

Биотехнологические процессы в современном сельском хозяйстве

Лекция № 4



Основные перестройки, происходящие в начале культивирования растительных клеток в условиях *in vitro*



- Генетическое перепрограммирование
- Изменение морфологии клеток и их цитофизиологических функций.
- Изменение трофики клетки.
- Изменение реакции клетки на различные факторы.
- Изменение уровня интеграции и систем регуляции



Выделение клетки из целого организма и перенос ее в искусственно созданные условия культуры практически полностью устраняет влияние межклеточных и организменных регуляторных систем. Единственная регуляторная система – экзогенные регуляторы роста. Все процессы *in vitro* находятся под постоянным контролем экзогенных регуляторов роста.



Изоляция растительной клетки от
всей иерархии регуляторных систем
приводит к потрясающей
цитогенетической
вариабельности культивируемых
клеток.

Особенности длительно культивируемых *in vitro* популяций растительных клеток



- Морфологическая гетерогенность.
- Физиологическая гетерогенность
- Генетическая гетерогенность
- Сохранение генетических особенностей исходного вида.



Гетерогенность каллусной ткани по клеточному составу заключается в том, что она может включать паренхимные, меристематические, некротические клетки, отдельные клетки или зоны проводящей системы.

В суспензионных культурах имеются мелкие делящиеся клетки с одним ядром и гигантские вакуолизированные клетки с низким потенциалом к эмбриогенезу.



Callus - Cowpea in tissue culture
by Nancy Terryn



Объекты исследований

калусная и суспензионная культуры эхинацеи
пурпурной





Физиологическая гетерогенность:
клетки в популяции находятся в разном физиологическом состоянии – одни из них делятся, другие растут, третьи стареют или погибают. Такая культура называется **асинхронной**.

Физиологическая вариабельность клеток в суспензионной культуре менее выражена по сравнению с культурой каллусной ткани.

Способы синхронизации культуры:



1. Применение ингибиторов синтеза ДНК (тимидин, 5-аминоурацил, оксимочевина).
2. Создание условий голодания по одному из компонентов культуральной среды (например, ауксину, цитокинину, углеводам, азоту, фосфору).
3. Действие пониженной температуры.



Генетическая неоднородность
каллусных клеток и клеток
суспензионных культур выражается
в различной ploидности.

Популяции клеток *in vitro* могут иметь
в своем составе полиплоидные,
моноплоидные, анеуплоидные
клетки и клетки с хромосомными
абберациями.

Причины нестабильности генома клеток



1. Генетическая гетерогенность определенного вида, сорта, органа, ткани, которые используются для получения первичного каллуса.
2. Нарушение коррелятивных связей при выделении первичного экспланта из растения.
3. Аномалии митотического цикла *in vitro*.

Причины нестабильности генома клеток



4. Мутагенное действие экзогенных гормонов и стимуляторов.
5. Длительное субкультивирование каллусных культур, приводящее к накоплению в популяции генетически измененных клеток и клонов.



В геноме эукариотических клеток сохраняются генетические основы вида и индивидуального генотипа растения-донора, несмотря на генетическую гетерогенность популяций клеток *in vitro*.

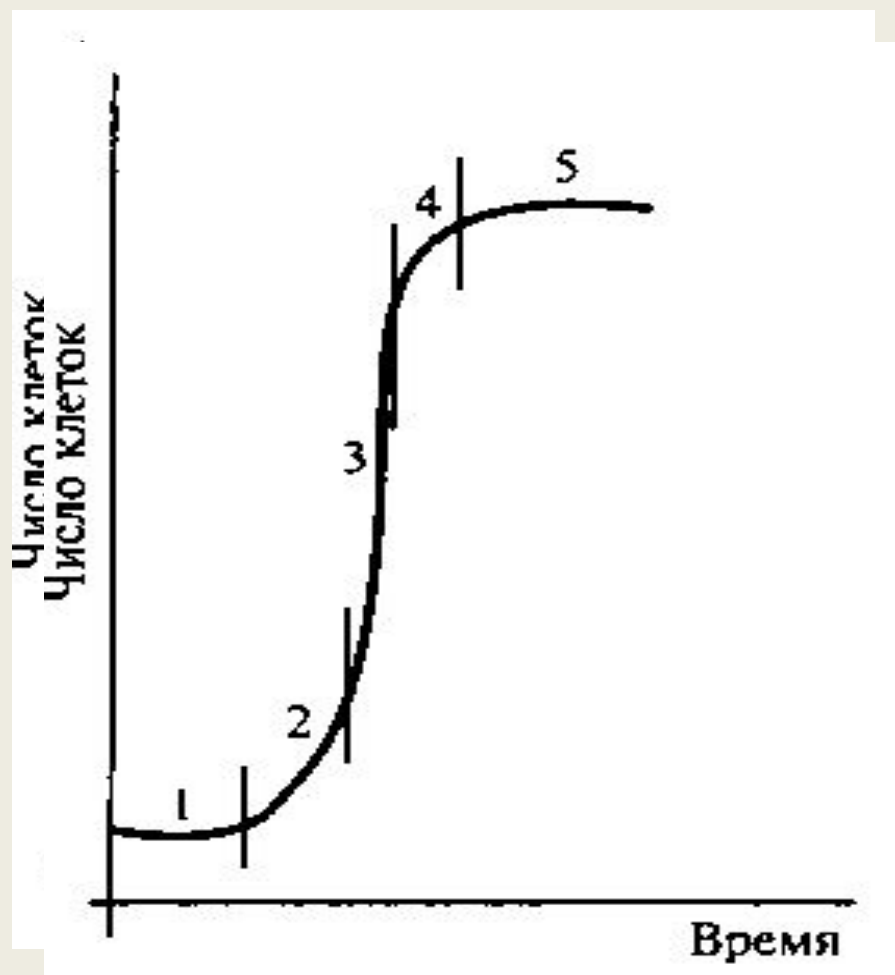
Также в клетках *in vitro* часто сохраняются **эпигеномные** характеристики, которые связаны с исходной дифференцировкой экспланта.

Наиболее важной характеристикой популяции является её рост. В целом клетки *in vitro* проходят **фазы ростового цикла**, характерные для роста клеток высших растений *in vivo*

Ростовой цикл (цикл выращивания)

Это период помещения **инокулюма** (часть суспензионной культуры, используемой для пересадки на свежую среду) на свежую питательную среду до следующего культивирования. Рост клеточных культур описывается S-образной кривой.







Фазы роста:

- 1 – латентная;
- 2 – логарифмическая;
- 3 – линейная;
- 4 – замедления;
- 5 – стационарная.

Лаг-фаза

Начальный период в ростовом цикле.
Клетки не размножаются и не
увеличиваются в размерах.

Увеличивается поглощение и экскреция
веществ. Увеличивается объем
цитоплазмы и число органелл.
Повышается содержание АТФ, ГТФ,
НАДФН₂. Активизируется дыхание,
полисомы свободные, начинается
синтез ДНК.



Логарифмическая фаза

Экспоненциальное (логарифмическое) увеличение количество клеток за счет их деления. Исчезает вакуоль и увеличивается объем цитоплазмы, гиалоплазма становится плотной. Увеличивается число митохондрий и полирибосом. Полисомы прикрепленные. Наблюдается максимум синтеза РНК и белка.



Логарифмическая фаза

Отмечается активное дыхание. Происходит синтез индуцибельных ферментов и пластидный синтез липидов, углеводов, пуринов, терпенов. В течение поздней экспоненциальной фазы наблюдается замедление клеточного деления. Увеличение биомассы происходит за счет растяжения клеток.



Линейная фаза



Очень короткая. Удельная скорость роста культуры в этой фазе практически постоянная.

Фаза замедления роста

Питательная среда истощается (источники углеводного, азотного, фосфорного питания).

Размер клеток продолжает возрастать, но количество клеток не меняется. Изменяется число органелл, изменение формы митохондрий и т.д. происходят выбросы этилена. Начинается синтез «белков старения».



Стационарная фаза



Период ростового цикла, в ходе которого каллусная или суспензионная культура достигает максимума сухого веса. Рост культуры угнетается накопившимися в среде продуктами жизнедеятельности клеток. Резко уменьшается объем цитоплазмы, вакуоль достигает максимальной величины. Органеллы разрушаются. Резко падает активность дыхания. Увеличивается количество свободных серина и треонина. Необходима пересадка культуры на свежую питательную среду.

Типы дифференцировки клеток растений *in vitro*:

1. Появление в каллусной ткани дифференцированных клеток, имеющих специфическое морфологическое строение и выполняющих особые функции. Иногда наблюдается возникновение **эпибластов** – клеток, депонирующих запасные вещества.



Типы дифференцировки клеток растений *in vitro*:



2. **Гистогенез** – образование в каллусе различных тканей. В каллусной ткани может происходить образование млечников, волокон, трихом, трахей, трахеид, ситовидных трубок и клеток-спутниц.
3. **Органогенез** – это дифференциация каллусных клеток в целые органы; превращение их в апексы стеблей или корней.

Типы дифференцировки клеток растений *in vitro*:

4. **Соматический эмбриогенез** – образование в каллусной ткани или суспензионной культуре зачатков растения, способных развиваться во взрослое растение.

Гистологическая дифференцировка *in vitro* может осуществляться по пути либо ксилемогенеза, либо флоэмогенеза.



Превращение каллусной клетки в проводящие элементы.



1. Каллусная клетка увеличивается в размерах, становится полярной.
2. Увеличивается количество гемицеллюлоз и уменьшается количество пектинов в клеточной стенке.
3. Осуществляется лигнификация клеточных стенок. Возрастает активность фенилаланин-аммиаклиазы (хорошо коррелирует интенсивностью процесса гистогенеза).

Эффект ауксина и сахарозы на дифференциацию проводящих элементов в каллусной культуре.

При одной и той же концентрации ауксина в агаровом блоке, но при разных концентрациях сахарозы могут происходить разные события. Низкие концентрации сахарозы (2%) вызывают преимущественно образование элементов ксилемы, а высокие (8%) – флоэмы.





СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!