:

- синхронное деление двух ядер без их слияния, а в результате деления клетки – образование двуядерных дочерних клеток;

- слияние ядер во время митотического деления, при последующем делении клетки – формирование одноядерных гибридных дочерних клеток.

В зависимости от степени филогенетического родства родительских генотипов и ядерные, и цитоплазматические геномы соматических гибридных клеток могут быть стабильными и нестабиль-

ными. Это определяет последующую судьбу гетерокарионов. Так, при филогенетической отдаленности родительских генотипов в процессе последующего деления клеток может происходить элиминация хромосом одного из родителей.

В этом случае ядерные гены у соматических гибридов наследуются *однородительно*.

Например, для гибридной клеточной линии *Glycine max* + *Nicotiana glauca* (соя + табак) характерна элиминация хромосом табака. Через семь месяцев культивирования после слияния протопластов ядерный геном этой линии был представлен только хромосомами сои.

Кроме того, с первых клеточных делений у этой линии было обнаружено большое число нарушений в митозе, приводящих к образованию мостов, хромосомных фрагментов, кольцевых хромосом, нетипично длинных хромосом.

Цитогенетические особенности гибридных линий одного происхождения могут быть различными.

Например, на основе клеточных линий, выделенных при межподтрибной гибридизации *Arabidopsis thaliana* + *Brassica campestris* (арабидопсис + турнепс), были получены гибридные растения с разным уровнем элиминации хромосом турнепса.

Соматические гибриды, сохранившие оба родительских ядерных генома, были названы *симметрическими*. Гибриды, содержащие преимущественно хромосомы арабидопсиса, названы *асимметрическими* (*несимметрическими*).

Независимо от судьбы ядерного гибридного генома митохондриальный и пластидный геномы у соматических гибридов могут наследоваться как *двуродительно*, так и *однородительно*. При этом сегрегация (разделение) митохондриального генома может происходить независимо от сегрегации пластидного генома.

Это приводит к тому, что в цитоплазме соматического гибрида сохранится митохондриальный геном одного родителя, а пластидный геном – другого.

Кроме того, в цитоплазматических геномах имеют место процессы рекомбинации, приводящие к появлению рекомбинантных форм митохондриальной или пластидной ДНК.

Таким образом, при слиянии протопластов растений разных таксономических групп барьеры несовместимости, характерные для половой гибридизации, могут не проявиться, что и приводит к образованию гетерокарионов. Однако в процессе клеточных делений несовместимость проявляется, что ограничивает возможности получения жизнеспособных гибридных растений на основе межсемейственной, межтрибной и межподтрибной соматической гибридизации.

В результате слияния протопластов растений и клеток животных получены *межцарственные гетерокарионы*: (клетки человека + бобы), (клетки человека + табак). Деления таких гетерокарионов не происходит.

При *межсемейственной соматической гибридизации* (соя + табак), (китайский табак + лук), (табак + бобы) получены гетерокарионы, которые дали клеточные линии, не проявившие способности к регенерации растений.

Межтрибная соматическая гибридизация может привести к образованию клеточных линий, способных к регенерации растений.

Например, такие линии были получены при слиянии протопластов (арабидопсис + турнепс), (дурман + красавка), (красавка + китайский табак), (картофель + табак). Регенерировавшие растения характеризовались аномалиями в морфологии и развитии. По содержанию хромосом родителей часть из них была отнесена к симметричным, часть – к несимметричным.

Среди *межродовых соматических гибридов* получены как симметрические (*Citrus sinensis* + *Poncirus trifoliata*), (*Citrus sinensis* + *Severina disticha*), так и асимметрические гибриды (*Lolium* + *Festuca*), (картофель + томат), (томат + пепино). Соматические межродовые гибриды – стерильные.

22.5. Примеры практического использования соматических гибридов

Рассмотренные выше примеры получения новых форм растений демонстрируют возможности *клеточной инженерии растений*, т. е. комплекса методов генетического конструирования клеток и растений нового типа, включающего получение и культивиро-

вание протопластов *in vitro*, их гибридизацию и реконструкцию ядерных и оргanelльных геномов путем слияния протопластов, принадлежащих растениям таксономически отдаленных видов.

Как следует из приведенных выше данных, в процессе развития соматических гибридов имеет место реорганизация ядерных геномов, что может приводить к переносу генов от одного родителя другому.

Так, в результате слияния протопластов культурного вида картофеля *Solanum tuberosum* и дикорастущего вида томата *Lycopersicon pimpinellifolium* были получены растения, у которых в ядерный геном картофеля были интрогрессированы гены томата, контролирующие устойчивость растений к болезням.

Первые *межвидовые* фертильные амфиплоиды, полученные Шидером (Schider, 1978) путем слияния протопластов хлорофиллдефектного мутанта дурмана *Datura innoxia* с протопластами двух других видов дурмана – *D. discolor* и *D. stramonium*, являются примером получения гибридных форм, которые нельзя получить в результате полового скрещивания.

Соматические гибридные растения (*D. innoxia* + *D. discolor*) и (*D. innoxia* + *D. stramonium*) представляют интерес в селекции промышленных сортов дурмана, используемых для получения алкалоида скополамина, так как соматические гибриды этих комбинаций содержат алкалоидов на 20–25 % больше, чем родительские генотипы.

В результате соматической гибридизации получены фертильные амфиплоиды межвидовых гибридов табака, картофеля, баклажана, которые не удается получить при половой гибридизации. Так, в селекционный процесс для получения новых сортов табака были вовлечены соматические гибриды (*N. tabacum* + *N. nesophila*), (*N. tabacum* + *N. stocktonii*).

Интерес для селекции представляют и многие из комбинаций соматических гибридов картофеля, полученных на основе слияния протопластов возделываемого вида картофеля *S. tuberosum* и ряда его дикорастущих сородичей.

Это обусловлено тем, что от дикорастущих видов перенесены гены, контролирующие устойчивость картофеля ко многим болезням.

В селекционных целях находит применение и метод получения цибридов у томатов, капусты, картофеля.

Так, в результате соматической гибридизации между культурным видом картофеля *S. tuberosum* и его дикорастущим сородичем *S. commersonii* получены цибриды, содержащие ядерный геном культурного вида и цитоплазматический – дикорастущего.

Дикорастущий вид устойчив к низким температурам и различным патогенам. Признаки устойчивости к таким абиотическим и биотическим факторам контролируются митохондриальными генами. Эти признаки переданы полученным цибридам.

Раздел 23. ТРАНСФОРМАЦИЯ РАСТЕНИЙ

23.1. Основные определения

Одно из современных направлений биологии и биотехнологии, где широко используют методы культуры изолированных органов, тканей, клеток и протопластов – это **генная (генетическая) инженерия**.

В задачу генетической инженерии входят:

- 1) конструирование функционально активных генетических структур в виде рекомбинантных (гибридных) ДНК;
- 2) введение рекомбинантных ДНК в клетку;
- 3) создание условий для экспрессии введенных генов.

Таким образом, в растительную клетку могут быть перенесены гены далеких таксономических групп, что не может быть реализовано при половом скрещивании или при слиянии протопластов. С помощью методов генной инженерии в растения вводят гены микроорганизмов и животных.

Растения, полученные в результате такой реконструкции генома, называют *трансгенными растениями*, или *трансформантами*. Процесс введения чужеродной ДНК в клетку называют *трансформацией*.

В качестве реципиентов, встраивающих в свой геном чужеродные гены, используют протопласты, изолированные клетки и ткани, микроспоры, незрелые зиготические зародыши.

Требования к клеткам-мишеням растений-реципиентов: встраивать в собственный геном чужеродные гены и сохранять способность к регенерации растений.

Генетическая инженерия как новое направление исследований развивается с 1972 г., когда группа американских ученых впервые сконструировала рекомбинантную ДНК, состоящую из трех источников (Berg et al., 1972):

- генома онкогенного вируса обезьяны SV40;
- части генома умеренного лямбда-фага *E. coli*;
- гена галактозного оперона *E. coli*.

23.2. Общий принцип проведения работ по генной инженерии

1. Для получения необходимого для переноса гена (*трансгена*) используют один из методов:

- а) выделение гена из генома донора (растения, клеточной суспензии, бактерий и т.д.);
- б) химический синтез гена;
- в) получение гена с помощью копирования ДНК на РНК-матрицах при наличии обратной транскриптазы.

2. Выбор *вектора* (переносчика) в виде молекулы ДНК, способной к репликации в соответствующей клетке-хозяине и включению в себя чужеродной ДНК.

3. Обработка вектора рестриктазой, ответственной за рестрикцию специфического сайта на ДНК.

4. Сшивка вектора с помощью лигазы с выделенным или синтезированным геном.

5. Введение сконструированной рекомбинантной ДНК в клетки-мишени реципиента.

6. Получение доказательства присутствия рекомбинантной ДНК, введенной в геном реципиента, в клеточных клонах или у регенерировавших растений.

Генетическая конструкция, предназначенная для переноса в чужеродный геном, кроме трансгена, должна содержать *регуляторные последовательности* и *маркерный ген*, заведомо работающий в клетках реципиента и кодирующий устойчивость к определенным веществам.

В качестве маркеров используют гены, контролирующие устойчивость к определенным антибиотикам (канамицину, карбенициллину и т. д.) или гербицидам. При наличии маркерных генов трансформированные клетки и растения легко селекционируются на средах с добавлением антибиотика или гербицида: выживают только трансформанты.

Другой прием – введение вместе с трансгеном *репортерных генов*, по наличию продуктов которых можно выявлять трансгенные растения.

В качестве одного из репортерных генов используют выделенный из генома *E. coli* ген, кодирующий β -глюкуронидазу.

Когда клетки трансгенного растения, экспрессирующие β -глюкуронидазу, инкубируют с X-глюкуронидом продуцируется голубое свечение.

Другой пример репортерного гена – ген GFP, выделенный из генома медузы *Aequorea victoria*, кодирует флюоресцирующий белок, который накапливается у трансгенных растений в пластидах. При помещении растений в специальную камеру с голубым освещением трансформанты светятся зеленым светом.

23.3. Природные генные векторы у растений

В природных условиях роль универсальных векторов выполняют *плазмиды* почвенных бактерий (агробактерий): *Ti-плазида Agrobacterium tumefaciens* и *Ri-плазида Agrobacterium rhizogenes*.

Эти плазмиды содержатся во всех вирулентных штаммах соответствующих бактерий. В естественных условиях они поражают до 60 % двудольных растений и такие однодольные, как лилейные и амариллисовые. У авирулентных штаммов бактерий плазмиды имеют делеции в определенных районах ДНК.

Вирулентные штаммы *Agrobacterium tumefaciens* вызывают у растений заболевание – «*корончатые галлы*» (рис. 35), а вирулентные штаммы *Agrobacterium rhizogenes* у пораженных растений индуцируют развитие «*косматых корней*» («*бородатых корней*») (рис. 36). Опухолевый рост может продолжаться и в отсутствие бактерии, а при пересадке галловой ткани в культуральные условия ткань продолжает расти на средах без ауксинов и цитокининов.



Рис. 35. «Корончатые галлы», индуцированные на каланхое: октопиновый тип (1), нопалиновый тип (2) (Hooykaas et al., 1979)



Рис. 36. Опухоль «бородачатые корни» на каланхое (Пирузян, 1988)

Появление опухолей обусловлено функцией бактериальных мегаплазмид – *Ti*-плазмиды (Tumor inducing) и, соответственно, *Ri*-плазмиды (Root inducing).

В работах по генной инженерии в качестве векторов для трансформации чужеродного генетического материала в растительные клетки наиболее часто используют генетические системы, построенные на основе *Ti*-плазмиды (*pTi-A*).

Схема генетической карты нопалиновой плазмиды *pTi-A* представлена на рис. 37.

Необходимо подчеркнуть, что *Ti*-плазмиду рассматривают как природную химеру, так как в ее геноме содержится два набора генов. Один набор генов плазмиды активен в бактерии, другой – в клетках растения. Это следует из особенностей заражения растений вирулентным штаммом агробактерии.

23.4. Последовательность заражения растений вирулентными штаммами *Agrobacterium tumefaciens*

Агробактерии поражают только поврежденные растения, реагируя на *ацетосирингон* – соединение, которое синтезируют и выделяют клетки поврежденной ткани.

В результате *хемотаксиса* (передвижения, вызванного реакцией на химическое вещество) бактерия прикрепляется к поверхности

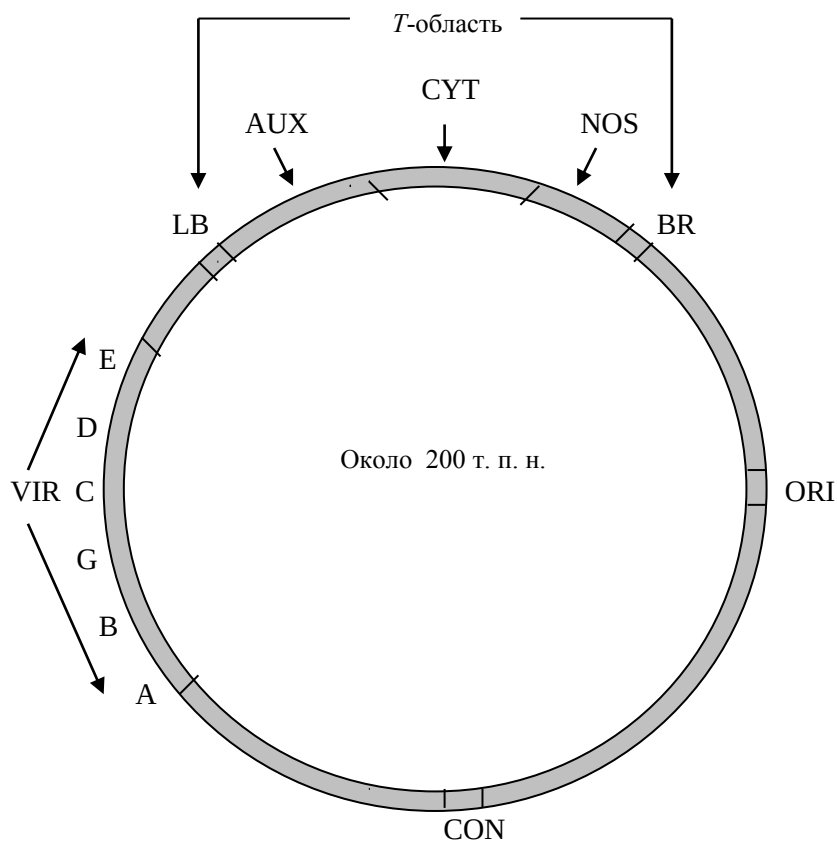


Рис. 37. Схема генетической карты нопалиновой плазмиды *Ti*-плазмиды (*pTi-A*): *T*-область – ДНК плазмиды, переносимая в клетку растения; *LB* – левая граница *T*-области; *RB* – правая граница *T*-области; *AUX* – ген, контролирующий синтез ауксина в трансформированной клетке; *CYT* – ген, контролирующий синтез цитокинина в трансформированной клетке; *NOS* – ген, контролирующий синтез нопалина в трансформированной клетке; *VIR* – вирулентная область; *CON* – область, кодирующая функции конъюгации; *ORI* – область репликации в *Agrobacterium tumefaciens*

растительной клетки в месте ранения растения. После этого происходит транскрипция *vir*-области *Ti*-плазмиды.

Продукт гена *virA* взаимодействует с ацетосирингоном и передает этот внеклеточный сигнал внутрь клетки, что приводит к активации продукта гена *virG*. Измененный белок *virG* затем активирует остальные гены вирулентности (*Vir B, C, D, E*), а также повышает уровень транскрипции самого локуса *virG*.

Считают, что продукты оперона *virD* обладают эндонуклеазной активностью. Синтез этих продуктов приводит к появлению одноцепочечных разрывов внутри пограничных последовательностей длиной 25 пар нуклеотидов, фланкирующих *T*-ДНК.

Происходит синтез новой цепи *T*-ДНК и перенос одноцепочечной *T*-ДНК в клетку растения, где она стабильно встраивается в ядерную ДНК. Предполагается, что в переносе *T*-ДНК участвуют белки, кодируемые опероном *virE*.

Стабильная интеграция и экспрессия бактериальной ДНК в геном растения приводит к появлению новых свойств клетки:

1. Начинается неконтролируемое деление клетки, в результате чего образуется опухоль – корончатые галлы.

2. В результате активации *aux* и *cyt* генов происходит синтез ауксинов и цитокининов, индуцирующих рост опухолевых клеток.

3. В опухолевых клетках синтезируются необычные соединения, которые больше нигде в природе не встречаются, – *опины* (*октопины* и *нопалины*), которые являются производными аминокислот и сахаров. Опины выделяются трансформированными клетками и метаболизируются агробактерией в качестве источника углерода, азота и энергии.

pTi-Плазмиды классифицируются в соответствии с теми опидами, синтез которых они индуцируют. При этом *T*-ДНК содержит высоко консервативную область, общую для *Ti*-плазмиды различного типа. *T*-ДНК может быть обнаружена в корончатых галлах в виде одной или более 20 копий. Копии ДНК могут быть разбросаны по всему геному и сцеплены с различными районами ДНК.

23.5. Использование плазмиды агробактерии в качестве вектора для трансформации растений

Способность агробактерий переносить определенные последовательности ДНК в геном растения используется для конструирования векторов трансформации растений. Для этого природная *Ti*-плазида должна быть реконструирована таким образом, чтобы отвечать следующим требованиям:

1) содержать все сигналы, необходимые для переноса и стабильной интеграции *T*-ДНК в ядерный геном растения;

2) содержать систему для стабильного поддержания в плазмиде встроенных чужеродных генов, а также для их экспрессии после передачи и встраивания в ДНК растения;

3) содержать маркерный ген, который обеспечивает возможность селекции трансформированных клеток, клеточных колоний или растений;

4) не иметь побочных функций, которые бы отрицательно влияли на дифференцировку клеток и регенерацию растений.

Установлено, что кодируемые в *Ti*-плазмидой *T*-ДНК онкогены (*ocs*-гены) не участвуют ни в переносе *T*-ДНК в клетку растения, ни в ее интеграции с ядерной ДНК. Таким образом, эти гены могут быть удалены и заменены на чужеродные – трансген и маркерный ген.

При этом плазида утрачивает онкогенные свойства. В реконструированной неонкогенной *Ti*-плазмиде должен содержаться полный набор *vir*-генов, обеспечивающий основные ее функции.

Неонкогенные векторы делят на два типа – *цис*- или *транс*- в зависимости от того, находится ли область *T*-ДНК, фланкированная прямыми повторами длиной 25 пар нуклеотидов, на том же репликоне, что и *vir*-гены, или на отдельной плазмиде. В первом случае (*цис*-действующие *vir*-гены) вектор называют *коинтегративным*, а во втором случае – при использовании *транс*-действующих *vir*-генов – *бинарным* вектором.

Принцип конструирования векторов рекомбинантных ДНК с использованием *pTi-A* включает в себя следующие манипуляции.

T-ДНК выделяют из *Ti*-плазмиды и вводят, например, с помощью плазмидного вектора pBR322 в *E. coli*, где *T*-ДНК клонируется.

Затем производят встраивание нужных сегментов ДНК в подходящие сайты рестрикции в *T*-ДНК выделенной плазмиды и полученные рекомбинанты повторно клонируют в *E. coli*.

Реконструированные плазмиды вводятся путем сложной конъюгации в клетки *Agrobacterium tumefaciens*, которые исходно несут *pTi-A* дикого типа. В результате гомологичной конъюгации *T*-ДНК со встроенным фрагментом переходит в область *T*-ДНК интактной плазмиды *pTi-A*. Затем производят отбор клеток агробактерии, несущих рекомбинантные плазмиды *pTi-A*.

Для трансформации растений с использованием вирулентных агробактерий, имеющих реконструированную плазмиду, используют кокультивацию агробактерий с фрагментами органов или тканей растений, развивающимися соматическими зародышами, эмбрионными клеточными культурами, протопластами.

В этом случае происходит естественное заражение отдельных клеток или тканей. Продолжительность кокультивации зависит от исходного объекта и способа кокультивации и может протекать от нескольких минут до нескольких суток.

После совместного культивирования агробактерию удаляют с помощью антибиотиков. Трансформированные клетки и фрагменты тканей культивируют на питательных средах, создавая условия для развития клеточных культур и регенерации растений. На селективных средах, содержащих соответствующий антибиотик, проводят отбор трансформированных клеточных линий или растений.

Эффективность трансформации у растений определяется следующими параметрами:

- 1) числом жизнеспособных клеток после обработки;
- 2) частотой трансформации, которая зависит от частоты интеграции перенесенных генов и их экспрессии;
- 3) частотой регенерации и развития трансгенных растений.

23.6. Альтернативные методы трансформации растительных клеток

Недостаток системы агробактерий – неспособность трансформировать большую часть однодольных растений, в том числе злаки. И хотя удается получать трансгенные растения злаков с использо-

ванием кокультивации суспензионных клеток и каллусов с *Agrobacterium tumefaciens*, эффективность метода ограничена способностью изолированных клеток и тканей к регенерации.

Кроме того, процесс реконструирования *Ti*-плазмиды трудоемок, и трансформация двудольных растений с помощью агробактерии не во всех случаях эффективна. В связи с этим разрабатываются альтернативные методы переноса генов посредством *изолированной векторной ДНК* (DMGT, от англ. *DNA-mediated gene transfer*).

ДНК-векторы представляют собой небольшие плазмиды, содержащие множественные сайты для клонирования, гены устойчивости к антибиотикам, которые могут функционировать в клетках растения. Кроме того, они должны содержать прокариотические гены, обеспечивающие устойчивость к антибиотикам при селекции в бактериях.

Такие *малые векторные плазмиды* вводят в *E. coli*, где получают высокое число их копий. Затем из *E. coli* выделяют относительно большие количества векторной ДНК, используемой затем для трансформации растений.

Методы трансформации с использованием ДНК-векторов:

- Химически стимулированный *эндоцитоз* (поглощение) ДНК-вектора протопластами или пыльцевыми зернами при наличии полиэтиленгликоля (ПЭГ 6 000), способствующему агглютинации.
- Прямой перенос ДНК-вектора в протопласты в результате *электропорации* – пробивания клеточных мембран короткими электрическими импульсами.

В этих условиях через образующиеся на короткое время поры ДНК проникает в клетку, где может интегрироваться в геном ядра или цитоплазматической органеллы. В качестве мишеней используют незрелые зародыши, каллусные культуры, способные к регенерации, протопласты, пыльцевые зерна в разных стадиях развития. Трансформированной зрелой пылью опыляют растения. Незрелые микроспороциты после трансформации культивируют *in vitro* для получения андрогенных растений.

- *Биобаллистическая трансформация*. Метод, при использовании которого производят *бомбардирование микрочастицами* (1–3 мкм в диаметре) из золота или вольфрама, покрытыми ДНК, клеточ-мишеней. Для этих целей используют «генные пушки» (рис. 38).

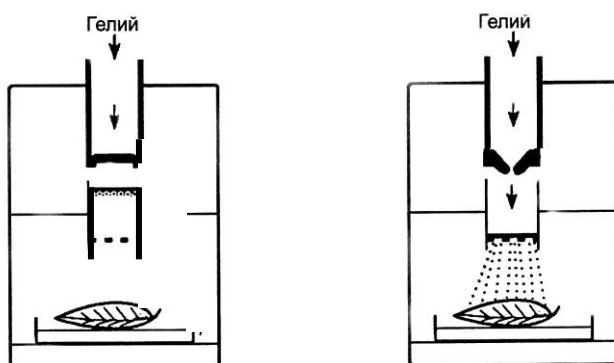


Рис. 38. Схематическое изображение «генной пушки»

В качестве мишеней используют каллусные ткани, фрагменты тканей, развивающиеся соматические или незрелые зиготические зародыши, изолированные органы растений.

Микрочастицы могут проникать на глубину 2-3 клеточных слоев, доставляя ДНК, которая в процессе деления клетки встраивается в геном. Клетки не повреждаются и остаются способными к регенерации растений.

- *Микроинъекции* ДНК в протопласты, клетки или зиготические предзародыши с помощью микропипетки (инъекционного капилляра).
- Использование *микролазеров*, разрушающих клеточные стенки, что способствует внедрению ДНК в клетки при их инкубации в растворах ДНК.

23.7. Особенности трансгенных растений

Показано, что число копий целевого гена, включенного в геном, может варьировать из-за амплификации в геноме реципиента.

Например, у растений табака, трансформированных геном *legA*, кодирующим запасной белок гороха, число копий, включенных в диплоидный геном, могло быть от 1 до 12. Уровень экспрессии этого гена в семенах трансформированных растений в значительной степени изменялся и не коррелировал с числом копий.

Возможно, это связано с эффектом положения встроенного гена. Используемые методы трансформации приводят к случайному встраиванию чужеродной ДНК в геном реципиента. В процессе онтогенеза перенесенные гены могут экспрессироваться в течение всего онтогенеза во всех органах и тканях.

Существует проблема «замолкания» встроенных генов в потомстве трансгенных растений, что может быть связано с реакцией растения-реципиента на присутствие в геноме чужеродного гена, приводящей к его инактивации.

23.8. Практическое использование трансгенных растений

Работы по трансформации направлены как на получение новых генетических моделей, так и для использования трансформантов в качестве исходного материала в селекции растений.

Один из первых коммерческих товаров, известный с 1993 г. в области генетической инженерии растений, – томат *Flavr Savr*, в геном которого встроена антисмысловая конструкция по отношению к гену полигалактуроназы – фермента, участвующего в процессе разложения плодов томата. Экспрессия встроенного гена приводит к подавлению синтеза этого фермента, и, как следствие, у трансгенных томатов проявляется признак длительной лежкости плодов без гниения.

Трансгенные растения табака, кукурузы, рапса, хлопчатника, сои, устойчивые к малотоксичным для животных и человека гербицидам, а также растения, устойчивые к насекомым (кукурузному пилильщику у кукурузы, колорадскому жуку у картофеля), выращивают на больших площадях.

Получены трансгенные растения, в том числе картофеля, устойчивые к вирусам и фитофторе. Созданы трансгенные линии гвоздики с модифицированной окраской цветков и повышенной продолжительностью жизни в срезанном состоянии в сосудах.

Получили развитие исследования по метаболической инженерии растений, направленные на изменение биохимических реакций у клеток трансгенных растений. Так, перенос гена синтеза гиосциамин-6- β -гидроксилазы из белены в растения красавки превратил продуцент атропина в продуцент скополамина.

Получены трансгенные растения *Brassica rapa*, в семенах которых содержание стеарата (жирная кислота) увеличено по сравнению с исходными растениями в 25 раз.

С помощью технологии антисмысловых РНК получены трансгенные растения картофеля с подавлением синтеза ключевого фермента биосинтеза крахмала АДФ-глюкозопирофосфорилазы и, как следствие, блокирование биосинтеза крахмала. В клубнях таких растений низкое содержание крахмала и сухих веществ, но большое количество растворимых сахаров.

Развиваются исследования по созданию трансгенных растений – продуцентов антител с целью их крупномасштабного производства и использования для вакцинации человека и животных.

Одно из достижений в области трансформации растений – созданного в 1999 г. швейцарскими учеными «золотого риса». В геном риса введены гены, ответственные за синтез бета-каротина (предшественника витамина А в организме).

Кроме того, получены трансгенные растения риса с увеличенным содержанием железа в зерне.

Эти технологии в настоящее время используются в целях улучшения рациона питания стран Юго-Восточной Азии, население которых, отдавая предпочтение рису, испытывает в то же время дефицит витамина А и микроэлементов.

Библиографический список

Андропова Е. В. Эмбриогенез у орхидных // Эмбриология цветковых растений. Терминология и концепция / Под ред. Т. Б. Батыгиной. СПб.: Мир и семья, 1997. Т. 2: Семя. С. 544–556.

Бурьянов Я. И. Успехи и перспективы генно-инженерной биотехнологии растений // Физиология растений. 1999. Т. 46, № 6. С. 930–944.

Бутенко Р. Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1970. С.84–92.

Васильева И. С., Пасешиченко В. А. Стероидные гликозиды растений и культуры клеток диоскореи, их метаболизм и биологическая активность // Успехи биол. химии. 2000. Т. 40. С. 153–204.

- Генетика развития растений* / Л. А. Лутова, Н. А. Проворов, О. Н. Тиходеев и др. СПб.: Наука, 2000.
- Глеба Ю. Ю., Сытник К. М.* Клеточная инженерия растений. Киев: Наук. думка, 1984.
- Глик Б., Пастернак Дж.* Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002.
- Дрейпер Дж. и др.* Генная инженерия растений. М.: Мир, 1991.
- Захаренко В. А.* Создание трансгенных форм растений и использование их в практике защиты от болезней и вредителей // С.-х. биология. 2000. № 3. С.30–49.
- Картель Н. А. и др.* Генетика: Энцикл. слов. / Н. А. Картель, Е. Н. Макеева, А. М. Мезенко. Минск: Тэхналогія, 1999.
- Комов В. П., Шведова В. Н.* Биохимия. М.: Дрофа, 2004.
- Мызина С. Д., Халимская Л. М.* Биологическая роль химических элементов: Учеб. пособие. Новосибирск: НГУ, 2004.
- Новак Ф. Й.* Индукция гаплоидов в культуре тканей и их значение в селекции растений // Культура клеток растений и биотехнология. М.: Наука, 1986.
- Носов А. М.* Регуляция синтеза вторичных соединений в культуре клеток растений // Биология культивируемых клеток и биотехнология растений. М.: Наука, 1991. С. 5–20.
- Пирузян Э. С.* Основы генетической инженерии растений. М.: Наука, 1988.
- Сидоров В. А.* Биотехнология растений. Клеточная селекция. Киев: Наук. думка, 1990.
- Сингер М., Берг П.* Гены и геномы. М: Мир, 1998. Т. 1.
- Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 27. Somatic Hybridization in Crop Improvement I.* Ed. Y. P. S. Bajaj. Springer-Verlag. Berlin; Heidelberg; N.Y., 1994.
- Cardi T., Puite K. J., Ramulu K. S.* Plant regeneration from mesophyll protoplasts of *Solanum commersonii* Dun. // Plant Science. Vol. 70. 1990. P. 215–221.
- Ducreux L.J., Morris W.L., Taylor M. A., Millam S.* Agrobacterium-mediated transformation of *Solanum phureja* // Plant Cell Rep. 2005. Vol. 24. P. 10–14.

Gauther R. J. History of Plant Tissue and Cell Culture: A Personal Account // Cell Culture and Somatic Cell. Genetic of Plants. Academic Press, Inc., 1985. Vol. 2. P. 1–59.

Helgenson J. P., Haberlach T. Somatic hybrids of *Solanum tuberosum* and related species // Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Dordrecht; Boston; L., 1999. Vol. 36: Kluwer Academic Publishers. P. 151–154.

Jain S. M. An overview of progress on somatic embryogenesis in forest trees // Plant Biotechnology and *in vitro* Biology in the 21st Century. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht; Boston; L., 1999. P. 57–63.

Ke S., Gui Y., Skirvin R. M. Somatic embryogenesis and artificial seeds in *Coptis chinensis* F. // Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer-Verlag: Berlin; Heidelberg, 1995. Vol. 31: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed. Part II. P. 323–333.

Kiviharju E., Tuominen U., Tormala T. The effect of explant material on somatic embryogenesis of *Cyclamen persicum* Mill. // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1992. Vol. 28. P. 187–194.

Komamine A., Asami J., Endo Y. et al. Gene expression during somatic embryogenesis in carrot suspension cultures // Plant Biotechnology and *in vitro* Biology in the 21st Century. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht; Boston; L., 1999. P. 65–68.

Larkin P. J., Ryan S. A., Brettel R. I. S., Scowcroft W. R. Heritable somaclonal variation in wheat // Theor. Appl. Genet. 1984. Vol. 67. P. 443–455.

Li C., Xia G., Xiang F. et al. Regeneration of asymmetric somatic hybrid plants from the fusion of two types of wheat with Russian wildrye // Plant Cell Rep. 2004. Vol. 23. P. 461–467.

Peschke V. M., Phillips R. L. Genetic implications of somaclonal variation in plants // Advances in Genetics. 1992. Vol. 30. P. 41–75.

Potrykus I. Nutritionally enhanced rice to combat malnutrition disorders of the poor // Nutr. Rev. 2003. Vol. 61. P. 101–104.

Rival A., Berlenc F. A., Morcillo F., Tregear J. et al. Scaling-up *in vitro* clonal propagation through somatic embryogenesis: the case of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) // Plant Tissue Culture and Biotechnology. 1997. Vol. 3, № 2. P. 74–83.

Trick H. N., Dinkins R. D., Saterem E. R., Rong D. et al. Recent advances in soybean transformation // Plant Tissue Culture and Biotechnology. 1997. Vol. 3, № 1. P. 9–26.

Tzfira T., Ya'ari A., Yarnitzky O., Riov J., Altman A. In vitro clonal propagation of aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) // Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture. Dordrecht; Boston; London, 1999. Vol. 36: Kluwer Academic Publishers. P. 89–91.

Verpoorte R., Heijden R., Hoopen H. J. G., Memelink J. Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production // Plant Tissue Culture and Biotechnology. 1998. Vol. 4. P. 3–20.

Zhong J. J., Yue C. J. Plant cells: secondary metabolite heterogeneity and its manipulation // Adv. Biochem. Eng. Biotechnology. 2005. Vol. 100. P. 53–88.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

Адвентивные почки (добавочные, случайные) – почки, возникающие из клеток тканей растений, обычно их не образующих.

Анеуплоид – ядро, клетка, организм с числом хромосом, не кратным типичному гаплоидному набору.

Андрогенез in vitro – развитие эмбриоидов, а затем и растений из мужских половых клеток – микроспор в процессе культивирования изолированных пыльников или изолированных микроспор.

Андрогенные гаплоиды – растения, содержащие гаплоидный набор хромосом, получившие развитие из эмбриоидов, сформировавшихся из отдельных микроспор при культивировании изолированных пыльников или микроспор.

Апекс – верхушечная часть стебля или корня.

Апикальное доминирование – явление подавления роста боковых почек побега в присутствии терминальной почки.

Время генерации клетки – интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями.

Время удвоения популяции клеток – интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями.

Гаплоид – ядро, клетка, организм с набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду.

Генная инженерия – совокупность приемов, методов и технологий, направленных на получение рекомбинантных ДНК (или выделение генов из организмов), осуществление манипуляций с генами и введение их в геном других организмов.

Гетерокарион – клетка, образовавшаяся в результате слияния протопластов и имеющая два или более двух генетически различающихся ядер в общей цитоплазме.

Гомокарион – клетка, образовавшаяся в результате слияния протопластов и имеющая два или более двух генетически идентичных ядер в общей цитоплазме.

Гиногенез *in vitro* – развитие эмбриоидов, а затем и растений из неоплодотворенных яйцеклеток, культивируемых *in vitro*.

Дедифференциация – переход специализированных, неделящихся клеток к пролиферации и неорганизованному росту каллуса, что сопровождается утратой клетками специализации.

Диплоид – ядро, клетка, организм с двойным набором гомологичных хромосом, представленным числом, характерным для данного вида.

Дифференциация, дифференцировка: 1) возникновение в процессе развития в организме или отдельной его части морфологических и функциональных различий; 2) комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими клетками.

Изолированный протопласт – растительная клетка, лишенная клеточной стенки в результате действия ферментов или механического разрушения.

Инокулюм – ткань, орган или часть клеточной суспензии, взятые из условий культивирования и перенесенные на свежую культуральную среду.

In vitro – лат., выращивание живых растительных объектов (изолированных зародышей, тканей, клеток) «в стекле» (пробирке, колбе, биореакторе) в асептических условиях на искусственных питательных средах.

In vivo – лат., нормальные условия выращивания (в поле или в теплице).

Искусственные семена – инкапсулированные соматические зародыши.

Каллус – недифференцированная ткань, развивающаяся путем неорганизованного роста клеток; в естественных условиях – на раневых поверхностях; *in vitro* – при культивировании клеток и тканей.

Клеточная инженерия растений – метод генетического конструирования клеток и растений нового типа, включающий получение и культивирование протопластов *in vitro*, их гибридизацию и реконструкцию ядерных и органельных геномов путем слияния протопластов, принадлежащих растениям таксономически отдаленных видов.

Клеточная селекция *in vitro* – метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.

Клон: 1) культура, возникшая из одной клетки; 2) генетически идентичные организмы.

Клональное микроразмножение или **микрклональное размножение** – получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному (метод вегетативного размножения растений в культуре *in vitro*).

Культура зиготических зародышей *in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде незрелых или зрелых изолированных зародышей.

Культура каллусов *in vitro* – выращивание в длительной пересадочной культуре каллусов, возникших путем дедифференциации и пролиферации клеток, тканей, органов растений.

Культура корней *in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней.

Культура меристем *in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде изолированного апекса или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями.

Культура органов *in vitro* – асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней, стеблевых апексов, незрелых частей цветка, незрелых плодов.

Культура «привыкших» тканей (химических опухолей) – выращивание тканей, возникших в результате мутации клеток нормальных каллусных тканей, и способных расти на питательных средах без гормонов.

Культура тканей *in vitro* – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений.

Культура суспензионная или **культура клеток *in vitro*** – асептическое выращивание отдельных клеток или их небольших групп во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде.

Линия – культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

Меристема – образовательная ткань с мелкими, активно делящимися клетками.

Морфогенез *in vitro* – процесс формообразования, т. е. заложения, роста и развития клеток (цитогенез), тканей (гистогенез) и органов (органогенез) в культуре клеток и тканей *in vitro*.

Несовместимость прогамная – несовместимость между растениями разных таксономических групп, проявляемая в процессе прорастания пыльцы и цыльцевых трубок при отдаленных скрещиваниях.

Несовместимость постгамная (эмбриональная) – несовместимость, проявляемая в период развития зародыша и эндосперма, формирующихся после скрещивания растений отдаленных таксономических групп.

Несовместимость постэмбриональная – несовместимость, проявляемая с начала прорастания семян, получивших развитие в результате скрещиваний между таксономически разобщенными видами растений, а также в период развития гибридных растений первого поколения, в том числе при восстановлении их фертильности.

Несовместимость сингамная – несовместимость, проявляемая в период двойного оплодотворения при скрещивании между растениями отдаленных таксономических групп.

Органогенез – формирование органов *de novo*.

Пролиферация – новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

Протоклональная изменчивость растений – изменчивость проявляющаяся у растений, регенерировавших в результате культивирования протопластов.

Протопласт – растительная клетка, лишенная клеточной стенки.

Регенерация – развитие целостного организма из клетки, ткани, органа.

Ризогенез – процесс формирования, роста и развития корней *de novo*.

Ростовой цикл – рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризующийся сигмоидальной (S-образной) кривой.

Сингамная несовместимость – несовместимость проявляется в период двойного оплодотворения.

Слияние протопластов – процесс, при которой протопласты сливаются в одну клетку.

Соматоклональная изменчивость – спектр генетической, цитогенетической, молекулярной изменчивости, обусловленный изменениями в ядерном или цитоплазматических геномах в результате культивирования клеток, органов и тканей растений *in vitro*.

Соматическая (парасексуальная) гибридизация – способ создания гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений путем генетической рекомбинации хромосом и генов ядра и органелл в результате слияния изолированных протопластов.

Соматический гибрид – клетка или растение, полученное в результате слияния протопластов (должно иметь место слияние ядер), выделенных из соматических клеток, различающихся генетически.

Субкультивирование – процесс переноса инокулюма или части каллусной культуры в культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Суспензионная культура – культура отдельных клеток или их небольших агрегатов, выращиваемых в жидкой среде во взвешенном состоянии при использовании аппаратуры, обеспечивающей аэрацию и перемешивание.

Трансформация – введение и интеграция чужеродной ДНК в геном клетки растения, приводящие к генетической модификации.

Тотипотентность (лат. *Totus* – весь, *potentia* – сила) – свойство клетки реализовать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма.

Хромосомная инженерия – комплекс генетических методов, основанных на внутривидовой или отдаленной гибридизации, направленно используемых для интеграции в геном культурных растений близкородственных или чужеродных геномов, отдельных хромосом, их фрагментов или отдельных генов.

Цибрид: 1) растение, полученное при слиянии изолированного протопласта с цитопластом, т. е. с протопластом в котором инактивировано или удалено ядро; 2) растение, получившее развитие от продуктов слияния протопластов и имеющее оргanelльные геномы обоих родителей, а ядерный геном одного.

Цикл выращивания – период от помещения клеточного инокуляма суспензионной культуры или части каллуса на питательную среду до последующего субкультивирования.

Штамм – культура, развившаяся после первого субкультивирования, и состоящая из многих клеточных линий, возникших из клеток первичного каллуса.

Эксплант – фрагмент органа или ткани растения, перенесенный для культивирования на питательную среду в условия *in vitro*.

Эмбриоид – зародышеподобная структура, формирующаяся в условиях *in vitro*, способная в дальнейшем развиться в растение.

Эмбриокультура (культура зародышей) – культура изолированных зародышей зиготического происхождения.

Эмбриоидогенез – процесс образования *de novo* зародышеподобных структур (эмбриоидов) неполовым путем из соматических клеток при культивировании тканей и клеток *in vitro*; синоним: адвентивный или асексуальный эмбриогенез.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Раздел 1. Развитие биотехнологии и ее основные направления.....	3
Раздел 2. Применение методов культуры клеток, органов, тканей растений.....	6

Раздел 3. Тотипотентность растительной клетки	8
Раздел 4. Исторические этапы развития методов культивирования <i>in vitro</i>	9
Раздел 5. Источники питания растений в условиях <i>in vivo</i>	14
5.1. Минеральные вещества.....	14
5.2. Витамины.....	16
5.3. Фитогормоны.....	20
5.3.1. Общая характеристика.....	20
5.3.2. Ауксины.....	20
5.3.3. Гиббереллины.....	24
5.3.4. Цитокинины.....	26
5.3.5. Абсцизовая кислота.....	28
5.3.6. Этилен.....	30
Раздел 6. Основные компоненты питательных сред при культивировании <i>in vitro</i>	31
Раздел 7. Культура отдельных изолированных клеток для доказательства тотипотентности	33
Раздел 8. Культура клеточных суспензий.....	35
8.1. Получение суспензионных культур.....	35
8.2. Накопительное культивирование суспензий.....	36
8.3. Фазы ростового цикла в суспензионной культуре	37
8.4. Характеристика фаз ростового цикла	38
8.5. Непрерывное культивирование суспензий... ..	39
8.6. Основные параметры клеточных культур.....	40
Раздел 9. Характеристика каллусных и клеточных культур.....	42
9.1. Образование каллуса.....	42
9.2. Образование «привыкшей» ткани.....	42
9.3. Дифференциация элементов проводящей системы в каллусной культуре.....	43
9.4. Цитогенетические особенности культивируемых клеток	44
Раздел 10. Органогенез в культуре соматических тканей.....	46
Раздел 11. Соматический эмбриогенез.....	51
Раздел 12. Соматическая изменчивость	55
Раздел 13. Клеточная селекция и мутагенез.....	60
Раздел 14. Культура <i>in vitro</i> для получения биологически активных соединений.....	66

Раздел 15. Методы <i>in vitro</i> для оздоровления и размножения растений.....	72
15.1. Методы оздоровления растений.....	72
15.2. Особенности культивирования <i>in vitro</i> при клональном микроразмножении	76
Раздел 16. Получение андрогенных и гиногенных гаплоидов.....	79
16.1. Значение гаплоидов.....	79
16.2. Культура изолированных пыльников.....	80
16.3. Гаметоклональная изменчивость.....	86
16.4. Практическое использование метода культивирования пыльников	88
16.5. Получение гиногенных гаплоидов.....	89
Раздел 17. Культура <i>in vitro</i> изолированных эндоспермов.....	90
Раздел 18. Культура изолированных завязей и семян.....	92
18.1. Культура завязей.....	92
18.2. Культура семян и методы опыления <i>in vitro</i>	94
18.3. Культура опыленных семян.....	95
Раздел 19. Культура изолированных зародышей.....	96
19.1. Особенности культивирования зародышей.....	96
19.2. Применение методов культивирования изолированных зародышей.....	98
Раздел 20. Хромосомная инженерия растений и использование методов культивирования <i>in vitro</i>	102
Раздел 21. Культура протопластов.....	107
21.1. Изоляция протопластов.....	107
21.2. Тотипотентность протопластов.....	109
21.3. Требования к составу сред при культивировании протопластов	110
21.4. Использование культуры протопластов.....	110
Раздел 22. Соматическая гибридизация.....	111
22.1. Основные понятия.....	111
22.2. Методы слияния протопластов.....	112
22.3. Методы селекции продуктов слияния.....	115
22.4. Цитологические особенности продуктов слияния соматических клеток.....	116
22.5. Примеры практического использования соматических гибридов.....	118

Раздел 23. Трансформация растений.....	120
23.1. Основные определения.....	120
23.2. Общий принцип проведения работ по генной инженерии.....	121
23.3. Природные генные векторы у растений.....	122
23.4. Последовательность заражения растений вирулентными штаммами <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ..	123
23.5. Использование плазмиды агробактерии в качестве вектора для трансформации растений.....	126
23.6. Альтернативные методы трансформации растительных клеток	127
23.7. Особенности трансгенных растений.....	129
23.8. Практическое использование трансгенных растений...	130
Библиографический список	131
Словарь терминов.....	134