

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное образовательное учреждение  
высшего профессионального образования  
«СМОЛЕНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

**В.Н. ДЫШКО**

# **КЛЕТОЧНАЯ И ТКАНЕВАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ**

Курс лекций для аспирантов по направлению подготовки  
35.06.01 Сельское хозяйство

Смоленск 2014

УДК 631.147(075.8)  
ББК41.318.5я73  
Д91

Рецензент: С.М. Вьюгин, доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры агрономии и экологии ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА»

**Дышко В.Н.**

Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве: курс лекций для аспирантов/В.Н. Дышко.– Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014. – 69 с.

Рассмотрены методы ведения культур клеток высших растений, системы культивирования иммобилизованных клеток, микроклональное размножение и оздоровление растений. Направлено на формирование у аспирантов знаний по управлению наследственностью и жизнедеятельностью растений и микроорганизмов, созданию организмов с новыми полезными для человека свойствами, ранее не наблюдавшимися в природе, путем конструирования нужных генов методами клеточной и тканевой инженерии.

Подготовлено в соответствии с требованиями федерального государственного образовательного стандарта высшего образования подготовки научно-педагогических кадров в аспирантуре по направлению подготовки 35.06.01 Сельское хозяйство, направленности (профилю) подготовки Агрехимия - очной и заочной форм обучения.

Может быть использовано также аспирантами других направленностей (профилей) подготовки.

Печатается по решению методического совета ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА» (протокол № 07 от «30» июня 2014 г.)

УДК 631.147(075.8)  
ББК41.318.5(я73)

©Дышко В.Н., 2014

©ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2014

## СОДЕРЖАНИЕ

	С.
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	3
<b>1. БИОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ</b> .....	4
1.1. Биологи культивируемой клетки.....	4
1.2. Мейоз и гормональная регуляция.....	5
1.3. Направления и этапы.....	8
1.4. Культура <i>in vitro</i> и культивирование изолированных клеток и тканей высших растений.....	12
1.5. Условия культивирования изолированных органов, тканей клеток и протопластов на искусственных питательных средах.....	14
<b>2. КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ</b> .....	15
2.1. Общие положения.....	15
2.2. Особенности каллусных клеток.....	17
2.3. Генетика каллусных клеток.....	18
2.4. Гормоннезависимые растительные ткани.....	20
2.5. Культура клеточных суспензий.....	22
2.6. Культура одиночных клеток.....	24
2.7. Морфогенез в каллусных тканях.....	25
2.8. Факторы, влияющие на морфогенез каллусной ткани.....	28
2.9. Культура каллусных клеток в получении веществ вторичного синтеза.....	29
<b>3. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ И ОЗДОРОВЛЕНИЕ РАСТЕНИЙ</b> .....	31
3.1. Этапы и методы клонального микроразмножения растений.....	32
3.2. Оздоровление посадочного материала от вирусов.....	35
3.3. Техника культивирования растительных тканей на разных этапах клонального микроразмножения.....	38
3.4. Оптимизация условий клонального микроразмножения растений...	40
3.5. Влияние генетических, физиологических, гормональных и физических факторов на микроразмножение растений.....	41

<b>4. КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ.....</b>	<b>48</b>
4.1. Вспомогательное использование методов <i>in vitro</i> в селекции растений.....	49
4.2. Клеточная селекция растений.....	53
4.3. Генетические, эпигенетические и морфофизиологические изменения клеток при селекции <i>in vitro</i> .....	55
4.4. Получение растений-регенерантов, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым факторам методами клеточной инженерии .....	56
4.5. Мутагены и их применение при клеточной селекции	60
4.6. Гибридизация соматических клеток. Выделение, культивирование и слияние изолированных протопластов.....	61
4.7. Клеточная селекция и соматическая вариабельность. Соматическая и гаплоидная гибридизация.....	64
4.8. Клональное микроразмножение растений.....	66
<b>Литература.....</b>	<b>68</b>

## ВВЕДЕНИЕ

Клеточная инженерия – это создание клеток нового типа на основе их гибридизации, реконструкции и культивирования. Она включает реконструкцию жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток, объединение целых клеток, принадлежавших различным видам, с образованием клетки, несущей генетический материал обеих клеток, и другие операции. Клеточная инженерия используется для решения теоретических проблем в биотехнологии и является одним из основных её методов для создания новых форм растений.

Клеточная инженерия растений базируется на использовании культуры изолированных клеток, тканей, протопластов. Существует несколько направлений использования этих технологий в растениеводстве.

Культивирование клеток растений *in vitro* обеспечивает возможность применять системы интенсивного отбора клеток, культивированных в строго контролируемых селективных условиях.

Особое направление применения клеточных культур и клеточных технологий - тканевая инженерия, связанная с разработкой биоискусственных органов и тканей. В настоящее время на базе накопленных фундаментальных знаний освоены, включая промышленные масштабы, технологии ведения клеточных культур растительного происхождения.

Растительные клетки и культура растительных тканей позволяют регенерировать целое растение из протопластов и клеток. Особенностью клеточных культур растений является их способность к тотипотенции, т.е. в определенной среде и определенных условиях можно регенерировать целое растение из одной клетки. Эта техника обеспечивает за сравнительно короткий срок получение в контролируемых условиях многочисленных популяций клеток и дает возможность идентифицировать линии растений с повышенной биологической продуктивностью.

Основой для развития новейших реконструктивных технологий являются функционирующие клетки, способные в зависимости от микроокружения формировать ткани разных типов.

# 1. БИОЛОГИЯ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ

## 1.1. Биологи культивируемой клетки

Основная форма существования жизни - клетка, в которой протекают все физиологические процессы как у одноклеточных, так и у многоклеточных организмов. Рост и размножение организмов связаны с образованием новых клеток. Совокупность биохимических процессов, обеспечивающих рост и развитие клетки, называется *обменом веществ*, или *метаболизмом*. Каждая клетка на определенной стадии делится и дает начало двум дочерним клеткам. Клетки разнообразны по форме, величине, степени дифференциации и функциям.

*Клетка* является элементарной единицей жизни: в ней имеется все необходимое для поддержания обмена веществ и размножения. Соматические и половые клетки многоклеточных животных и растений, а также одноклеточные организмы сходны по строению. Среди живых организмов встречаются два типа организации клеток. Наиболее простое строение имеют клетки бактерий и сине-зеленых водорослей, которые объединяются в *прокариотическую группу*. У них нет морфологически выраженного ядра. Клетки всех остальных представителей живого мира относятся к *эукариотической группе*, потому что у них обязательной структурой является клеточное ядро, отделенное от цитоплазмы ядерной оболочкой. Кроме ядра и вакуолей, в цитоплазме существует целый набор специальных структур, или органелл, выполняющих специфические функции.

Передача наследственных признаков потомству как при вегетативном, так и при половом размножении осуществляется делением клеток. Изучение процессов деления эукариотических клеток показало, что из всех клеточных компонентов только хромосомы распределяются поровну между дочерними клетками. Это указывает на участие хромосом в передаче наследственных признаков: в результате деления ядра каждая дочерняя клетка получает точно такой же набор хромосом, как у исходной родительской клетки. В этом уравнительном распределении хромосом ядра заключается генетическое

значение митоза. Пластиды и митохондрии также размножаются путем деления, но их распределение по дочерним клеткам не подчиняется строгой закономерности.

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

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

## **1.2. Мейоз и гормональная регуляция**

*Мейоз* - процесс деления клетки, при котором наблюдаются соединение (конъюгация) гомологичных хромосом попарно и редукция (уменьшение) их числа в клетках - продуктах деления. При мейозе ядро делится дважды. В результате первого мейотического деления образуются два ядра с половинным - гаплоидным числом хромосом. Во втором делении каждое вновь образовавшееся ядро делится еще раз, но уже митотическим путем - расходятся хромосомы, которые образовались из сестринских хроматид.

Таким образом, из каждой клетки, вступившей в мейоз, после двух последовательных делений образуются четыре клетки с половинным числом хромосом.

При мейозе не только вдвое уменьшается число хромосом, но и

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

Таким образом, через комбинаторику гомологов из разных пар и кроссинговер мейоз резко увеличивает наследственную изменчивость нового поколения диплоидных организмов, возникающих после слияния гамет.

Возникшая после слияния отцовского и материнского ядер зигота содержит программу развития будущего организма, записанную в структурах молекул ДНК. Дочерние клетки развивающейся зиготы получают информацию, которая позволяет им во взаимодействии с условиями внешней среды формировать новый организм. Многочисленные факты и специально поставленные эксперименты показывают, что в процессе индивидуального развития и специализации растительных клеток генетическая информация в них не уменьшается, все гены, как правило, сохраняются и при соответствующих благоприятных условиях из каждой соматической клетки растения может развиваться целый организм. Это явление называется *тотипотентностью*. В этом заключается отличие клеток растений от клеток высших животных, для которых невозможна способность восстанавливать целый организм.

Все паренхимные клетки растения, в каких бы тканях они не находились, содержат полный набор генов, такой же, какой имела зигота. Но в каждой ткани действует только часть генов, связанная с дифференциацией данного типа клеток. Одни гены функционируют во всех клетках организма, например гены, контролирующие дыхание, проницаемость мембран, синтез АТФ; другие - только в определенных. Каждая специализированная клетка характеризуется своим набором активных генов. Чем более



специализированы клетки, тем меньше в них активных генов. Разные гены работают не только в различных клетках, но и в разное время, на разных стадиях развития особи. В однотипных клетках одной и той же ткани на разных стадиях развития организма непрерывно меняется набор активных генов. Одни гены включаются, синтезируя и-РНК определенных белков, другие выключаются из этой работы.

Образование в процессе развития из однородных клеток зародыша разнообразных по морфологическим признакам и функциям типов клеток, тканей и органов называется *дифференциацией*. В основе дифференциации тканей лежат различия в активности генов. Центральная проблема онтогенетики - анализ действия гена при формировании признака и установление промежуточных звеньев в цепи *ген - признак*.

В специализированных клетках работает ограниченная группа генов, большая часть их репрессирована. Но ДНК и гены во всех растительных клетках одинаковы, поэтому их активность должна определяться другими механизмами, включение которых не связано с действием генов. Такими механизмами активизации генов являются различия в структуре цитоплазмы, тканевая индукция и гормоны. Яйцеклетка созревает под контролем генов, определяющих разнокачественность частей цитоплазмы, что приводит к неравноценности продуктов первых делений и при дальнейшем размножении клеток - к тканевой дифференциации. Затем в процесс вступает эмбриональная индукция - воздействие одних тканей зародыша на другие. Это воздействие выражается в активации новых генов. Предполагают, что клетки ранее образующейся ткани выделяют вещества, способные активизировать работу генов, необходимых для дифференциации другой ткани, - *тканевая индукция*.

*Гормональная регуляция* - наиболее хорошо изученный механизм активизации генов. Гормоны могут воздействовать на гены непосредственно или вызывать появление в цитоплазме каких-то специфических веществ, действующих затем на гены. Одни гормоны - очень сложные белки; другие -

короткие цепочки полипептидов; третьи - простые производные аминокислот. Проникая в клетку, гормоны воздействуют на комплекс гистоны-ДНК и активируют отдельные локусы.

Особую роль в дифференциации тканей играют гомеобоксовые гены, группы которых содержат одинаковые элементы «гомеобоксы». Они служат адресом для гормональных веществ-регуляторов, определяя одновременную активацию или репрессию целого семейства генов.

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

Клеточная биотехнология базируется на способности клеток к существованию и размножению *in vitro*, их тотипотентности и регенерации. Метод культивирования изолированных тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) применяют в растениеводстве для сохранения и размножения ценных генотипов, в эмбриогенезе, оздоровлении посадочного материала, для получения продуктов вторичного метаболизма, в создании форм растений, устойчивых к абиотическим и биотическим факторам окружающей среды.

### **1.3. Направления и этапы**

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в трех направлениях.

Первое направление связано со способностью изолированных растительных клеток продуцировать ценные для медицины, парфюмерии, косметики и других отраслей промышленности вещества вторичного синтеза: алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др. Как правило, вторичные вещества получают из каллусной ткани, выращенной на твердой (агаризованной) или жидкой (суспензионная культура) питательной среде. На

основе клеточных технологий получают такие медицинские препараты, как диосгенин из клеток диоскореи, аймолин из клеток раувольфии змеиной, тонизирующие вещества из клеток женьшеня, используемые в медицине и парфюмерии. Продуктивность культивируемых клеток в результате клеточной селекции может значительно превышать продуктивность целых растений. Преимуществом такого способа получения веществ вторичного синтеза является также возможность использовать для этой цели растения, не произрастающие в наших природных условиях, и получать продукцию круглый год.

Второе направление - это использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала. Этот метод, названный клональным микроразмножением растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год.

Третье направление - использование изолированных клеток в селекции растений, дающее возможность получать быстрорастущие растения, устойчивые к различным неблагоприятным факторам среды: засуха, засоление, низкие и высокие температуры, фитопатогены, тяжелые металлы и др. Вместе с тем это направление предусматривает создание новых растений путем слияния изолированных протопластов и получения неполовых (соматических) гибридов. Перенос в изолированные протопласты чужеродных генов методами генной инженерии позволяет получать в дальнейшем растения с новыми наследуемыми свойствами. Культивирование изолированных пыльников и семян на искусственных питательных средах дает возможность получать гаплоиды, культивирование зародышей позволяет получать растения из нескрещиваемых (с плохо развитым эндоспермом) гибридных семян. Оплодотворение в пробирке позволяет преодолеть нескрещиваемость некоторых растений.

Успех в применении культуры клеток и тканей в первую очередь зависит от оптимизации физиологических процессов, обеспечивающих нормальное деление клеток, их дифференцировку и регенерацию из них

взрослых растений. Наиболее сложной является регенерация растений из отдельных клеток. В первую очередь это касается злаковых растений. Поэтому важнейшее значение имеет выяснение механизма морфогенеза *in vitro*, регенерации и лежащих в их основе процессов.

Попытки культивировать изолированные от растений ткани делались давно, и в истории развития этого метода можно выделить несколько этапов.

Э т а п № 1 (1892-1902 гг.) связан с именами таких немецких исследователей, как Г. Хаберландт, Х. Фёхтинг, С. Рехингер. Они пытались культивировать в растворе сахарозы различные растительные ткани. Для сегментов стеблей одуванчика и тополя был получен первичный каллус и определен минимальный размер сегмента, способного к каллусогенезу. Не достигнув положительных результатов, эти исследователи высказали ряд идей и гипотез, которые подтвердились значительно позже. Так, Г. Хаберландт выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой растительной клетки, т. е. способности клеток реализовывать свой потенциал развития и давать начало образованию целого растения при определенных условиях культивирования.

Э т а п № 2 (1902-1922 гг.) ознаменовался созданием первых питательных сред для культивирования тканей животных. Эти среды были природного происхождения и содержали, как правило, плазму крови и зародышевую жидкость. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах, содержащих растительные экстракты, оказались неудачными, так как в экспериментах использовались мало подходящие для проявления ростовой активности клетки и ткани высших растений.

Э т а п №3 (1922-1932 гг.). В этот период независимо друг от друга американский ученый В. Робинс и немецкий ученый В. Котте показали возможность культивирования на твердых питательных средах меристемы кончиков корня томатов и кукурузы. Однако через определенное время растительные ткани бурели и погибали. Подлинное развитие метода культуры тканей растений началось с 1932 г.

Э т а п № 4 (1932-1940 гг.) связан с именем французского ученого Р. Готре, который показал возможность долгого культивирования в условиях *in vitro* растительных тканей за счет периодического пересаживания их на свежую питательную среду. Это открытие дало новый толчок в работе по культуре ткани, который ознаменовался нарастающим числом новых объектов, успешно введенных в культуру.

Э т а п № 5 (1940-1960 гг.). С открытием в 1955 г. нового класса фитогормонов-цитокининов, и в частности кинетина, была получена возможность стимулировать деление клеток кусочка ткани сердцевинной паренхимы табака, лишенной проводящих пучков и камбия.

В зависимости от концентрации и соотношения стимуляторов роста можно было усиливать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез. В этот период было оценено положительное действие натуральных экстрактов типа эндосперма кокосового ореха, каштана, кукурузы и других растений для поддержания неорганизованного клеточного роста и стимуляции процессов морфогенеза в культуре каллусных тканей и клеточных суспензий.

Э т а п № 6 (1960-1975 гг.). Наиболее важным событием этого периода была разработка профессором Ноттингемского университета Э.К. Коккингемом метода получения ферментативным путем изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивирования их в контролируемых условиях. Позже в 1970 г. в той же лаборатории С. Пауэром и сотрудниками было осуществлено искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию соматических гибридов. В этот же период разработан метод клонального микроразмножения растений в условиях *in vitro* с использованием меристемной культуры. Основоположником данного направления был французский ученый Ж. Морель, который получил оздоровленный посадочный материал орхидей и картофеля.

Э т а п № 7 (1975 г.- по настоящее время). Продолжается быстрое развитие техники *in vitro*, изучение биологии культивируемых объектов,

разрабатываются методы электрослияния изолированных протопластов, методы мутагенеза и клеточной селекции, методы получения гаплоидных растений, совершенствуется метод глубинного культивирования клеток с использованием изолированных протопластов и векторов, созданных на основе Ti- и Ri-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и *A. rhizogenes*. При помощи методов генной инженерии разработан эффективный метод переноса генов для двудольных растений. Таким образом, за последние десятилетия был сделан большой шаг вперед в развитии технических приемов работы с изолированными тканями и клетками растений. Однако объектом исследования, как правило, служили одно- и двудольные травянистые растения и в редких случаях - древесные.

#### **1.4. Культура *in vitro* и культивирование изолированных клеток и тканей высших растений**

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

Стерилизацию экспланта и семян проводят, выдерживая их 5-20 мин в стерилизующих растворах с последующей многократной промывкой экспланта стерильной водой. Время стерилизации зависит от характера

экспланта и от стерилизующей активности раствора. Семена стерилизуют 10-20 мин, а вегетативные части 5-10 мин.

Органы растений, из которых берут эксплант для введения в культуру, предварительно моют щеткой в мыльном растворе и споласкивают дистиллированной водой, а затем погружают на несколько секунд в 70 %-й этанол. Семена погружают в спирт на 1-2 мин. Кроме собственно стерилизующего действия спирта обработка тканей этанолом перед помещением в основной стерилизующий раствор повышает стерилизующий эффект последнего.

После стерилизации растительные объекты должны быть тщательно промыты стерильной водой.

Поверхностная стерилизация освобождает эксплант только от наружной инфекции. Если же ткани экспланта имеют внутреннюю инфекцию, то его необходимо обработать антибиотиками. Особенно богаты внутренней инфекцией ткани тропических и субтропических растений с крупными сосудами. Загрязнение культур грибами или бактериями обычно выявляется через 1-14 дней после посадки. Загрязненные культуры необходимо тотчас же удалить, чтобы избежать заражения воздуха в световой комнате.

Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 120°C и давлении 0,75-1 атм в течение 20 мин. Если в состав питательной среды входят вещества, разрушающиеся при высокой температуре, их подвергают холодной стерилизации, пропуская через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22-0,45 мкм, после чего добавляют в проавтоклавированную охлажденную до 40 °С основную среду.

*Питательные среды* для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы (азот, фосфор, калий, кальций, магний, серу, железо) и микроэлементы (бор, марганец, цинк, медь, молибден и др.), а также витамины, углеводы, фитогормоны или их синтетические аналоги. Некоторые питательные среды содержат гидролизат казеина, аминокислоты. Кроме того, в состав

питательных сред входит ЭДТА (этилендиамин-тетрауксусная кислота) или ее натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток.

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

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

Фитогормоны необходимы для дедифференцировки клеток и для индукции клеточных делений. Поэтому для получения каллусных тканей в состав питательных сред должны обязательно входить ауксины, вызывающие клеточную дедифференцировку, и цитокинины, индуцирующие деление клеток. В случае индукции стеблевого морфогенеза содержание ауксинов в среде может быть снижено или они могут быть полностью исключены из питательной среды.

### **1.5. Условия культивирования изолированных органов, тканей клеток и протопластов на искусственных питательных средах**

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

Детерминированные к морфогенезу ткани переносят на свет и далее



культивируют их при освещенности 1000-4000 лк.

Культивирование изолированных меристем и их микроразмножение также происходит на свету. Освещенность факторостатной (световой) комнаты должна составлять в зависимости от культуры 3000-10 000 лк. Необходимо учитывать фотопериод, который требуется для данного культивируемого объекта. Влажность в световой комнате должна составлять 60-70 %. Более сухой воздух способствует усыханию питательной среды в пробирках и колбах, если они закрыты ватными пробками, изменению ее концентрации и нарушению условий культивирования. Для повышения влажности в комнате можно использовать поддоны с водой.

Оптимальная температура для большинства культивируемых тканей 25-26 °С, для культуры тканей тропических растений она может достигать 29-30 °С. В случае индукции морфогенеза температуру понижают до 18-20 °С.

Наилучшие световой и температурный режимы, а также режим оптимальной влажности можно создать при помощи климатических камер.

## **2. КУЛЬТУРА КАЛЛУСНЫХ ТКАНЕЙ**

### **2.1. Общие положения**

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

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

вносят антиоксиданты.

Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции: 1) рыхлой, состоящей из сильно оводненных клеток, легко распадающейся на отдельные мелкие агрегаты; 2) средней плотности с хорошо выраженными меристематическими очагами; 3) плотной, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие в питательной среде представителей двух групп фитогормонов: ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению, а цитокинины - пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток.

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

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

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

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к де-

дифференцировке и активным клеточным делениям обусловлен изменением активности генов (эпигеномной изменчивостью). Активирование одних генов и репрессирование других приводит к изменению в белковом составе клеток. В каллусных клетках появляются специфические белки и одновременно исчезают или уменьшаются в количестве белки, характерные для фотосинтезирующих клеток листа. У двудольных растений процесс репрессии и дерепрессии генов, лежащий в основе дедифференцировки, происходит легче, чем у однодольных.

## **2.2. Особенности каллусных клеток**

Каллусные метки *in vitro* сохраняют многие физиолого-биохимические свойства, присущие нормальным клеткам, входящим в состав растительного организма. Каллусные клетки сохраняют способность к синтезу вторичных метаболитов. Морозостойкость и способность к закаливанию присущи каллусным клеткам, полученным от морозостойких растений. Этим свойством не обладают каллусные ткани, полученные от тропических и субтропических культур. Таким образом, устойчивость к низким температурам сохраняется при переходе клетки к каллусному росту. Каллусным тканям свойственна и фотопериодическая реакция, что связано с сохранением активности фитохрома.

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

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

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

Особенностью каллусных клеток является гетерогенность по возрасту. Значительные отличия наблюдаются в энергетическом обмене каллусных клеток. Они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными.

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

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

### **2.3. Генетика каллусных клеток**

Длительное время считали, что каллусные клетки генетически строго однородны. Однако в 60-х годах было выяснено, что клетки каллусной ткани обладают выраженной генетической гетерогенностью. Генетическая неоднородность каллусных клеток выражается прежде всего в различной плоидности, т. е. каллусные клетки отличаются по числу хромосом. Генетически стабильными *in vitro* являются меристематические ткани.

В каллусных и суспензионных культурах встречаются клетки, имеющие диплоидный набор хромосом, свойственный исходному растению, а также полиплоидные клетки, содержащие 3, 4, 5 и более хромосомных наборов. Наряду с полиплоидией в культуре каллусных тканей можно нередко наблюдать анеуплоидию (возрастание или уменьшение хромосомного набора на несколько хромосом). Чем дольше культивировать каллусные клетки, тем больше они различаются по плоидности. В каллусных клетках табака через четыре года культивирования совсем не остается диплоидных клеток: все клетки становятся полиплоидными или анеуплоидными. Этот факт указывает на то, что изменение плоидности происходит под влиянием условий культивирования и прежде всего входящих в состав питательной среды веществ. Однако можно интерпретировать его и иначе. Полиплоидные клетки

имеют меньшую лаг-фазу и поэтому быстрее переходят к делениям, чем диплоидные. Вследствие этого они и получают преимущество в дальнейших пассажах. Скорее всего влияние оказывают обе причины.

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

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

способствуют полиплоидизации клеток.

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

#### **2.4. Гормонезависимые растительные ткани**

Каллусные клетки могут делиться только при наличии гормонов в питательной среде. Однако при длительном культивировании они в ряде случаев могут приобрести способность расти на среде без гормонов, т. е. становятся автономными по отношению к ауксинам и цитокининам. Такие клетки называются «привыкшими». Нередко ткани, образованные «привыкшими» клетками, называют химическими опухолями. «Привыкшие» ткани, как и опухолевые, в большинстве случаев не способны к нормальной регенерации и образуют лишь тератомы, хотя по некоторым данным из них в отдельных случаях получают нормальные регенеранты.

Следует отметить, что у всех каллусных тканей в процессе культивирования, у некоторых культур уже начиная с 4-го пассажа, заметно снижается, а затем и полностью утрачивается способность к регенерации. Из старых пересадочных культур получить растения-регенеранты не удается.

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

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

вызываемое *A. rhizogenes*) и стеблевой галл, вызываемый *A. ruby*, сходный с корончатым галлом.

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

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

Внешне гормонезависимые ткани не отличаются от каллусных, и основным их отличием является приобретение способности к интенсивному синтезу гормонов. Это свойство является общим как для «привыкших», так и для опухолевых клеток. Однако пути для решения этой задачи у них различны. У «привыкших» тканей гормонезависимость достигается в результате изменения активности генов, отвечающих за синтез ферментных белков, участвующих в построении молекул гормонов, следовательно, отвечающих за синтез гормонов. Таким образом, изменения в данном случае имеют эпигеномный характер, хотя нельзя исключить и возможность мутаций. Для того чтобы ответить на вопрос, являются ли изменения в «привыкших» клетках эпигеномными или генетическими, можно проверить, сохраняется ли свойство гормонезависимости в ряду: клетка - растение - клетка. С этой целью необходимо получить регенерацию в «привыкшей» ткани, а затем эксплант от регенерировавшего растения поместить на питательную среду без гормонов или без одного из гормонов. Если в такой среде клетки будут делиться, т. е. окажутся автономными по отношению к гормонам, то это означает, что свойство гормонезависимости передается по наследству следующим поколениям, следовательно, оно имеет генетическое происхождение. Если же на безгормональной среде клетки делиться не будут и каллусной ткани не образуют, т. е. гормонезависимость не наследуется,

то это позволяет сделать вывод об эпигеномном характере изменений. Проведенные эксперименты говорят в пользу эпигеномного характера гормоннезависимости в «привыкших» тканях. Однако таким путем можно проверить только те «привыкшие» клетки, которые не утратили способность к регенерации. В то же время подавляющее большинство «привыкших» клеток теряет способность к регенерации, что затрудняет использование предложенного метода для определения характера природы гормоннезависимости.

## **2.5. Культура клеточных суспензий**

Суспензию клеток можно получить из каллуса, поместив его в жидкую питательную среду с автоматическим перемешиванием. Используя фермент, например пектиназу, получаем суспензионную культуру непосредственно из ткани экспланта (лист, стебель, корень и т.д.). Вначале на поверхности экспланта образуется каллусная ткань, а затем уже от нее отделяются клетки и клеточные агрегаты, в результате чего получается клеточная суспензия. Для получения 100 мл клеточной суспензии необходимо 2-3 г свежей каллусной ткани.

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

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

Суспензии лучше образуются из рыхлого каллуса, получаемого на средах с 2,4-Д. Исключение из питательной среды ионов кальция облегчает суспендирование. Еще более облегчает этот процесс добавление в среду



фермента пектиназы, который разрушает пектат кальция, склеивающий отдельные клетки. Клеточные суспензии в биотехнологии используют для получения вторичных метаболитов, многие из которых являются ценными лекарственными препаратами, для промышленного выращивания клеточной биомассы и для клеточной селекции. Наряду с этим суспензии клеток можно применять в качестве исходного материала для получения изолированных протопластов.

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

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

Качество суспензии зависит от степени агрегированности ее клеток. Агрегаты не должны содержать более 10-12 клеток. Поэтому, чтобы избавиться от крупных агрегатов, суспензии фильтруют через марлевые, нейлоновые или металлические фильтры. Одновременно это позволяет освободиться от остатков экспланта или плотных кусков каллусной ткани.

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

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

## **2.6. Культура одиночных клеток**

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

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

Выделяют одиночные клетки из клеточных суспензий, из тканей растений, например из мезофилла листа после его мацерации ферментами, из культуры изолированных протопластов после восстановления клеточной стенки.

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

Трудности культивирования одиночных клеток связаны с тем, что отдельная клетка не делится в тех условиях, в которых хорошо растет

калусная ткань. Для того чтобы заставить одиночные клетки делиться, разработаны специальные методы. В 1960 г. Джонсон предложил метод «няньки», при котором функцию «няньки», стимулирующей деление одиночной клетки, выполняют кусочки калусной ткани, отделенные от нее фильтровальной бумагой. В присутствии «няньки» одиночная клетка делится и дает индивидуальную колонию клеток - клон.

## **2.7. Морфогенез в калусных тканях**

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

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

В культуре калусных тканей морфогенезом называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток. Существует два основных типа морфогенеза. В культуре тканей он может проявляться в виде органогенеза (образования монополярной структуры, т. е. отдельных органов): корневого, стеблевого, реже флорального (цветочного) или листового, а также в виде соматического эмбриогенеза (образования биполярных зародышеподобных структур из соматических клеток). В случае

органогенеза сначала регенерируют отдельные органы, а затем уже из них - целые растения, исключение составляет корневой органогенез.

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

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

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

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

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

калусной клетки.

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

Переход к морфогенезу в культуре каллусных тканей сопровождается значительными изменениями дыхательного метаболизма. В целом дыхание (по  $\text{CO}_2$ ) усиливается, но изменяется его характер в направлении интенсификации пентозофосфатного пути. Возрастает активность дыхательных ферментов. Вслед за биохимической наступает структурная реорганизация клетки. Биохимическая дифференцировка клетки всегда предшествует структурной. В клетках, вступивших на путь морфогенеза, возрастает число рибосом, митохондрий, меняется их внутренняя структура. Процессы морфогенеза в каллусных клетках происходят асинхронно и продолжительно. Одновременно в каллусной ткани могут иметься как полностью сформированные структуры, так и клетки, только что вступившие на этот путь.

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

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

Все изменения, происходящие при морфогенезе и заканчивающиеся регерацией из каллусной клетки растения, управляются (контролируются) специальными генами. В настоящее время одни ученые считают, что признак морфогенеза полигенен и контролируется несколькими хромосомами, другие

пришли к заключению, что этот признак определяется двумя ядерными генами. Тот факт, что морфогенетическая активность каллусных клеток имеет генетическую природу, объясняет, почему не удается в ряде случаев получить регенерацию из каллусной ткани тех или иных генотипов. Регенерационную способность может увеличить скрещивание генотипов, морфогенетически активных *in vitro*.

## **2.8. Факторы, влияющие на морфогенез каллусной ткани**

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

Способность каллусных клеток к формированию монополярных и/или биполярных структур главным образом зависит от видовых и сортовых особенностей исследуемых генотипов, для которых принципиально важно учитывать принадлежность его к одно- или двудольным растениям, а также тип первичного экспланта.

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

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

культурах.

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

Из трофических факторов особое внимание необходимо уделять минеральным солям, содержащим азот в нитратной или аммонийной форме. Присутствие в питательной среде  $\text{NH}_4$  необходимо для начала морфогенеза, тогда как для роста и развития дифференцированных морфогенных структур предпочтение по концентрации отдается  $\text{NO}_3^-$ .

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

## **2.9. Культура каллусных клеток в получении веществ вторичного синтеза**

Существующие методы субкультивирования изолированных клеток в условиях *in vitro*, позволяют использовать их как для фундаментальных исследований, так и для практического применения. Особый интерес представляет способность изолированных клеток, тканей и органов синтезировать вещества вторичного метаболизма, которые широко используются в медицине, защите растений, ветеринарии, кормопроизводстве, пищевой промышленности, парфюмерии и др. Такой интерес исследователей к этому направлению работ неслучаен, так как клеточная биотехнология для получения физиологически активных веществ имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием традиционного растительного сырья: 1) получение

биомассы клеток не зависит от сезона, климатических и почвенных условий; 2) возможность оптимизировать условия культивирования суспензии клеток, позволяющих синтезировать в необходимом количестве нужные вещества; 3) автоматизация процесса.

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

Экспериментально доказано, что прирост клеточной биомассы в условиях *in vitro* и *in vivo* может проходить с разной скоростью. Важной характеристикой клеток популяции является ее стабильность в отношении синтеза, транспорта и депонирования метаболитов. Стабильность может сохраняться в течение всего времени существования популяции, медленно снижаться за счет постепенного увеличения числа клеток со сниженным синтезом метаболитов и быть нестабильной в случае быстрой потери способности клеток синтезировать вторичные метаболиты.

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



метаболитов.

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

### **3. КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ И ОЗДОРОВЛЕНИЕ РАСТЕНИЙ**

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения - клонального микроразмножения (получение в условиях *in vitro* (в пробирке), неполовым путем растений, генетически идентичных к исходному экземпляру). В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, т. е. под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму. Этот метод, несомненно, имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- ▲ получение генетически однородного посадочного материала;
- ▲ освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
- ▲ высокий коэффициент размножения ( $10^5$ - $10^6$  - для травянистых, цветочных растений,  $10^4$  - $10^5$  - для кустарниковых древесных,  $10^4$  - для

хвойных);

- ▲ сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ▲ ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- ▲ размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- ▲ возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- ▲ возможность автоматизации процесса выращивания.

### **3.1. Этапы и методы клонального микроразмножения растений**

Процесс клонального микроразмножения можно разделить на четыре этапа:

- 1) выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- 2) собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества мери-клонов;
- 3) укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+2°, + 10 °С); 4) выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Существует много методов клонального микроразмножения. Различные авторы, проводя индивидуальные исследования по влиянию условий культивирования эксплантов на процессы морфогенеза, наблюдали разные ответные морфогенетические реакции на изменение условий выращивания, что в свою очередь привело к созданию новых классификаций методов клонального микроразмножения. Исходя из предложенных в литературе методов микроразмножения растений, этот процесс возможно осуществлять следующими путями:

- ▲ активация развития уже существующих в растении меристем (апекс-

стебля, пазушные и спящие почки и интеркамерные зоны стебля);

▲ индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;

▲ индукция соматического эмбриогенеза;

▲ дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной тканях.

Основной метод, используемый при клональном микроразмножении растений, - активация развития уже существующих в расении меристем, основывающийся на снятии апикального доминирования. Это может быть достигнуто двумя путями: а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде; б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов.

Второй метод - это индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта. Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и таким образом регенерировать целые растения. Образования адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий), если их удастся получить свободными от инфекции. Этот процесс, как правило, происходит на питательных средах, содержащих один цитокинин или в сочетании с ауксином, находящихся в соотношении 10 : 1 или 100 : 1.

Третий метод, практикуемый при клональном микроразмножении, основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему внешнему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название - соматический эмбриогенез. Основное отличие образования зародышей *in vitro* от *in vivo* (в естественных условиях) заключается в том, что соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по своему внешнему

виду напоминают биополярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апикальных меристем стебля и корня.

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

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

ткани, а вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. К таким растениям можно отнести амариллис, томаты, спаржу, некоторые древесные породы и другие культуры. Через каллусную культуру были размножены сахарная свекла, некоторые представители рода *Brassica*, кукуруза, рис, пшеница и другие злаковые, подсолнечник, лен, разработаны условия, способствующие регенерации растений из каллуса огурца, картофеля, томатов.

### **3.2. Оздоровление посадочного материала от вирусов**

Основное преимущество клонального микроразмножения - это получение генетически однородного, безвирусного посадочного материала. Этого возможно достичь, используя меристемные ткани апексов и пазушных почек органов стеблевого происхождения. Как правило, меристема состоит из конуса нарастания, а также одного или двух листовых зачатков (примордиев) и является свободной от инфекции.

Структурной основой используемого на практике явления служит специфика строения точки роста растений; дистальная ее часть, представленная апикальной меристемой, у разных растений имеет средний диаметр до 200 мкм и высоту от 20 до 150 мкм. В более нижних слоях дифференцирующиеся клетки меристемы образуют прокамбий, дающий начало пучкам проводящей системы. Известно, что успех клонального микроразмножения зависит от размера меристематического экспланта, чем больше листовых зачатков и тканей стебля, тем легче идет процесс морфогенеза, заканчивающийся получением целого, нормального пробирочного растения. Вместе с тем зона, свободная от вирусных частиц, очень различна для разных вирусов. Это зависит также от вида и сорта растения. В колеоптиле злаков, например, размеры участка верхушки, не содержащей сосуда, могут достигать до 250 мкм. Такая особенность строения апикальной меристемы исключает проникновение в нее вируса путем быстрого транспортирования по проводящей системе, но допускает возмож-

ность медленного распространения через плазмодезмы, соединяющие меристематические клетки.

Применение электронной микроскопии часто обнаруживает наличие вирусов в меристеме пораженных ими растений, это, впрочем, подтверждает общеизвестный факт, что число лишенных вируса растений после подобной операции чрезвычайно мало, и многие меристемы пораженных растений инфекционны.

Таким образом, эффективность применения апикальной меристемы в качестве метода оздоровления зараженных вирусами растений оказывается низкой.

Практически возможно получение безвирусной апикальной меристемы от больного растения, но при этом риск попадания вирусов в здоровые ткани должен быть снижен до нуля. Это может быть достигнуто путем применения предварительной термотерапии исходных растений или хемотерапии.

Метод термотерапии применяется как в условиях *in vivo*, так и *in vitro* и предусматривает использование сухого горячего воздуха. Для объяснения механизма освобождения растений от вирусов в процессе термотерапии существуют различные гипотезы. Согласно одной из них, высокие температуры воздействуют непосредственно на вирусные частицы через их рибонуклеиновую кислоту и белковую оболочку, вызывая физическое разрушение и лишая вирусные частицы инфекционности. Вторая гипотеза состоит в том, что высокая температура действует на вирусы через метаболизм растений. Под влиянием высоких температур нарушается равновесие между синтезом и деградацией вирусных частиц. Если преобладает синтез, то концентрация вируса в зараженных тканях растет, и наоборот.

Продолжительность термотерапии всецело зависит от состава вирусов и их термостойкости. Если, например, для гвоздики достаточно 10-12-ти недельного воздействия теплом, то для освобождения хризантемы от Б-вируса этот период длится 12 недель и более. Однако существуют растения, например луковичные культуры, цимбидиум, розы и другие, рост которых

угнетается в результате длительной термотерапии *in vivo*. Для таких растений целесообразно проводить термотерапию растений-регенерантов *in vitro*.

Помимо положительного действия термотерапии на освобождение растений от вирусов выявлен положительный эффект высоких температур на точку роста и процессы морфогенеза некоторых цветочных культур (гвоздики, хризантемы, фрезии) в условиях *in vitro*. Применение термотерапии позволяет увеличить коэффициент размножения на 50-60 %, повысить адаптацию пробирочных растений-регенерантов к почвенным условиям, а также получить более высокий процент безвирусных маточных растений.

Применение термотерапии в сочетании с меристемной культурой позволяет оздоровить более 70 % растений-регенерантов хмеля от вирусного хлороза, 90 % растений земляники, 25 % - черной и красной смородины, 50 % - малины, более 80 % - картофеля. Проверку растений на наличие вирусов, как правило, проводят при помощи иммуноферментного анализа, электронной микроскопии и травянистых растений-индикаторов.

*Другой способ*, применяемый для освобождения растений от вирусов, - хемотерапия. Он заключается в добавлении в питательную среду, на которой культивируют апикальные меристемы, аналога гуанозина - вирозол в концентрации 20—50 мг/л. Это противовирусный препарат широкого спектра действия. При использовании вирозола в культуральной среде процент безвирусных меристемных растений для ряда обычных для этих растений вирусов увеличивался до 80-100 % при 0-41 % в контроле. Положительные результаты хемотерапии были получены для сливы, черешни, малины, некоторых цветочных и других растений. Термо- и хемотерапевтические методы оздоровления посадочного материала от вирусов экономически малоэффективны. Поэтому в настоящее время с помощью методов трансгеноза создаются формы растений с генетической устойчивостью к вирусам.

### **3.3. Техника культивирования растительных тканей на разных этапах клонального микроразмножения**

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

**Э т а п №1.** На этом этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Это осуществляется путем стерилизации растительных тканей ртутьсодержащими растворами (сулема, или диацид, 0,1-0,2%-я) или хлорсодержащими (хлорамин 10-15 %-й, гипохлорит натрия или кальция 5-10 %-й).

На первом этапе, как правило, используют различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. В случае, когда наблюдается ингибирование роста первичного экспланта за счет выделения им в питательную среду токсичных веществ (фенолов, терпенов и других вторичных соединений), усилить его рост можно, используя антиоксиданты. В качестве антиоксидантов используют: аскорбиновую кислоту (1-60 мг/л), глутатион (4-5 мг/л), дитиотриэтол (1-3 мг/л), диэтилдитиокарбамат (2-5 мг/л), поливинилпирролидон (5000-10 000 мг/л).

**Э т а п №2** - собственно микроразмножение. На этом этапе необходимо добиться получения максимального количества мериклонов, учитывая при этом, что с увеличением субкультивирований увеличивается число растений-регенерантов с неправильной морфологией и возможно образование растений-мутантов. Как и на первом этапе, используют питательную среду содержащую различные биологически активные вещества, а также регуляторы роста. Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. При долгом культивировании растительных тканей на питательных средах с повышенным содержанием цитокининов (5-10 мг/л) происходит постепенное накопление их в тканях выше необходимого физиологического уровня, что приводит к появлению



токсического действия и формированию растений с измененной морфологией.

Вместе с тем возможно наблюдать такие нежелательные для клонального микроразмножения эффекты, как подавление пролиферации пазушных меристем, образование витрифицированных (оводненных) побегов и уменьшение способности растений к укоренению.

Э т а п ы № 3 - 4 - укоренение микропобегов, их последующая адаптация к почвенным условиям и высадка в поле являются наиболее трудоемкими этапами, от которых зависит успех клонального микроразмножения. На третьем этапе, как правило, меняют основной состав среды: уменьшают в два, а иногда и в четыре раза концентрацию минеральных солей и полностью исключают цитокинины, оставляя один лишь ауксин. Укоренение микропобегов проводят двумя способами:

- 1) выдерживание микропобегов в течение нескольких часов (2-24 ч) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20-50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка);
- 2) непосредственное культивирование микропобегов в течение 3-4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1-5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта).

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

Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений - весна или

начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб

### **3.4. Оптимизация условий клонального микроразмножения растений**

Важнейшее условие успешного культивирования изолированных клеток и тканей - сбалансированность питательных сред по минеральным солям, углеводам, фитогормонам и т. д. При введении в культуру нового вида растений исследователи нередко испытывают большое число сред. Этот процесс длителен и часто не приносит должного результата. Для определения оптимального состава питательной среды применяют методы математического планирования эксперимента, позволяющие быстро при небольшом объеме экспериментов определить условия культивирования, обеспечивающие высокую скорость размножения, изучить зависимость микроразмножения от совокупности факторов, действующих на процесс, а также установить наличие и оценить эффективность межфакторных взаимодействий. В зависимости от поставленной цели эксперименты проводят по полному или дробному плану первого или второго порядка.

Успех оптимизации зависит от того, насколько правильно выбран критерий оптимизации. На первом этапе микроразмножения критерием может служить количественная оценка любой морфогенетической реакции экспланта, ведущей в дальнейшем к формированию целого растительного организма. Например, высота побега, число дифференцирующихся стеблевых апексов, побегов, эмбриоидов. На втором этапе учитывается общее число развившихся побегов, эмбриоидов, которое должно отражать эффективность размножения. Критерием оптимизации третьего этапа может служить процент укорененных растений, длина корневой системы, число корней на один микропобег. При этом также необходимо учитывать высоту и общее состояние растения и приживаемость его при пересадке в почву.

Математическое планирование необходимо начинать с выбора факторов, действующих на изучаемый процесс ( $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_3$ ,... и т. д.), их

предельных значений (верхний и нижний уровни) и схемы эксперимента (матрицы). После чего отбирают экспланты, используемые в эксперименте. При этом необходимо учитывать неоднородность исходного растительного материала и гетерогенность культивируемых тканей. Поэтому растительный материал необходимо равномерно распределять между разными вариантами эксперимента. Оптимальные условия культивирования должны обеспечить удовлетворительный рост всех эксплантов.

Обработку результатов многофакторных экспериментов проводят статистически, и для получения уравнений регрессии рассчитывают следующие показатели: 1) коэффициент регрессии свободного члена; 2) коэффициенты регрессии изучаемых факторов; 3) коэффициенты регрессии межфакторных взаимодействий; 4) построчные дисперсии; 5) значение критерия Кохрена; 6) адекватность результатов.

### **3.5. Влияние генетических, физиологических, гормональных и физических факторов на микроразмножение растений**

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

Генетические и физиологические факторы. Из факторов, определяющих успех клонального микроразмножения, наибольшее значение

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

Существенное влияние на реализацию морфогенетического потенциала в процессе микроразмножения оказывают сортовая и родовая специфика исходного экспланта. Известно, что виды растений, хорошо размножающихся вегетативно, обычно проявляют высокую регенерационную способность в культуре *in vitro*. Генотип материнского растения значительно влияет на ход клонального микроразмножения. В пределах вида некоторые генотипы размножаются легче, чем другие.

Зависимость морфогенетического потенциала от родовой специфики растений была обнаружена на злаковых травах, таких, как ежа сборная, житняк гребенчатый, овсяница луговая и бороздчатая, колосняки гигантский, узколистный, мягкий, пырейник ситниковый. В результате экспериментов были отмечены различные потребности в макро- и микроэлементах, органических компонентах (аминокислот, гидролизата казеина, дрожжевого экстракта, биотина), регуляторах роста. Установлено, что гибриды обладают более высокой морфогенетической активностью, чем исходные родительские формы.

Сортовая специфика может проявляться и при укоренении микропобегов. Для разных сортов черной смородины наблюдается достоверное различие в корнеобразовательной способности изолированных верхушек побегов.

Физиологический возраст исходного экспланта имеет несомненное значение в проявлении способности к морфогенезу. Зрелые зародыши, 20-30-дневные проростки или различные их части (ювенильный материал) обладают высокими морфогенетическими потенциями по сравнению с тканями взрослых растений и способны образовывать в большом количестве адвентивные почки, стимулировать развитие пазушных меристем, которые в дальнейшем формируют хорошо растущие побеги, способные к укоренению.

Возраст первичного экспланта оказывает существенное влияние и на укоренение микропобегов, размноженных *in vitro*. С увеличением возраста исходного материала, как правило, снижается способность побегов и черенков к укоренению.

К физиологическим факторам также относится и время (сезонность) изоляции экспланта. Ткани и органы, изолированные в момент вегетации растений, обладают более высокой чувствительностью к составу питательной среды и способны с высокой частотой образовывать адвентивные почки, формировать побеги и укореняться, чем ткани, изолированные в период глубокого и вынужденного покоя. В то время как летняя изоляция апексов стимулировала более интенсивную пролиферацию каллуса, но при этом уменьшался процент регенерации побегов.

Размер экспланта является еще одним фактором, определяющим успех микроразмножения. Чем меньше эксплант, тем меньшей регенерационной способностью он обладает, и наоборот. Экспланты большего размера, состоящие из паренхимы, проводящей ткани и камбия, могут независимо от соотношения фитогормонов в питательной среде спонтанно образовывать почки. С другой стороны, в крупном экспланте увеличивается возможность появления в его клетках вирусов и других патогенов, что препятствует оздоровлению размноженных в культуре тканей растений. Оптимальная величина экспланта зависит от видовых особенностей растения-донора и свойств органа, служащего источником первичного экспланта. Так, для малины был установлен размер первичного экспланта 2 мм, при котором 60

% апикальных верхушек растения регенерировали на среде Мореля. Для хмеля этот показатель колеблется от 0,1 до 0,2 мм, а для лука и чеснока оптимальный размер меристемы составляет 0,5-0,8 мм.

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

**Гормональные факторы.** Немаловажный фактор, влияющий на успех клонального микроразмножения, - гормональный баланс питательной среды. При высоком соотношении гормонов (цитокинин - ауксин) происходит развитие пазушных меристем или образование адвентивных почек, при низком - индуцируется корнеобразование, а при среднем - наблюдается образование и пролиферация каллуса

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

На клональное микроразмножение наряду с гормонами влияют *минеральные соли, витамины и углеводы*. При микроразмножении растений *in vitro* часто используют среды, отличающиеся друг от друга соотношением аммонийного и нитратного азота. Использование сред, обогащенных азотом, не только ведет к неорганизованному росту каллусной ткани, но и стимулирует процессы органогенеза и особенно соматического эмбриогенеза.

Например,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  влияет на морфогенетический потенциал зародышей разных видов *Brassica*. Процент выживания зародышей и частота образования побегов увеличиваются при уменьшении концентрации  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  в среде, а максимальное число побегов на зародышах формируется в случае полного исключения  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  из среды. Для томатов экспериментально было установлено, что среды с повышенным содержанием минерального азота ингибируют пролиферацию каллуса и приводят к гибели эксплантов. Для глоксинии была отмечена зависимость образования вегетативных или репродуктивных структур от концентрации компонентов питательной среды.

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

На всех этапах клонального микроразмножения в качестве источника углеродного питания используют 3 %-ю сахарозу. Однако эта концентрация не является оптимальной для всех вводимых в культуру *in vitro* растений. Так, экспериментально доказано, что сахароза является фактором, способным направить развитие побегов каперса *in vitro*, и что можно получать либо вегетирующие побеги, либо пурпурные почки возобновления. При культивировании апикальных и боковых почек на среде, содержащей сахарозу в концентрации 3 % и более, наблюдается появление антоциановой окраски почек, что является первым признаком перехода почек в состояние

зимнего покоя.

Помимо сахарозы в качестве источника углеродного питания возможно использовать глюкозу, фруктозу, галактозу и др. Известно, что после сахарозы наиболее часто применяемым источником углеродного питания для культивирования *in vitro* тканей растений является глюкоза. На третьем месте по эффективности использования культурами тканей растений находится фруктоза. Галактоза заметно отличается от глюкозы и фруктозы по действию на рост изолированных тканей растений. Более половины изученных культур слабо или почти не используют галактозу для роста. Однако есть данные, отмечающие положительную роль галактозы для культивирования тканей и органов растений.

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

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

На клональное микроразмножение и рост растений также влияет и



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

Как правило, ткани и органы растений культивируют на питательной среде с рН 5,6-5,8. Однако эти условия не всегда могут быть оптимальными. Например, для культуры зародышей сосны обыкновенной было показано, что изменение кислотности питательной среды от 4,7 до 5,2 позволяет увеличить в 2,5-3,0 раза способность зародышей образовывать адвентивные почки, а для культуры ели обыкновенной наиболее благоприятный рН среды находился в пределах 5,2-5,6. Эти данные полностью совпадают с кислотностью почвы, на которых успешно произрастают данные породы в естественных условиях. Поэтому биотехнологи должны учитывать в экспериментах по культуре ткани кислотность почв естественного произрастания исследуемых растений.

Температура оказывает значительное влияние на рост и регенерацию изолированных тканей растений, способствуя активации метаболических процессов. Для большинства растительных тканей температурный оптимум составляет 23-25 °С. Однако существуют различия между растениями в отношении их требований к температуре.

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

Таким образом, для повышения коэффициента размножения растений необходимо каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания

подбирать индивидуальные условия культивирования.

Следовательно, клональное микроразмножение является новым перспективным способом вегетативного размножения растений, позволяющим получать генетически однородный, оздоровленный посадочный материал, иметь высокий коэффициент размножения, сокращать селекционный процесс, проводить работы в течение круглого года, экономя при этом площади, необходимые для выращивания растений.

#### **4. КУЛЬТУРА ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ В СЕЛЕКЦИИ РАСТЕНИЙ**

Одно из направлений клеточных технологий - это использование их в селекции, которое облегчает и ускоряет традиционный селекционный процесс в создании новых форм и сортов растений. Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей *in vitro* условно можно разделить на две группы.

Первая группа - это вспомогательные технологии, которые не подменяют обычную селекцию, а служат ей. К ним можно отнести: оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости), культивирование семяпочек и незрелых гибридных зародышей (преодоление постгамной несовместимости), получение гаплоидов путем культивирования пыльников и микроспор, криосохранение изолированных клеток, тканей и органов, клональное микроразмножение отдаленных гибридов.

Вторая группа методов ведет к самостоятельному, независимому от традиционных методов селекции, получению новых форм и сортов растений: клеточная селекция с использованием каллусной ткани, соматическая гибридизация (слияние изолированных протопластов и получение неполовых гибридов), применение методов генной инженерии.

#### 4.1. Вспомогательное использование методов *in vitro* в селекции растений

В отдаленной гибридизации находят применение такие методы культуры изолированных тканей, как оплодотворение *in vitro*, эмбриокультура (выращивание изолированных зародышей на искусственных питательных средах), клональное микроразмножение ценных гибридов, а также получение гаплоидов *in vitro* и криосохранение.

Оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости) проводится в том случае, когда невозможно осуществить оплодотворение между выбранными парами в естественных условиях. Это вызвано несколькими причинами: 1) физиологические (несоответствие во времени созревания пыльцы и т.д.); 2) морфологические (короткая пыльцевая трубка или блокирование ее роста на разных этапах развития и т. д.). Оплодотворение *in vitro* можно осуществить двумя способами: а) культивирование на искусственной агаризованной питательной среде завязи с нанесенной на нее готовой пыльцой; б) завязь вскрывается, и на питательную среду переносятся кусочки плаценты с семязпочками, вблизи которых или непосредственно на ткани плаценты культивируется готовая пыльца. Визуально определить, прошло оплодотворение *in vitro* или нет, можно по быстроувеличивающимся в размерах семязпочкам. Сформировавшийся зародыш, как правило, не переходит в состояние покоя, а сразу прорастает и дает начало гибридному поколению.

*Преодоление постгамной несовместимости.* Постгамная несовместимость при отдаленной гибридизации возникает после оплодотворения. Часто при этом образуются щуплые невсхожие семена. Причиной может быть расхождение во времени развития зародыша и эндосперма. Из-за слабого развития эндосперма зародыш бывает неспособен к нормальному прорастанию. В таких случаях из зрелой щуплой зерновки изолируют зародыш и выращивают его в питательной среде.

Выращивание зародышей в искусственной питательной среде на-

зывается эмбриокультурой. Среда для выращивания зрелого зародыша может быть простой, без добавок физиологически активных веществ, содержащая минеральные соли и сахарозу. При более отдаленных скрещиваниях нарушения в развитии зародыша могут наблюдаться уже на ранних этапах, что выражается в отсутствии дифференцировки, замедленном росте. В этом случае культура зародыша состоит из двух этапов - эмбрионального роста зародыша, во время которого продолжается его дифференцировка, и прорастания подросшего зародыша. Для первого этапа требуется более сложная по составу среда с повышенным содержанием сахарозы, с добавками различных аминокислот, витаминов и гормонов.

Применение эмбриокультуры в селекции приобретает в последнее время большое значение для получения отдаленных гибридов зерновых, злаковых и других сельскохозяйственных культур. Показана возможность увеличения выхода пшенично-ржаных гибридов путем дорастивания незрелых зародышей, а также использования эмбриокультуры для преодоления постгамной несовместимости при гибридизации пшеницы с колосняком.

Метод эмбриокультуры находит все более широкое применение в межвидовой гибридизации овощных растений. Для лука разработаны приемы выращивания *in vitro* abortивных зародышей от гибридных семян с разных этапов эмбриогенеза, выращивание зародышей от частично фертильных межвидовых гибридов. Культура изолированных зародышей используется в селекции томатов и других овощных растений.

Исследована гормональная регуляция роста и развития зародышей томата *in vitro*. Обсуждается возможность применения эмбриокультуры для получения отдаленных гибридов подсолнечника, изучаются факторы, контролирующие рост и развитие *in vitro* зародышей подсолнечника, выделенных в разные сроки после опыления.

К л о н а л ь н о е м и к р о р а з м н о ж е н и е о т д а л е н н ы х г и б р и д о в . Эмбриокультура дает возможность вырастить гибридные

растения из неполноценных зародышей. Однако выход гибридных растений мал, и гибриды часто бывают стерильны. Иногда, например, при селекции гречихи, трудно воспроизвести в потомстве уникальные генотипы из-за перекрестного опыления культуры. Поэтому перед исследователями часто встает задача - размножить и сохранить полученные растения. В этом помогает метод клонального микроразмножения. Размножают гибриды путем активации развития меристемы пазушных почек (черенкованием стерильных побегов), адвентивными почками или регенерацией растений из каллусной ткани, в частности полученной при культивировании зародышей.

Получение гаплоидов *in vitro* и использование их в селекции. Роль гаплоидных растений в селекции очень велика. Применение их позволяет быстрее найти нужную комбинацию, сокращает время для создания сорта. Гаплоиды используются для получения стабильных гомозиготных линий. Для мутагенеза также удобнее использовать гаплоиды, поскольку на гаплоидном уровне облегчается отбор рецессивных мутаций.

В диплоидных растениях мутации редко затрагивают оба аллельных гена в гомологичных хромосомах. Особь обычно гетерозиготна (два гена различаются), при этом проявляется действие только доминантного (но не рецессивного) гена. Поскольку мутации чаще рецессивны, чем доминантны, их довольно сложно выявить. В гаплоидных же растениях, которые содержат только одну из каждой пары гомологичных хромосом, мутации проявляются немедленно. Селекция на гаплоидном уровне позволяет вести прямой отбор не только доминантных, но и рецессивных признаков.

Гаплоидные особи стерильны, но можно искусственно удвоить набор их хромосом с помощью колхицина и получить диплоидные гомозиготные растения.

Гаплоиды могут возникать спонтанно, но частота их спонтанного возникновения очень мала. Искусственным путем с использованием методов *in vitro* удается получить большие количества гаплоидных растений.

Существует три способа получения гаплоидов с использованием метода

культуры изолированных тканей:

- *андрогенез*— получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор
- *гиногенез* — получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семязачек;
- *партеногенез* — получение гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы.

Гаплоиды, полученные *in vitro*, могут применяться не только в практической селекции, но и в работах по генетической инженерии, а также по клеточной селекции. Пыльцевые зерна являются в некоторых случаях более удобными, чем протопласты, объектами для исследований по генетической трансформации.

**Криосохранение растений.** Криосохранение соматических клеток растений в жидком азоте (температура  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) - новое направление в биотехнологии, которое широко стало развиваться с начала 70-х годов XX столетия. Цель данной технологии заключается в сохранении в культуре *in vitro* генофонда, а также в обеспечении селекционеров в любое время генотипом, имеющим искомые признаки: необходимая пыльца для проведения гибридизации; уникальные и единичные семена, в том числе не выносящие обезвоживания; трансформированные, мутантные, гибридные клетки разных видов растений, способных к морфогенезу *in vitro*; зиготические и соматические зародыши и т. д. В настоящее время разработаны условия криосохранения для культивируемых клеток (более 30 видов), каллусных культур (около 10 видов), изолированных протопластов (8 видов), сохранения меристем (25 видов) и кончиков стебля (13 видов).

При проведении работ по криосохранению необходимо, прежде всего, учитывать специфику растительных клеток; отбирать мелкие клетки, с маленькой вакуолью и пониженным содержанием воды; разрабатывать в каждом отдельном случае подходы замораживания и последующего

оттаивания растительных клеток. При криосохранении встречается ряд трудностей, одна из которых связана с защитой замораживаемых клеток и тканей от осмотического стресса и механического разрушения структур в результате образования и роста кристаллов льда внутри клетки. Одновременно с этим необходимо правильно подбирать условия, обеспечивающие высокую выживаемость клеток при оттаивании и рекультивации.

Несмотря на многообразие работ в этом направлении, в них все же наметились общие приемы, лежащие в основе криосохранения: обработка клеток перед замораживанием, применение криопротекторов, соблюдение определенного режима замораживания в интервале от 0 до -40 °С (в редких случаях до -70 °С), а также специальные предосторожности при оттаивании объектов.

Процесс криоконсервации, как правило, начинается с подготовки культуры клеток к замораживанию. Это может быть достигнуто несколькими способами, предусматривающими культивирование

#### **4.2. Клеточная селекция растений**

Соматоклональная вариабельность. Клеточная селекция растений *in vitro* - метод выделения генетически модифицированных мутантных клеток и соматоклональных вариаций при помощи селективных условий. Значительный интерес представляет вопрос об использовании клеточной селекции в комплексе с получением соматопонов. Одна из наиболее сильных сторон культуры *in vitro* в создании технологий для сельского хозяйства - возможность на основе соматоклональных вариаций или индуцированных мутаций отбирать в жестких селективных условиях клетки, характеризующиеся искомыми признаками.

Для проведения клеточной селекции используют следующие приемы:

- прямая (позитивная) селекция, при которой выживает лишь определенный искомый мутантный тип клеток;

- непрямая (негативная) селекция, основанная на избирательной гибели неустойчивых делящихся клеток, но требующая дополнительной идентификации у них мутационных изменений;
- тотальная селекция, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны;

Из перечисленных выше приемов клеточной селекции прямая селекция является наиболее распространенным методом и используется главным образом для выделения растений-регенерантов, устойчивых, например, к гербицидам, антибиотикам, токсинам, тяжелым металлам, солям и другим антиметаболитам.

Для проведения работ по клеточной селекции растений в условиях *in vitro* в качестве объекта исследования могут быть использованы каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты. Выбор объекта зависит от наличия разработанных технологий применительно к различным видам растений, а также от конечных целей исследования.

Каллусная ткань представляет собой легкодоступный материал, который наиболее часто используют для клеточной селекции. Как правило, работу проводят на первичной или пересадочной каллусной ткани, которая не утрачивает способности к регенерации на протяжении ряда субкультивирований. Однако при работе с каллусными культурами многие исследователи отмечают существенные недостатки данного объекта: медленный рост ткани, неравноценное для всех клеток действие токсических веществ, которые применяются в качестве селективного фактора, а также потеря регенерационной способности в процессе культивирования каллусных клеток. Несомненно, проводить селекцию целесообразно на уровне одиночных клеток (суспензионная культура, протопласты). Однако для многих видов растений не разработаны эффективные технологии и способы культивирования одиночных клеток. Поэтому, несмотря на перечисленные выше недостатки использования каллусных культур, этот способ селекции остается для некоторых видов растений пока единственным.



Получение стабильно устойчивых линий - процесс длительный. Как правило, селекция начинается с получения достаточного количества каллусной массы из изолированных растительных эксплантов, используемой в дальнейшем для определения концентрации селективного фактора (построение дозовой кривой), при которой наблюдается одновременно рост каллусной ткани, и в то же время часть каллусных колоний погибает. Выбранная концентрация селективного фактора признается оптимальной и используется в дальнейших экспериментах.

#### **4.3. Генетические, эпигенетические и морфофизиологические изменения клеток при селекции *in vitro***

Метод культуры изолированных клеток, тканей и органов растений *in vitro*, широко используемый для решения многих фундаментальных вопросов клеточной биологии, физиологии и генетики растений, в настоящее время находит все большее применение и при создании новых биотехнологий. Начиная с первых работ по культивированию растительных клеток, тканей и органов особый интерес у исследователей вызывал вопрос о том, какие клеточные изменения могут происходить в изолированных клетках, развивающихся на искусственных питательных средах, и причины, их вызывающие. С разработкой техники получения растений-регенерантов из каллусной ткани появилась возможность создавать новые формы растений, отличающиеся как по фенотипическим, так и по генетическим признакам от исходных растений.

Генетическая природа и механизм возникновения соматклональной изменчивости пока мало изучены. Однако можно четко выделить зависимость возникновения соматклональных вариантов, прежде всего, от генотипической и эпигенетической изменчивости, индуцируемой условиями культивирования *in vitro*, составом питательных сред и уровнем концентраций солей и регуляторов роста растений, а также от генотипа и исходного экспланта.

Дифференцированные клетки в нормальном растении могут иметь

разную степень ploидности, но для отдельных видов характерно наличие только диплоидных клеток, ploидность которых может изменяться в процессе онтогенеза. Однако в процессе онтогенеза могут возникнуть клетки с разной ploидностью. Для вегетативно размножаемых и апомиктичных растений характерно образование с высокой частотой анеуплоидных клеток. Усиление хромосомных перестроек, приводящих к появлению химерности и миксоploидии у растений, наблюдается при изменении условий произрастания, особенно при их резком ухудшении: засоление почв, повышенные или пониженные температуры, применение гербицидов или пестицидов, минеральных удобрений в повышенных дозах. Эти и другие факторы могут приводить к физиологическим нарушениям, связанным, в первую очередь, с появлением аномальных митозов и формированием клеток с числом хромосом, отличающихся от такового в материнской ткани.

#### **4.4. Получение растений-регенерантов, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым факторам методами клеточной инженерии**

**З а с у х а .** Недостаток воды в почве наносит значительно больший урон растениеводству, чем все остальные стрессовые факторы, вместе взятые. Засуха приводит к возникновению водного дефицита в почве и соответственно в растениях, вызывая у них водный стресс. Хотя термин «засуха» относится главным образом к почвенному водному стрессу, он включает также воздействие жары на растения. Стресс, вызванный водным дефицитом, может быть первичным в случае засухи, а также вторичным при низкотемпературном, тепловом или солевом стрессах. Стресс, вызванный засухой, ведет к прямым или косвенным повреждениям растений, которые обусловлены инактивацией ферментов, нарушением биохимических путей, накоплением токсических веществ, утечкой ионов, дефицитом питания и другими причинами.

**З а с о л е н и е .** Одним из лимитирующих факторов сельскохозяйственной продуктивности является засоление почв. Около 900 млн га всех

земель нашей планеты имеют повышенное содержание солей, а количество засоленных почв с каждым годом возрастает. Особую тревогу вызывает увеличение в почвах содержания солей, которое происходит в результате их искусственного орошения. Решение данной проблемы во многом зависит от разработки рациональных агротехнических приемов, правильной методологии орошения, использования для полива частично или полностью обессоленной воды. С развитием биотехнологии растений потенциально возможным является получение солевыносливых генотипов у важных сельскохозяйственных культур путем селекции на уровне соматических клеток, слияния протопластов или переноса генов при использовании техники рекомбинантных молекул ДНК.

Вредное действие засоления имеет комплексный характер и обусловлено как нарушением осмотического баланса клетки, так и прямым токсическим влиянием ионов натрия, хлора на физиологические и биохимические процессы в клетке. Результатом такого действия может быть уменьшение тургора клетки, ингибирование функции мембран и активности ферментов, подавление фотосинтеза, нехватки отдельных ионов из-за нарушения селективного транспорта ионов, использование значительного количества энергии для поддержания толерантности.

**Металлы.** Присутствие в почве в большом количестве ионов металлов, токсически влияющих на растения, или недостаток ионов, используемых растениями в качестве питательных веществ, могут быть причиной ионного (минерального) стресса у растений. Особое внимание ученых привлекает изучение стрессов, обусловленных наличием в почве ионов тяжелых металлов, многие из которых токсически влияют как на растительные, так и на животные организмы. Стрессовое состояние у растений может быть индуцировано ионами таких тяжелых металлов, как цинк, кадмий, медь, ртуть; они также довольно часто встречаются и в почвах. Механизмы устойчивости к токсическим ионам могут включать уменьшение проницаемости плазмалеммы, детоксикацию ионов в результате связывания с

органическими веществами, компартментализацию в вакуолях, а также изменения структуры ферментов, которые являются их мишенями.

Работы по клеточной селекции растений на устойчивость к ионным стрессам начаты недавно, но уже имеют положительный результат. Во всех экспериментах используется метод прямой селекции, при котором в качестве селективного агента применяли токсические концентрации солей. Однако создание стрессовых селективных условий *in vitro*, идентичных таковым в природе, крайне затруднительно. В природных условиях помимо токсического действия ионов накладываются другие факторы, в частности наличие различных веществ, кислотность почвы и т. д. Для селекции на клеточном уровне используют питательные среды, которые хотя не полностью соответствовали естественным стрессовым условиям, все же обеспечивали экспрессию признака устойчивости и давали возможность отбирать нужные варианты.

**Экстремальные температуры.** Причиной стрессового фактора у растений могут быть относительно высокие или низкие температуры. Работ по клеточной селекции на устойчивость к этим стрессам немного. В изученной нами литературе сведений о клеточной селекции к тепловому шоку не обнаружено, хотя белки теплового шока являются предметом пристального изучения биологов различного профиля. Что касается работ по клеточной селекции к низкотемпературным факторам, то они имеют место.

Холодовой стресс у растений может быть вызван температурами большого диапазона: от 10-15 до 0 °С. Такому стрессу наиболее подвержены растения тропических и субтропических зон. Стойкость растений к охлаждению обусловлена способностью липидов мембран оставаться в жидком состоянии благодаря наличию большой пропорции ненасыщенных жирных кислот и/или повышенного содержания стеролов. Повреждения, вызванные промораживанием растений (температура ниже 0 °С), связаны прежде всего с формированием внеклеточного льда. При этом опок воды во

внеклеточное пространство приводит к вторичному эффекту, вызванному водным стрессом. Нарушения, вызываемые отрицательными температурами, могут быть предотвращены аккумуляцией антифризных веществ, уменьшением количества несвязанной воды при обезвоживании и увеличением способности переохлаждаться. Большинство авторов отмечают, что у растений происходят глубокие превращения запасных питательных веществ, в частности, у морозоустойчивых древесных растений накопление большого количества жиров, а у менее устойчивых - сахаров.

*Устойчивость к болезням.* Для увеличения производства продуктов питания экономически важным представляется защита растений от болезней и вредителей. Уже сейчас просматриваются реальные перспективы применения клеточной селекции на устойчивость. Если при селекции картофеля на устойчивость к болезням в течение года необходимо в полевых условиях провести оценку от 50 до 100 тыс. сеянцев, то *in vitro* за один прием можно протестировать около 20 млн протопластов, выделенных из 9 г листьев картофеля. Для клеточной селекции в качестве селективного агента с успехом используют патотоксины, культуральные фильтраты и непосредственно патогены.

Одним из главных защитных механизмов, лежащих в основе сверхчувствительности растений к патогенам, является *de novo* синтез растениями антимикробных веществ, называемых «фитоалексинами». Защитные реакции у растений, например продукция фитоалексинов, образование белков, связанных с патогенезом, лигнификация, могут быть индуцированы целым рядом веществ биотической или абиотической природы, которые называют «элиситорами». Абиотическими элиситорами могут быть ионы ртути, полиакриловая и салициловая кислоты. К биотическим элиситорам относятся компоненты клеточных стенок грибов, вещества, присутствующие в культуральных фильтратах.

Наиболее простой подход в селекции *in vitro* на устойчивость к болезням связан с культивированием клеток непосредственно в присутствии патогена.

Этот подход может быть особенно полезным, когда мало известно о токсических веществах, ответственных за патогенез, или если патоген не продуцирует токсины. Однако этот способ селекции имеет некоторые сложности в проведении экспериментов. Для правильной схемы селекции прежде всего необходимо знание жизненного цикла патогена. Многие патогены, например грибы, имеют различные стадии жизненного цикла, несколько стадий спороношения, в зависимости от которых могут изменяться выживаемость, рост и эпидемиология. Поэтому необходимо учитывать стадию спороношения, существенным для инфицирования могут быть световой и температурный режимы, относительная влажность, рН, наличие или отсутствие питательных веществ, что сказывается на прорастании спор.

#### **4.5. Мутагены и их применение при клеточной селекции**

Наиболее широкий спектр мутаций наблюдается при использовании в качестве мутагена ионизирующего излучения. При рентгеновском облучении клеток получены пигментдефектные линии дурмана и петунии, устойчивые к параквату линии табака. Гамма-облученные растения (лист) служили источником каллусной ткани и протопластов, из которых были выделены линии, устойчивые к гербициду и валину. Устойчивые линии к ватину были получены и при обработке культивируемых *in vitro* клеток табака ультрафиолетовыми лучами. Применение такого способа облучения гаплоидных протопластов табака приводило к возникновению разнообразных ауксотрофных мутантов.

Выживаемость клеточных колоний может быть различной в зависимости от того, на какой стадии развития культуры применяется обработка мутагеном. При работе с единичными клетками целесообразно проводить обработку их мутагеном до первого деления клеток, так как в другом случае возможно возникновение химерных линий. На изолированных протопластах было показано, что радиочувствительность протопластов зависит от этапов их культивирования. Экспериментально установлено, что облучение протопластов

предпочтительнее проводить либо сразу после их выделения, либо на следующий день. Поскольку из-за возможного образования в среде под действием ионизирующего излучения токсических для клеток веществ в любом случае желательно отмыть протопласты от среды, в которой проводили облучение.

При работе с химическими мутагенами нередко проявляется их токсическое действие на клетки. Высокий процент летальности при их использовании может приводить к гибели всей популяции клеток, поэтому при работе с химическими мутагенами используют в основном невысокие дозы. При этом иногда мутагенные вещества не отмывают от протопластов и культивируют их в присутствии мутагена. Ионизирующее излучение вызывает меньший токсический эффект. Более того, даже высокие дозы облучения подавляют лишь репродукционную и регенерационную способности клеток, сохраняя, однако, их метаболическую активность.

#### **4.6. Гибридизация соматических клеток. Выделение, культивирование и слияние изолированных протопластов**

Следующий метод клеточной селекции - создание неполовых гибридов путем слияния изолированных протопластов, полученных из соматических клеток. Этот метод позволяет скрещивать филогенетически отдаленные виды растений, которые невозможно скрестить обычным половым путем, вызывать слияние трех и более родительских клеток, получать асимметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами или генами, или только органеллами и цитоплазмой другого. Гибридизация соматических клеток дает возможность не только соединить в одном ядре гены далеких видов растений, но и сочетать в гибридной клетке цитоплазматические гены партнеров.

Для применения методов соматической гибридизации необходима разработка соответствующих технологий получения протопластов, способных делиться и регенерировать растения. Выделение протопластов растительных клеток путем их плазмолиза и механического разрушения клеточной

стенки было осуществлено еще в конце XIX в.

В процессе культивирования изолированные протопласты регенерируют новую клеточную стенку и превращаются в клетки, способные делиться и давать начало образованию каллусной ткани. На формирование колоний протопластами влияет состав питательной среды. Дальнейшая задача - получение из каллусной ткани растений-регенерантов. Пока не удалось получить регенеранты из протопластов многих злаковых (пшеницы, ячменя). Однако успешно осуществляется регенерация из протопластов пасленовых (табак, картофель, томаты) и других культур.

Протопласты выделяют из каллусных, суспензионных клеток или из клеток листьев, меристем, стеблей.

Особый интерес представляют межцарственные клеточные гибриды, полученные от слияния протопластов растительных и животных клеток.

При соматической гибридизации эксперимент строится аналогично опытам по генетике микроорганизмов. Иными словами, используются большие популяции клеток обоих родителей. При обработке смешанной суспензии протопластов фьюзогенами часть из них сливается друг с другом, но в суспензии остаются и неслившиеся протопласты. Все они, включая гибридные, в дальнейшем регенерируют клеточные стенки и переходят к делениям. Возникает задача - выделить из общей массы гибридные экземпляры. Селекция гибридов может применяться либо на клеточном уровне, либо на стадии регенерации и осуществляется несколькими методами.

Другим методом, позволяющим производить отбор гибридов, является генетическая комплементация. Этот метод был применен для обнаружения гибридов табака, при этом использовались хлорофиллдефектные мутации у родителей с последующей комплементацией в гибридных продуктах. Сочетание двух ядерных рецессивных мутаций у табака вызывает светозависимую хлорофильную недостаточность. Растения, гомозиготные по любому из этих генов, выращиваемые при интенсивном освещении, обесцвечиваются и гибнут. После слияния и регенерации клеточные колонии



пересаживают на среду, индуцирующую стеблевой органогенез, и культивируют на свету.

Под методом физиологической комплементации, который также используется для обнаружения соматических гибридов, подразумевают способность гибридных клеток жить и размножаться либо переходить к морфогенезу в условиях культуры, при которых родительские клетки этого делать не в состоянии, причем неспособность родительских клеток не связана с какой-нибудь определенной мутацией, а является нормальной физиологической реакцией клетки на физиологические условия. Например, половые гибриды между *N. glauca* и *N. Langsdorfii* имеют склонность к опухолеобразованию, а клетки гибридов в условиях *in vitro* способны расти и размножаться на питательных средах без гормонов. Гормоннезависимость клеток гибрида и была положена в основу метода селекции. После индуцированного слияния протопластов из мезофилла листьев обоих видов табака клетки через некоторое время пересаживали на питательную среду, не содержащую фитогормонов, и отбирали колонии, способные расти в этих условиях. Существуют также другие методы селекции соматических гибридов: смешанная физиологогенетическая комплементация, физическое обогащение (метод основан на разделении протопластов при центрифугировании в связи с их различной плотностью), механическая изоляция.

Использование изолированных протопластов в селекции растений не ограничивается возможностью их индуцированного слияния и получения соматических гибридов. Изолированные протопласты способны поглощать из окружающей среды макромолекулы и органеллы, следовательно, в них можно вводить чужеродную информацию, не пересаживая ДНК или органеллы других клеток. Уже проведена успешная трансплантация изолированных ядер в протопласты петунии и табака. Вместе с тем поглощение протопластами чужеродных ядер не всегда ведет к образованию гибридов.

Однако работы по переносу чужеродных органелл и ДНК только начинают развиваться. В целом использование изолированных протопластов в

генетической реконструкции клетки, как видим, открывает перспективы перед клеточной селекцией.

#### **4.7. Клеточная селекция и соматическая варибельность.**

##### **Соматическая и гаплоидная гибридизация**

Изучение растений соматических вариантов показало, что от растения-донора они отличаются не только моногенными качественными признаками, но и (что более важно практически) количественными полигенными признаками, такими, как интенсивность роста, продуктивность, толерантность к неблагоприятным факторам окружающей среды (абиотические и биотические).

Практические результаты по использованию соматических вариантов впервые были получены у сахарного тростника в начале 70-х годов XX столетия на Гавайских островах. Среди регенерантов были отобраны растения, устойчивые к вирусам мучнистой росы. В результате получены различные формы сахарного тростника, устойчивые к болезням и с повышенным содержанием сахара до 20%.

Из длительно культивируемых каллусных тканей герани получены растения-регенеранты с измененной морфологией листовых пластинок и цветков, а также с измененным составом эфирных масел.

Создание соматических клонов имеет несомненное значение для селекции зерновых культур, где традиционными методами создаются сорта на узкой наследственной основе. Анализ соматических клонов, полученных разными группами исследователей из каллусной ткани сортов озимой и яровой пшеницы, показал большую изменчивость среди соматических клонов и отличие их от исходного сорта по таким морфологическим признакам, как высота растения, интенсивность кущения и число побегов, отношение колоса к солоmine, остистость или безостость колоса, его форма, окраска семян. По физиологическим признакам растения различались по времени вегетации, устойчивости к низким температурам и условиям перезимовывания и устойчивости к болезням

*Соматическая гибридизация.* Гибридизация соматических клеток методом

слияния протопластов, без сомнения, обогатила клеточную биологию. Появилась возможность изучать поведение гибридных ядерных геномов при разной степени таксономической удаленности партнеров. Межродовая соматическая гибридизация между картофелем и томатом позволила получить гибридные растения двух типов, которые называли «томато» и «помато», в зависимости от родовой характеристики хлоропластов гибрида. В первом случае хлоропласты были томатные, во втором - картофельные. Эти растения не обладали хозяйственно-полезными свойствами, но позволили наблюдать проявление признаков партнеров.

При межвидовой соматической гибридизации могут возникнуть как стерильные, так и фертильные растения. В последнем случае возникает возможность получить потомство от самоопыления или обратного скрещивания с культурными сортами.

*Гаплоидная гибридизация.* Широкому использованию техники получения гаплоидов в культуре пыльников мешает низкая эффективность, которую можно рассчитать как: 1) процент изолированных пыльников, образовавших в культуре эмбриоидов или каллус из микроспор; 2) процент гаплоидных растений-регенерантов в расчете на изолированный пыльник. Недостатком метода является также появление в большом числе (особенно у злаков) альбиносных растений-регенерантов

Таким образом, создание гаплоидных растений разными методами *in vitro* позволяет быстро создать гомозиготные линии - и в этом ценность данной технологии для селекции. Некоторый скептицизм, проявляемый селекционерами, связан в частности с тем, что при использовании  $F_1$  поколения рекомбинации могут произойти только в одном мейотическом цикле, этого недостаточно для обмена признаками, контролируемые полигенно. Как выход предлагается или использование  $F_2$  поколения или половая гибридизация полученных *in vitro* регенерантов разных генотипов и повторный цикл получения гаплоидов *in vitro* у отселектированных половых гибридов.

#### **4.8. Клональное микроразмножение растений**

Во многих странах мира биоиндустрия микроклонального размножения поставлена на поточную промышленную основу и представлена десятками активно функционирующих предприятий. Например, во Франции 94% всей продукции цветочных культур получают методом культуры изолированных тканей. В США около 100 коммерческих предприятий получают посадочный материал декоративных, овощных, полевых, плодовых и лесных культур методом клонального микроразмножения. Ведущим производителем оздоровленного посадочного материала цветочных растений является Голландия, а подвоев яблони, сливы и персика - Италия (до 250-500 тыс. ежегодно). В нашей стране также ведутся интенсивные работы по клональному микроразмножению растений, и в настоящее время многие научно-исследовательские институты и промышленные лаборатории разрабатывают и усовершенствуют методы микроразмножения и оздоровления различных декоративных, плодовых, ягодных, овощных, кормовых и древесных культур. Оздоровление промышленных посадок малины от комплекса вирусных заболеваний путем сочетания термотерапии и культуры меристемы повышает продуктивность культуры в 6-8 раз.

## Литература

1. Биотехнология растений: культура клеток/Под ред. Р.Г. Бутенко.- М.: Агропромиздат, 1989.
2. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология.- М.: Наука, 1986.
3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе.-М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.
4. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Слияние протопластов и генетическое конструирование высших растений.- Киев: Наукова думка, 1982.
5. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений.- Киев: Наукова думка, 1984.
6. Калашникова Е.А., Родин А.Р. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений, с использованием методов биотехнологии.- М.: МГУЛ, 2004.
7. Калинин Ф.Л., Кушнр Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений.- Киев: Наукова думка, 1992.
8. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений,- М.: Наука, 1983.
9. Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Кочиева Е.З. и др. Сельскохозяйственная биотехнология. Учебник. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: высш. шк., 2008. – 710 с.

Учебно - методическое издание

**Виталий Николаевич Дышко**

**Клеточная и тканевая биотехнология в растениеводстве**  
Курс лекций для аспирантов

Подписано в печать \_\_\_\_ \_\_\_\_ 201\_\_ г. Формат 60x84/8.

Печ. л. 8,63 Тираж \_\_\_\_\_ экз.

Заказ № \_\_\_\_\_

ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА»  
214000, Смоленск, ул. Б. Советская, 10/2