

# Биотехнология растений



1917г, Карл Эрки

*Биотехнология – это все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты*

1973г, Герберт Бойер и Стенли Коэн

*Положено начало технологии рекомбинантных ДНК*

1961г, Карл Г. Хеден

*Биотехнология – это исследования в области “промышленного производства товаров и услуг при участии живых организмов, биологических систем и процессов”*

*Биотехнология – это комплекс методов, дающих человеку возможность целенаправленно изменять структуру генетического материала живого с выходом на получение ценных продуктов и технологий*

*Технология рекомбинантных ДНК + биотехнология =  
молекулярная биотехнология*



**Молекулярная биотехнология растений – это соединение методов культуры клеток и тканей растений с методами молекулярной биологии и техникой рекомбинантных ДНК**

**Методы  
клеточной инженерии,  
включающие методы  
культуры клеток и тканей**

**Методы  
генной инженерии,  
связанные с применением  
рекомбинантных  
молекул ДНК**

**Методы  
классической генетики растений**

# Лекция 1. Культуры растительных клеток и тканей *in vitro*

---

**I. История развития методов культуры клеток, тканей и органов**

**II. Дедифференциация. Что такое каллус? Как его получить?**

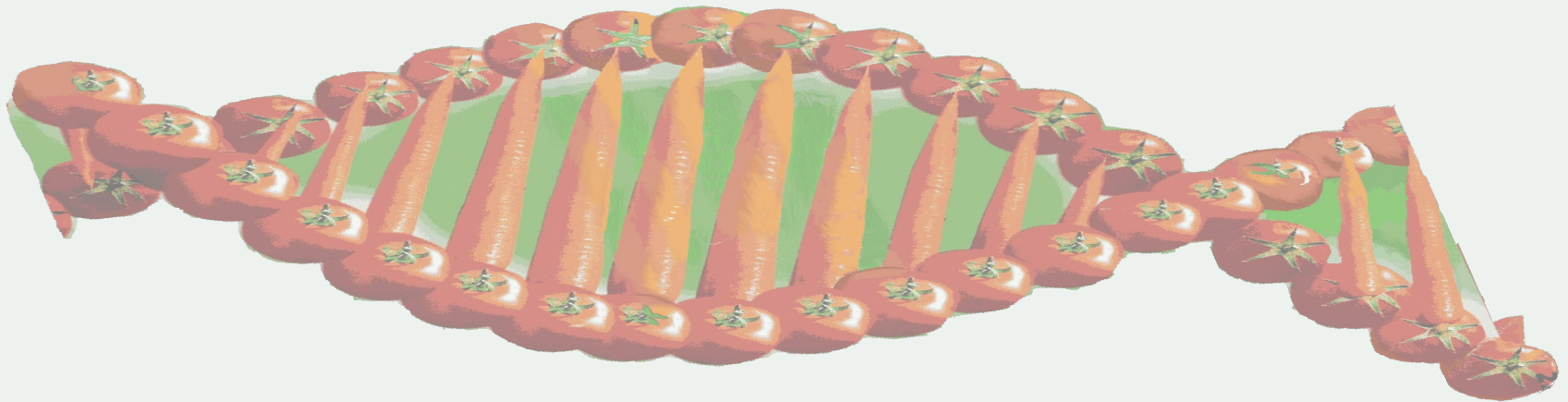
**III. Морфогенез (регенерация) *in vitro***

**IV. Использование методологии *in vitro* для решения фундаментальных и прикладных задач**

**V. Использование растений как продуцентов веществ вторичного метаболизма *in vitro***

**VI. Микрклональное размножение**

# Исторический экскурс



История развития метода культуры клеток,  
тканей и органов

### III. 1940-1960гг

1. Создание коллекции видов растений *in vitro*;
2. Выявление роли гормонов и витаминов в морфогенезе растения;
3. Разработка методов выращивания суспензионных культур и единичных клеток

### II. 1932-1939гг

Ф. Уайт и Р. Готре

Демонстрация способности к неограниченному росту разнообразных растительных тканей в условиях *in vitro*

### V. 1976-1985гг

1. Генетика соматических клеток растений – новое направление;
2. Создание разнообразных методов трансформации;
3. Создание трансгенных растений

Х. Фехтинг

1902г – 1922 гг Габерландт

**Принцип**

**ТОТИПОТЕНТНОСТИ  
растительных клеток**

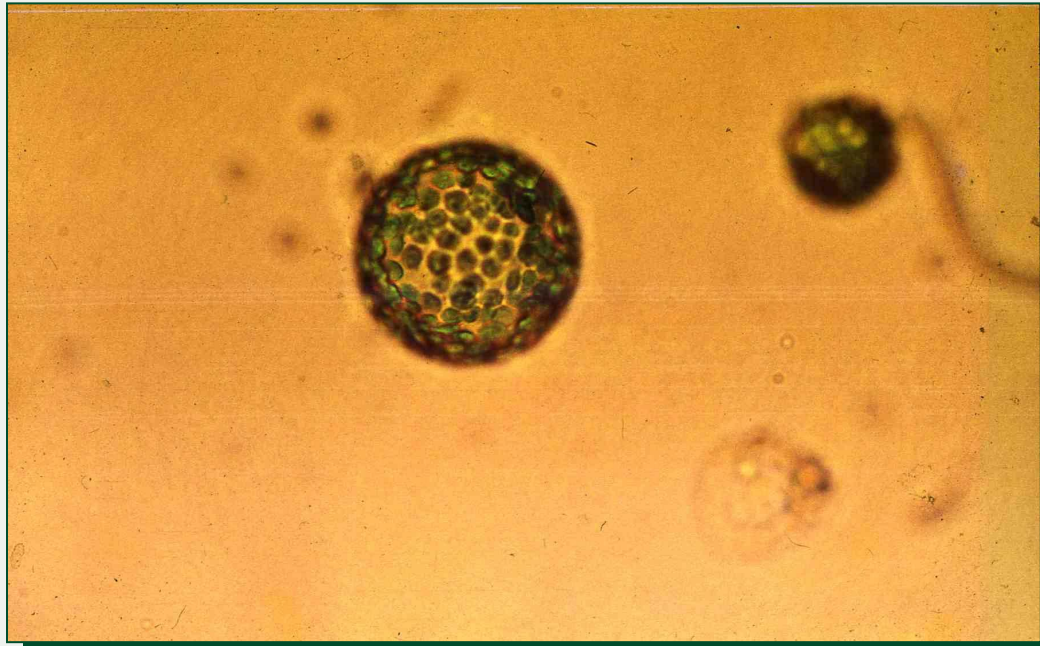
### I. 1902-1922гг

Разработка оптимальных питательных сред и выращивание изолированных органов *in vitro*

### IV. 1960-1975гг Е. Кокинг

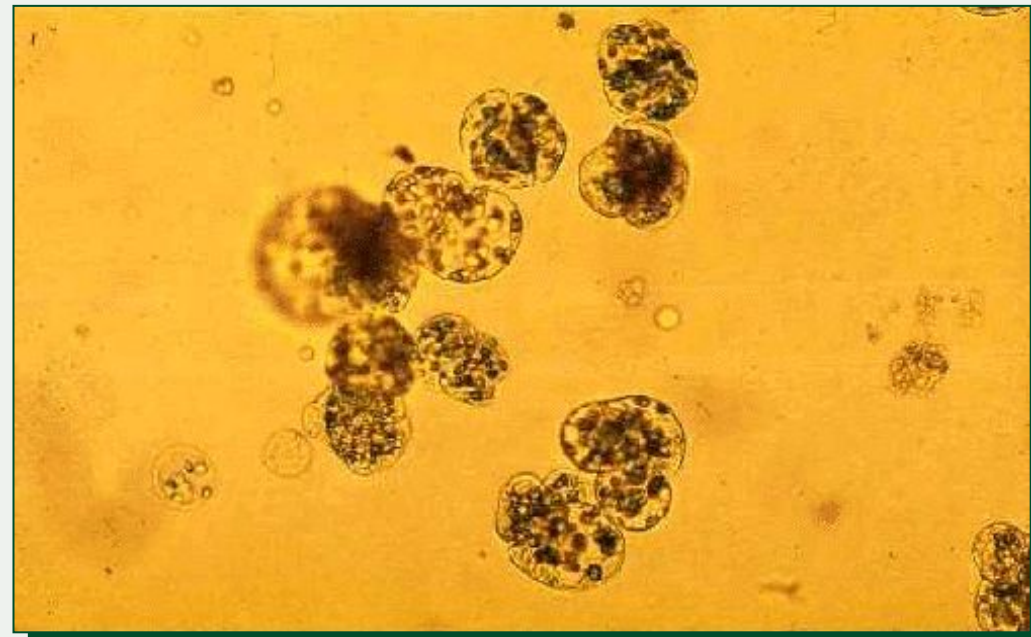
1. Создание метода получения изолированных протопластов;
2. Создание соматических гибридов;
3. Разработка метода получения безвирусных растений

Реализация тотипотентности  
растительных клеток



*Протопласт*

*Деление  
протопластов*







*Органогенный каллус  
табака*

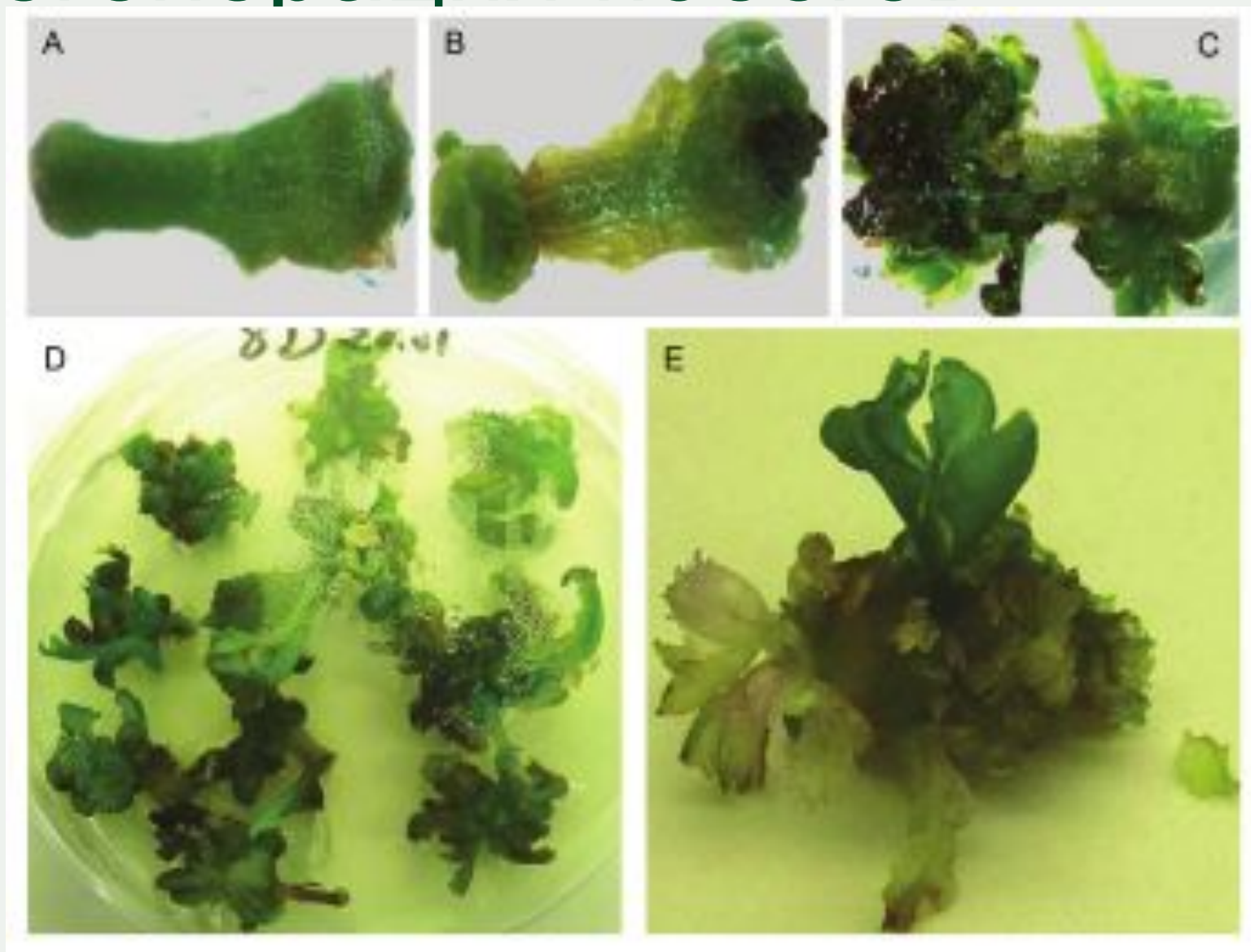
*Формирование  
растений-регенерантов  
(горох)*



# Пути формирования растения-регенеранта



# Регенерация побегов



**Соматический эмбриогенез – это процесс, в ходе которого незиготические клетки формируют эмбрионы, которые проходят через характерные стадии эмбрионального развития, в конечном счёте формируя новое растение (Chen et al., 2009)**



# Использование соматического эмбриогенеза

Трансформация растений

Получение искусственных семян

Изучение процессов регенерации и зиготического эмбриогенеза



Clarke et al, 2008. *Plant Cell Rep* 27, 1027–1038



Haque, Ghosh, 2014. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 172, 4013–4024.

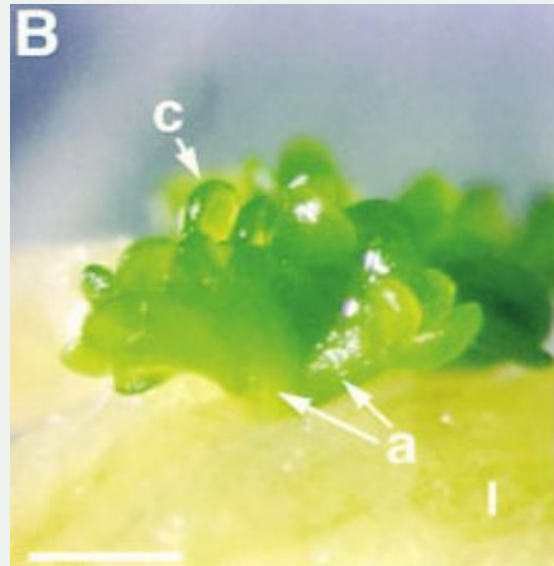
# Участники соматического эмбриогенеза

SERK (киназный рецептор)

Факторы транскрипции:

LEAFY COTYLEDON1

AGAMOUS-LIKE15

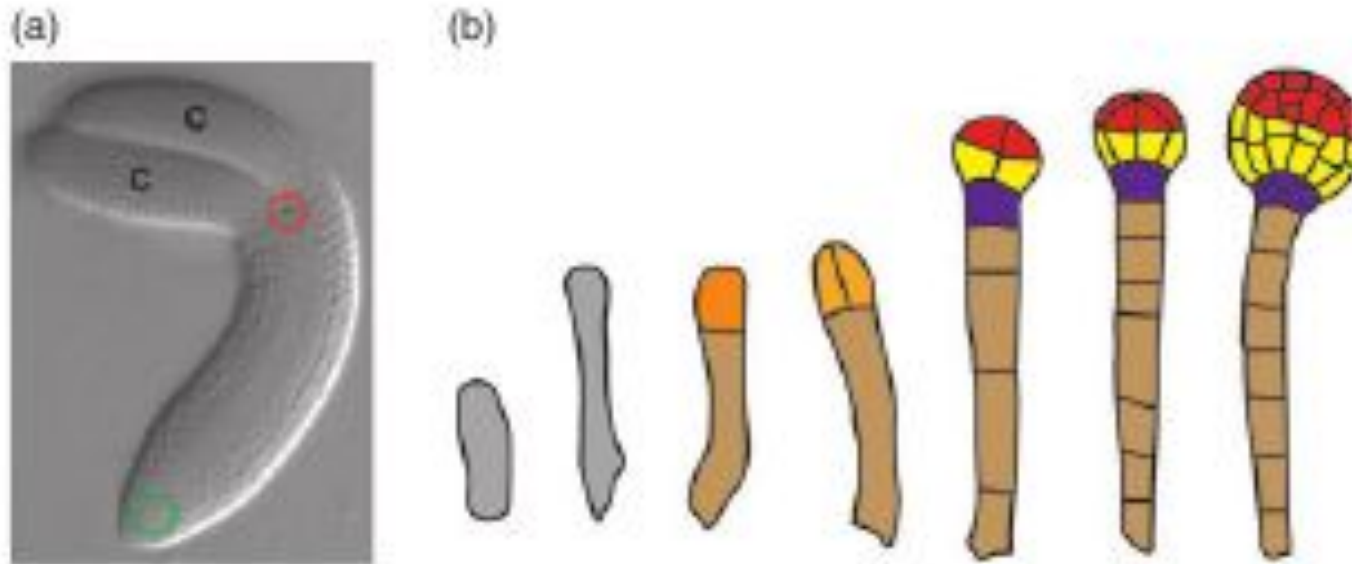


Lotan et al, 1998.  
Cell 93, 1195–1205.

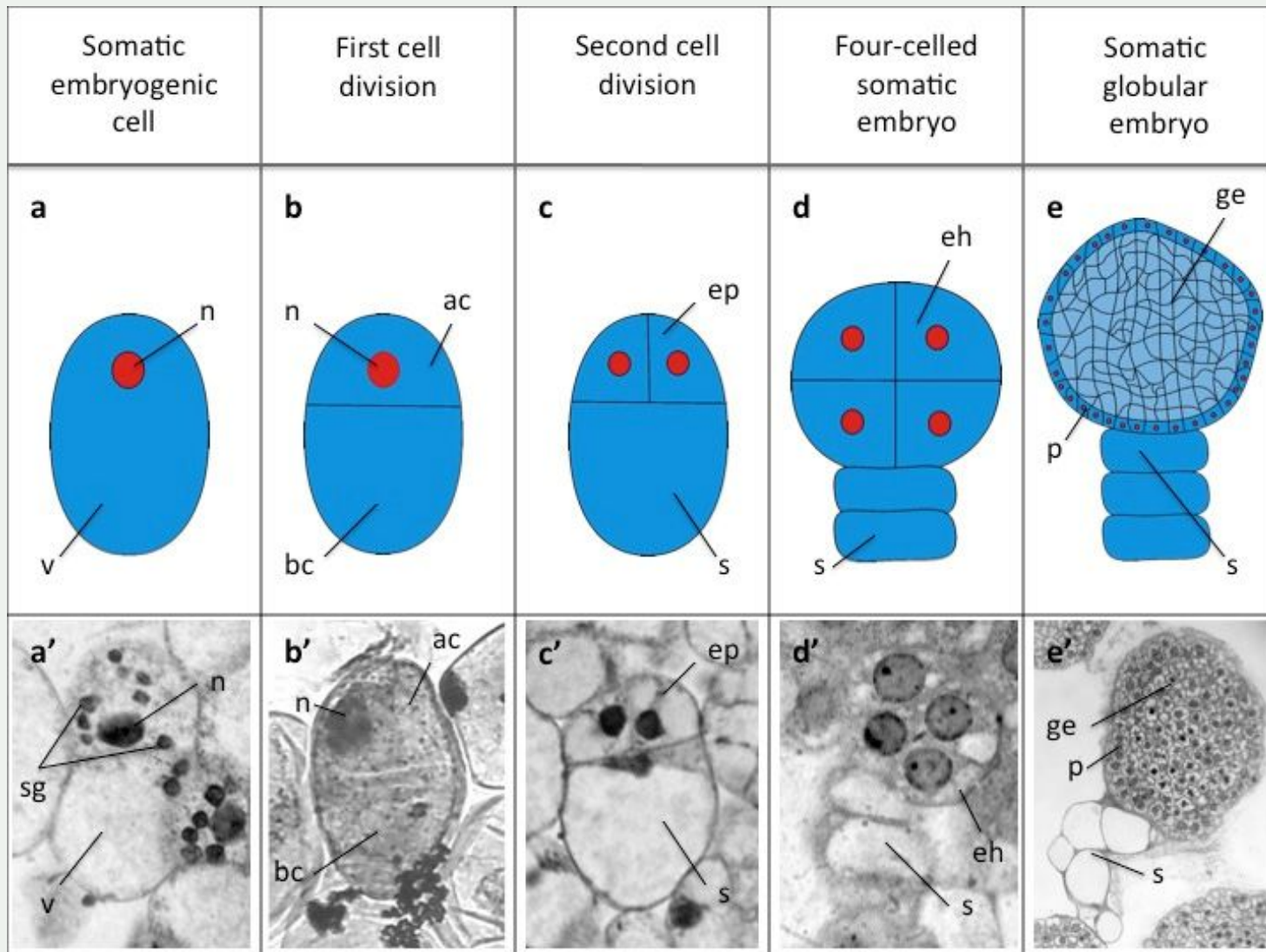


Boutilier et al, 2002. Plant Cell  
14, 1737–1749.

# Зиготический эмбриогенез

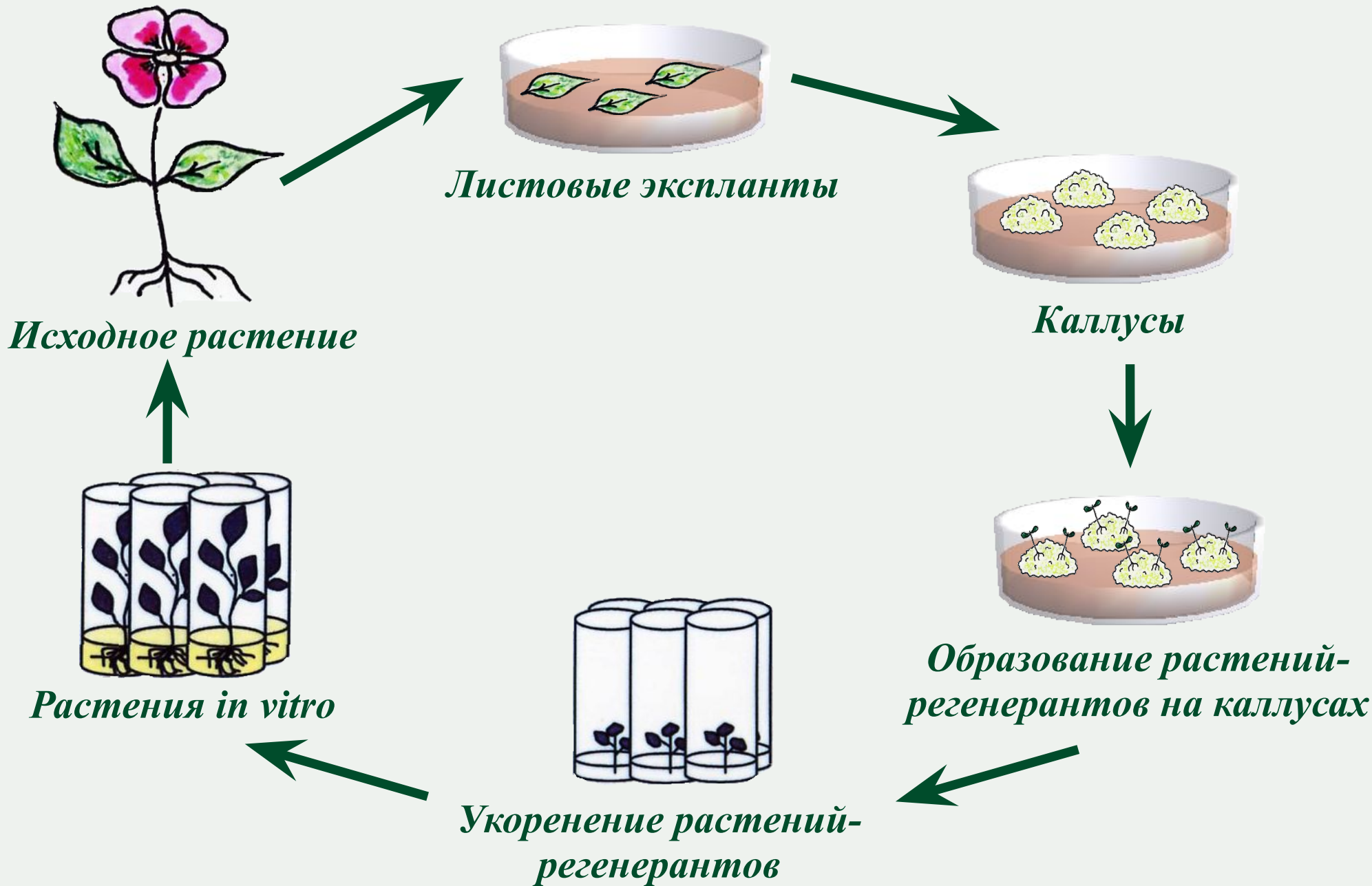


# Ранние стадии соматического эмбриогенеза



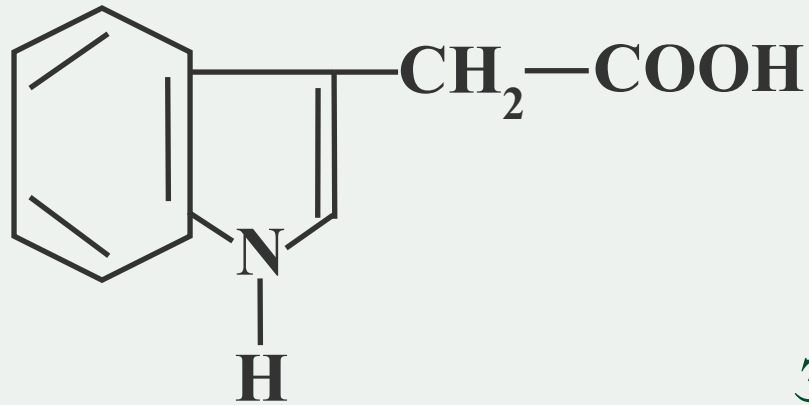


# Морфогенетический цикл

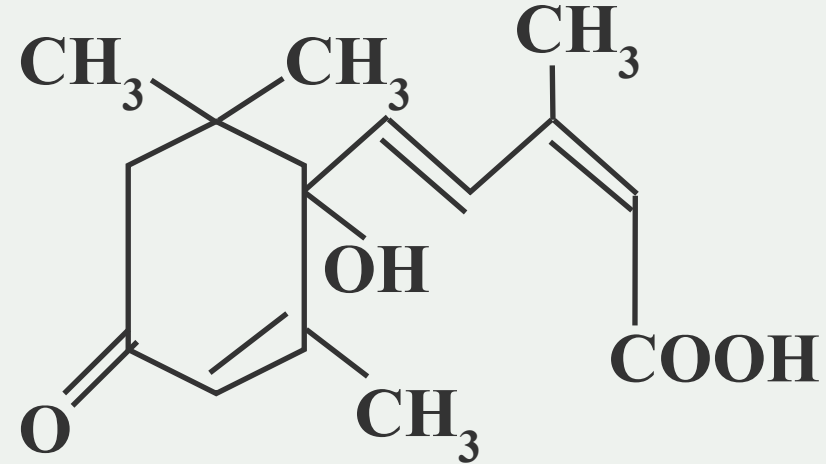


# Основные растительные гормоны

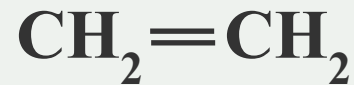
## Ауксины



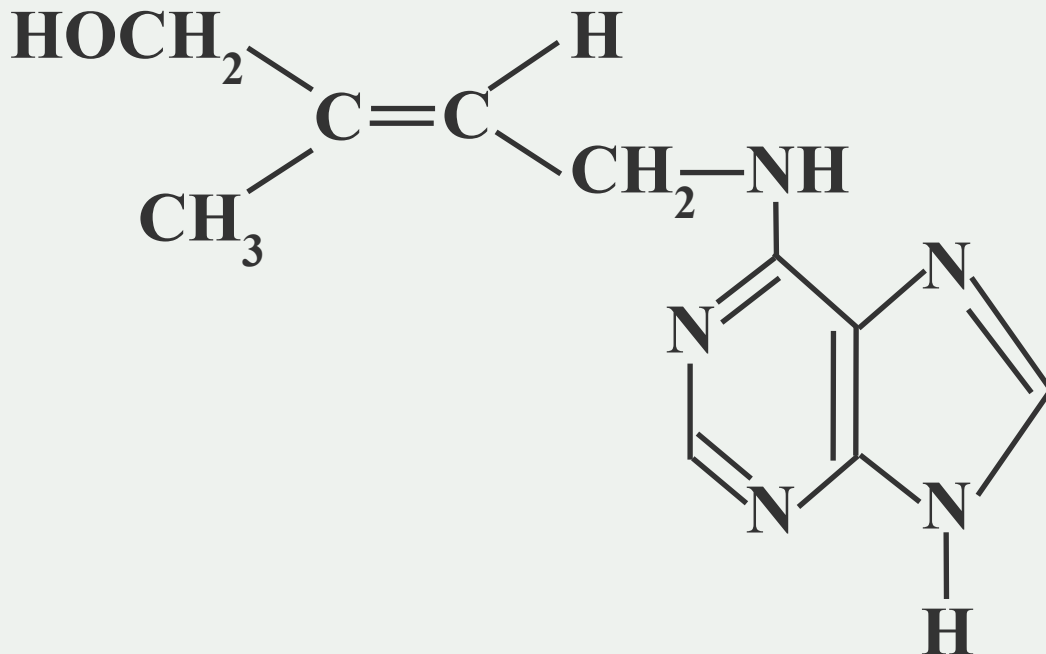
## Абсцизовая кислота



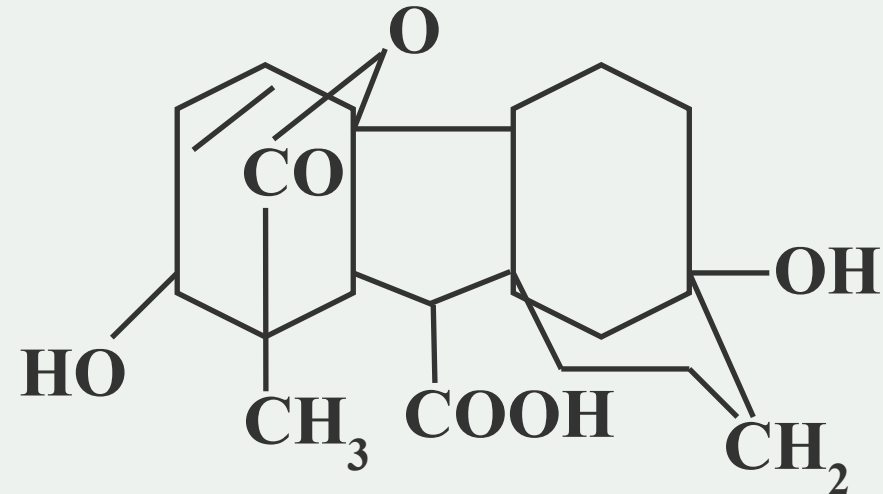
## Этилен



## Цитокинины



## Гиббереллины



# Регуляция морфогенеза с помощью растительных гормонов *in vitro*



# Различные типы каллуса



*Плотный тип каллуса*



*Рыхлый тип каллуса*



*Некротические области  
на каллусе*



*Тератома*

# Роль генотипа в формировании различных типов каллуса



*Гипокотили томата  
(сорт Алпатьева-905),  
формирующие каллус*

*Экспланты гипокотыля томата  
(сорт Таллалихина),  
формирующие каллус и корни*

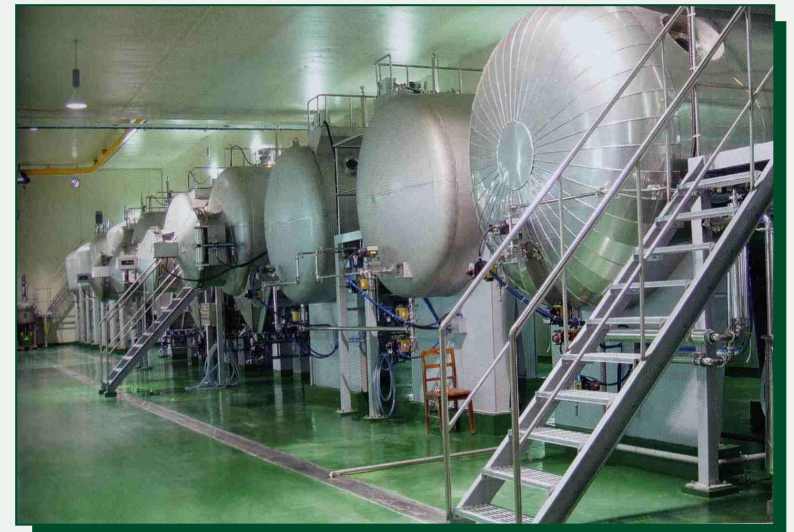


## Организация работы в лаборатории



# Микрклональное размножение ценных генотипов





*Получение различных веществ из  
клеточных культур – продуцентов  
в специальных ферментерах*



# Биотехнология и ее возможности

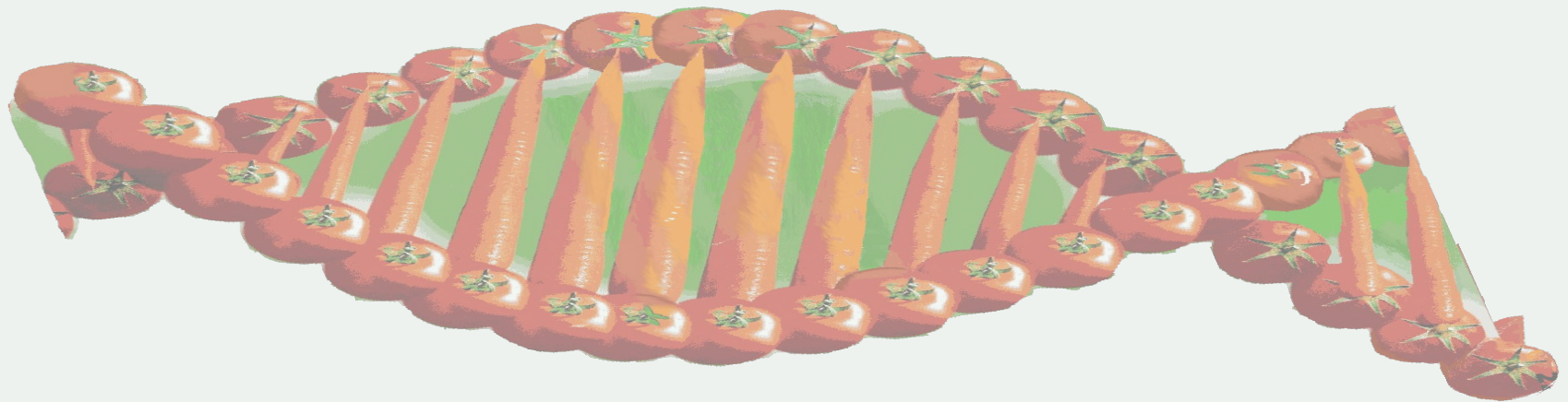
*Методы, облегчающие и ускоряющие процесс*

*Создание генетического разнообразия и скрининг генотипов*

- 1. Преодоление несовместимости:  
А) Постгамной - эмбриональная культура незрелых зародышей  
Б) Прогамной - оплодотворение и получение гибридов *in vitro**
- 2. Оздоровление и микроклональное размножение*
- 3. Экспериментальная гаплоидия*
- 4. Криосохранение генофонда*

- 1. Клеточная селекция*
- 2. Соматическая гибридизация*
- 3. Клонирование генов и их перенос с помощью трансформации*

**Использование клеточных культур как  
продуцентов веществ вторичного  
метаболизма и для получения  
искусственных семян**



# Промышленное использование некоторых растительных продуктов (по Фаулеру)

Отрасль производства	Растительный продукт	Вид растения	Использование
Фармацевтическая	Кодеин (алкалоид)	<i>Papaver somniferum</i>	Болеутоляющее средство
	Диосгенин	<i>Dioscorea deltoidea</i>	Противозачаточное средство
	Хинин (алкалоид)	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Антималарийное средство
	Дигоксин (сердечный гликозид)	<i>Digitalis lanata</i>	Препарат, тонизирующий сердечную деятельность
	Скополамин (алкалоид)	<i>Datura stramonium</i>	Понижающее давление средство
	Винкристин (алкалоид)	<i>Catharanthus roseus</i>	Антилейкемическое средство
Химическая	Пиретрин	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Инсектицид
Пищевая	Хинин (алкалоид)	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Вещество, усиливающее горечь
	Тауматин (халькон)	<i>Thaumatococcus danielli</i>	Низкокалорийное вещество, заменяющее сахар
Производство косметики	Жасмин	<i>Jasminum</i> sp.	Отдушки

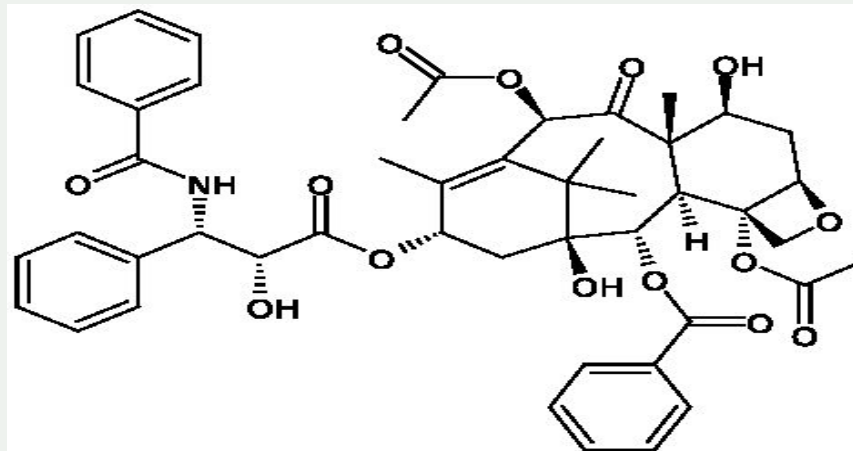
# Преимущества биотехнологического производства вторичных метаболитов

- Процесс биосинтеза происходит в контролируемых условиях
- Отсутствие негативно влияющих на процесс факторов
- Возможность отбора высокопродуктивных клеточных линий
- Автоматизация процесса
- Снижение затрат на производство

# Коммерческая ценность некоторых вторичных соединений

Product	Use	Plant species	Cost (US\$ per kilogram)
Ajmalicine	Antihypertensive	<i>Cath. roseus</i>	37,000
Artemisinin	Antimalarial	<i>Artemisia annua</i>	400
Ajmaline	–	<i>Ra. serpentina</i>	75,000
Acinitine	–	<i>Acotinum spp.</i>	n/a
Berberine	Intestinal ailment	<i>C. japonica</i>	3250
Camptothecin	Antitumour	<i>Camptotheca acuminata</i>	432,000
Capsaicin	Counterirritant	<i>Ca. frutescens</i>	750
Castanospermine	Glycoside inhibitor	<i>Castanospermum australe</i>	n/a
Codeine	Sedative	<i>P. somniferum</i>	17,000
Colchicine	Antitumour	<i>Colchium autumnale</i>	35,000
Digoxin	Heart stimulant	<i>Di. lanata</i>	3000
Diosgenin	Steroid precursor	<i>Dioscorea deltoidea</i>	1000
Ellipticine	Antitumour	<i>Orchrosia elliptica</i>	240,000
Emetine	–	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	1500
Forskolin	Bronchial asthma	<i>Coleus forskolii</i>	n/a
Ginsenosides	Health tonic	<i>Panax ginseng</i>	n/a
Morphine	Sedative	<i>P. somniferum</i>	340,000
Podophyllotoxin	Antitumour	<i>Podophyllum petalum</i>	n/a
Quinine	Antimalarial	<i>Cinchon. ledgeriana</i>	500
Sanguinarine	Antiplatelet	<i>Sanguinaria canadensis</i>	4,800
Shikonin	Antibacterial	<i>L. erythrorhizon</i>	4500
Taxol	Anticancer	<i>Taxus brevifolia</i>	600,000
Vincristine	Antileukemic	<i>Cath. roseus</i>	2,000,000
Vinblastine	Antileukemic	<i>Cath. roseus</i>	1,000,000

# Таксол

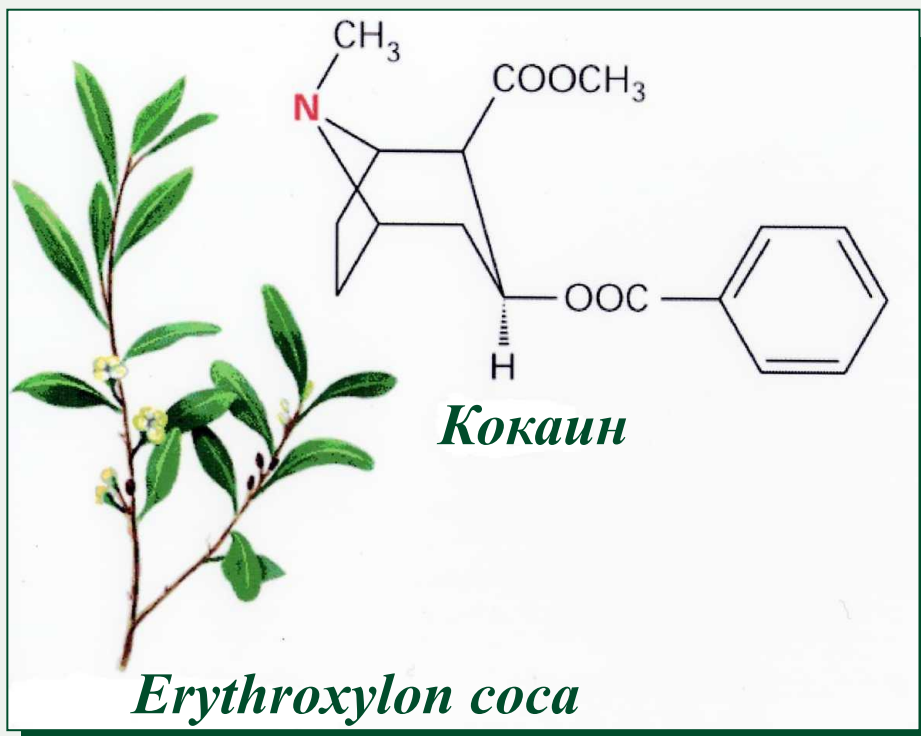


- Тритерпеновое производное, содержится в коре тихоокеанского тиса *Taxus brevifolia* в количестве 0.001%
- Эффективен при подавлении раковых опухолей различного генезиса
- Вековое дерево содержит 300мг таксола – 1 дозу
- 11 хиральных атомов C -  $2^{11} = 2048$  стереоизомеров
- Сегодня существуют суспензионные культуры, синтезирующие 200 мг таксола на 1 л жидкой культуры
- Клеточные культуры получены на основе -*T. brevifolia*
- - *T. cuspidata*
- -*T. suspidata*

# Клеточные культуры

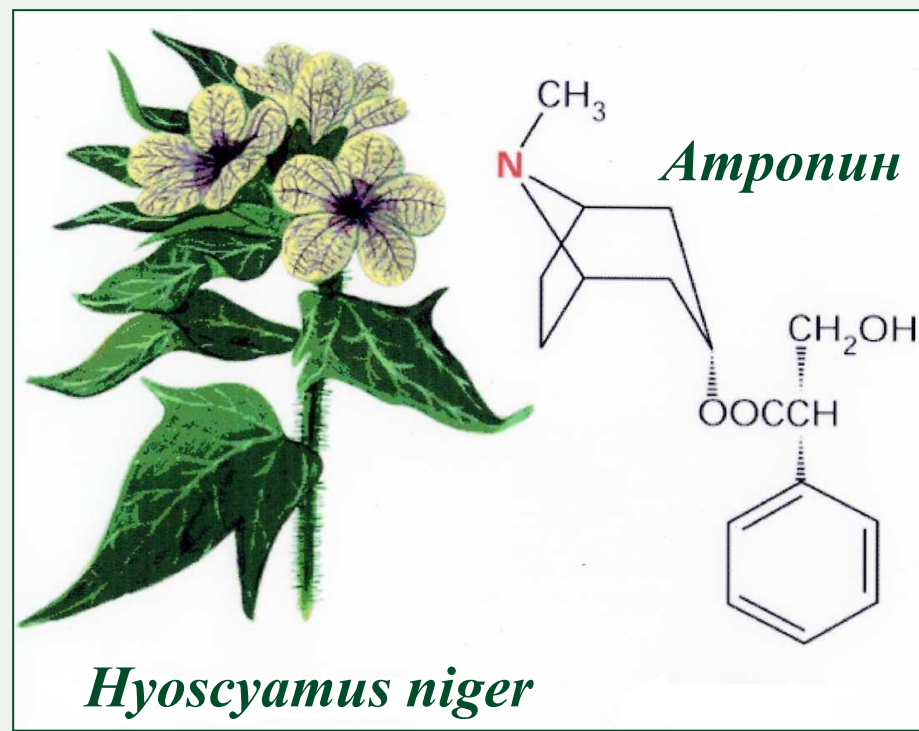


## Примеры растений-продуцентов



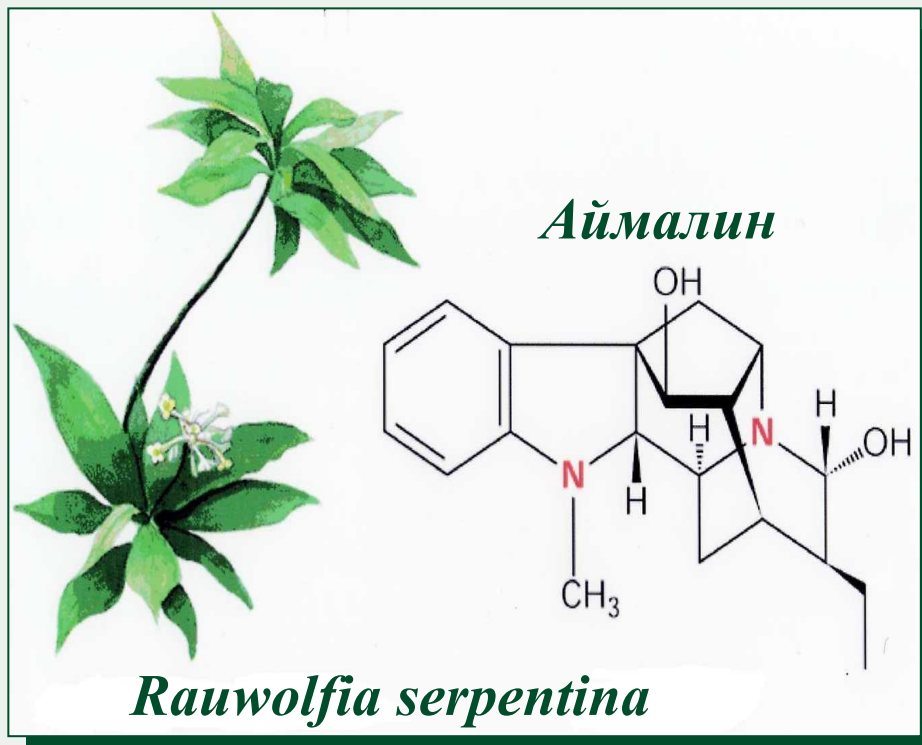
*Структура алкалоида – кокаина, стимулятора ЦНС, получаемого из Erythroxylon coca-кокаиновый куст*

*Структура антихолинэргического алкалоида – атропина, получаемого из Hyoscyamus niger-белена черная*



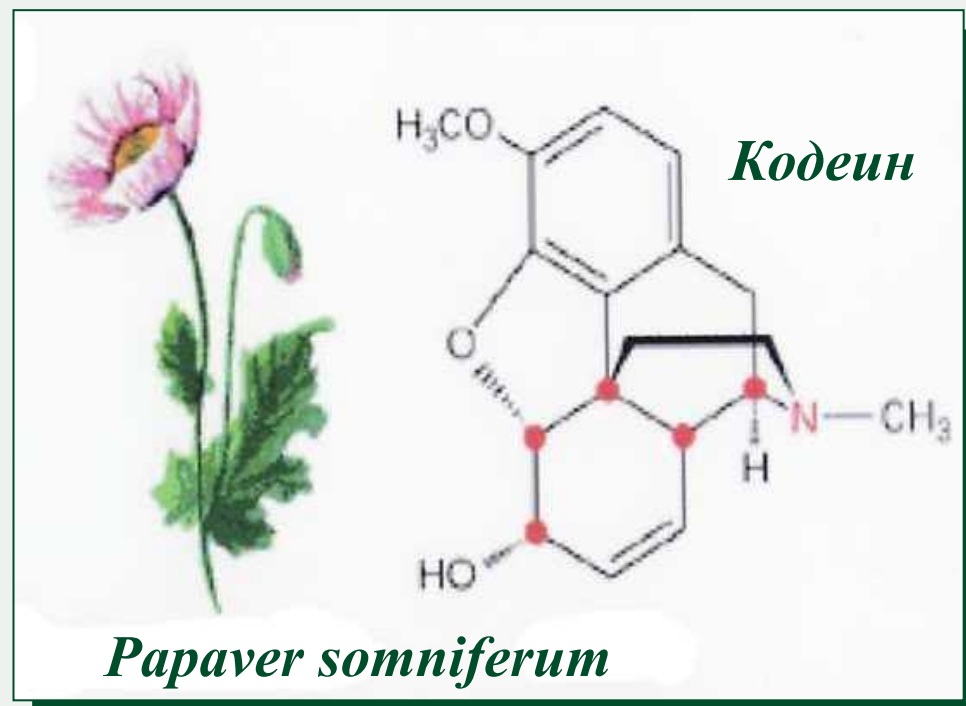


# Примеры растений-продуцентов



*Структура монотерпеноидного  
индольного алкалоида –  
аймалина, получаемого из  
Rauwolfia serpentina – раувольфия  
змеиная*

*Структура  
алкалоида – кодеина, получаемого  
из Papaver somniferum –  
снотворный мак*



# Получение дигоксина\* из растений наперстянки (*Digitalis purpurea*)

\* Используется в терапии сердечно-сосудистых заболеваний и рака, блокируя продукцию пептида NIF-1



# Клеточные культуры используют:

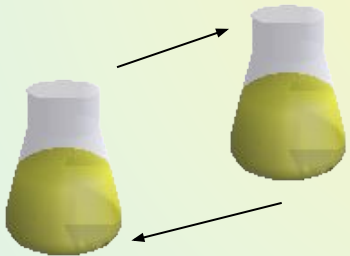
## 2. Для получения суспензионных культур

*Рыхлый каллус*



*Культуру каллусных клеток в жидкой среде культивируют на качалке*

*Пассирование*



*Сформированная суспензионная культура (единичные клетки и небольшие агрегаты из 8-12 клеток)*

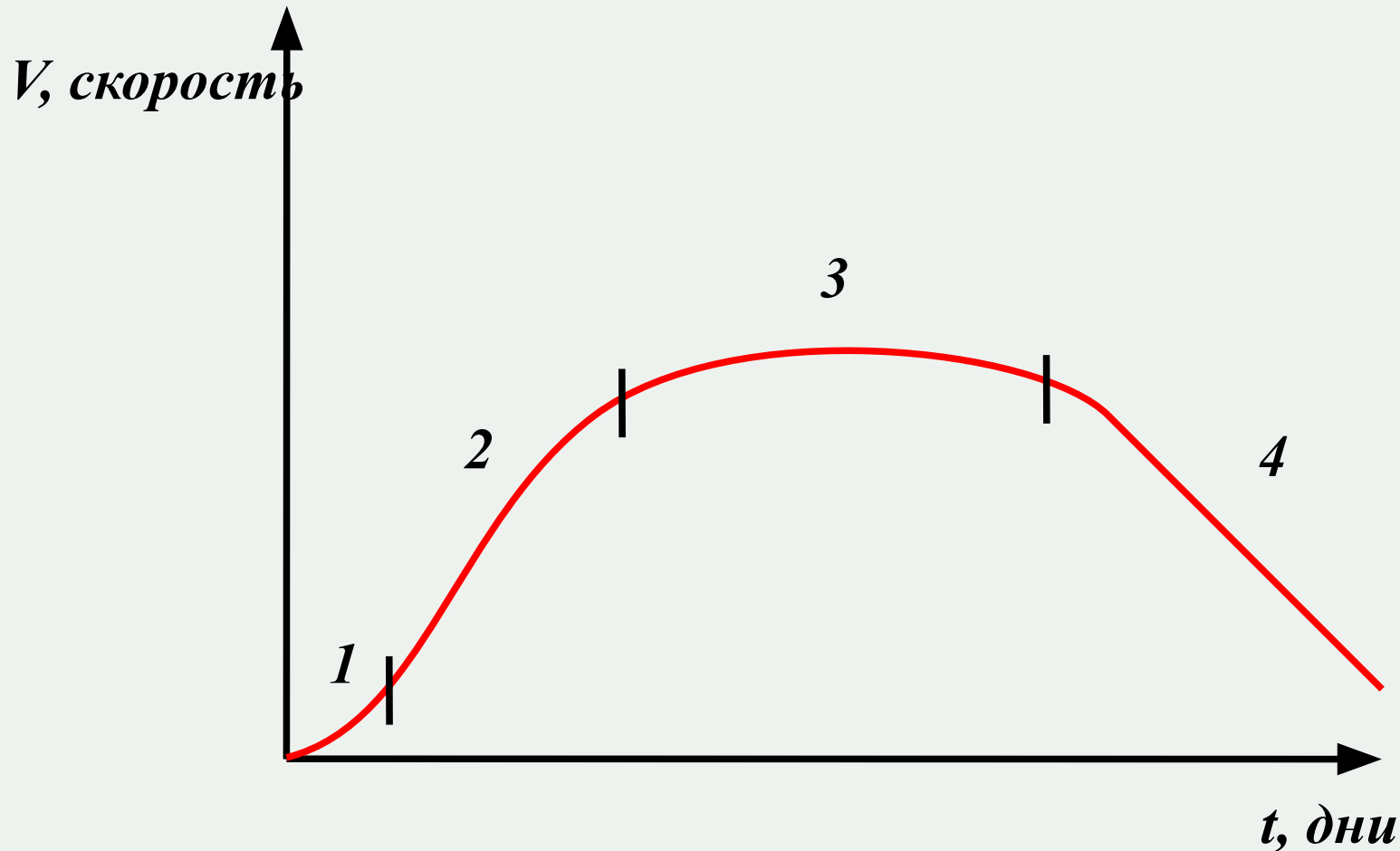


*Схема получения суспензионной культуры*

*Для производства используют как каллусные, так и суспензионные культуры клеток растений-продуцентов*



# Закономерности роста культуры растительных клеток



*1 – лаг-фаза*

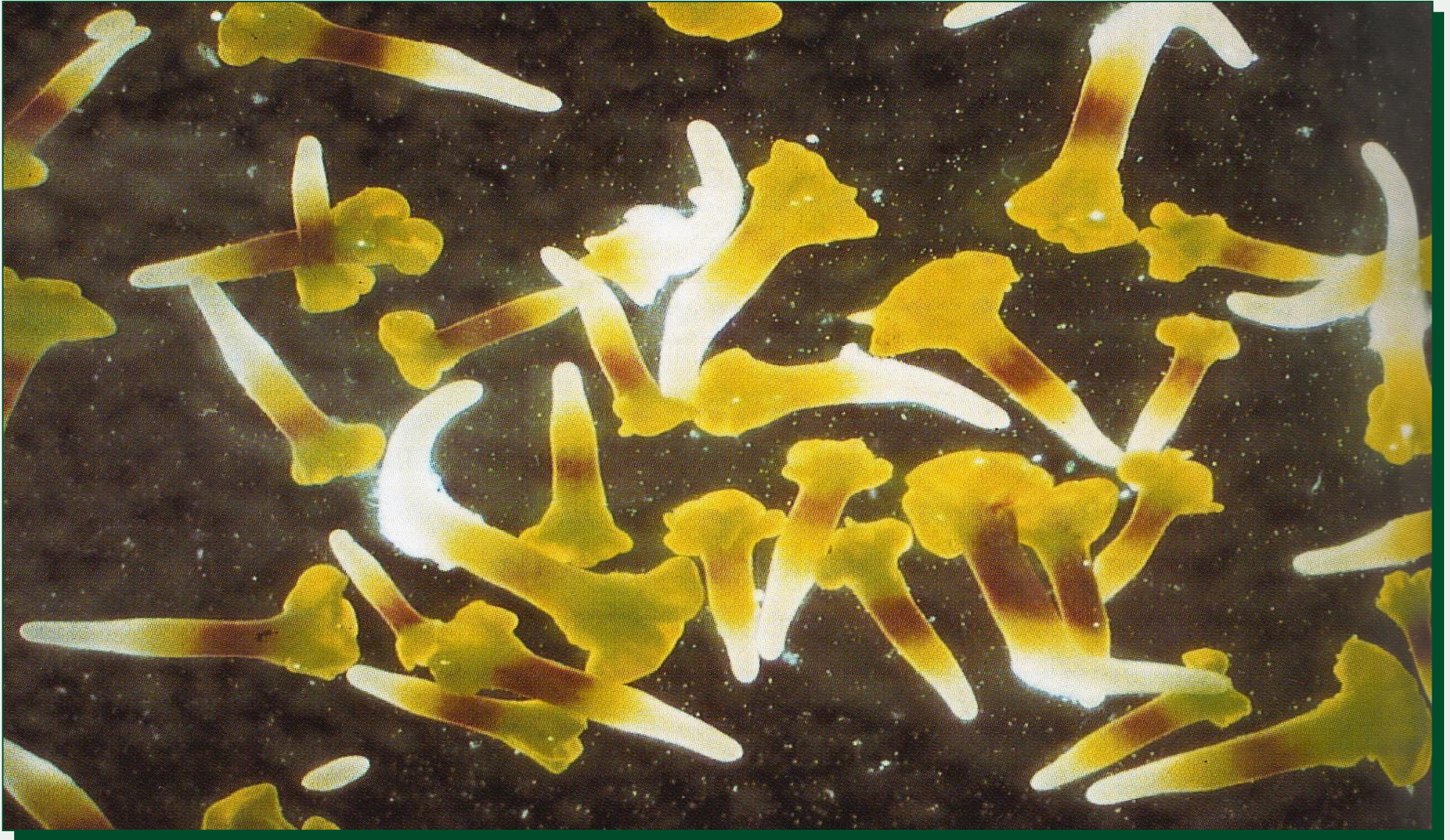
*2 – активный рост*

*3 – плато стационарной фазы*

*4 – гибель клеток*

## Клеточные культуры используют:

### 3. Для получения искусственных семян

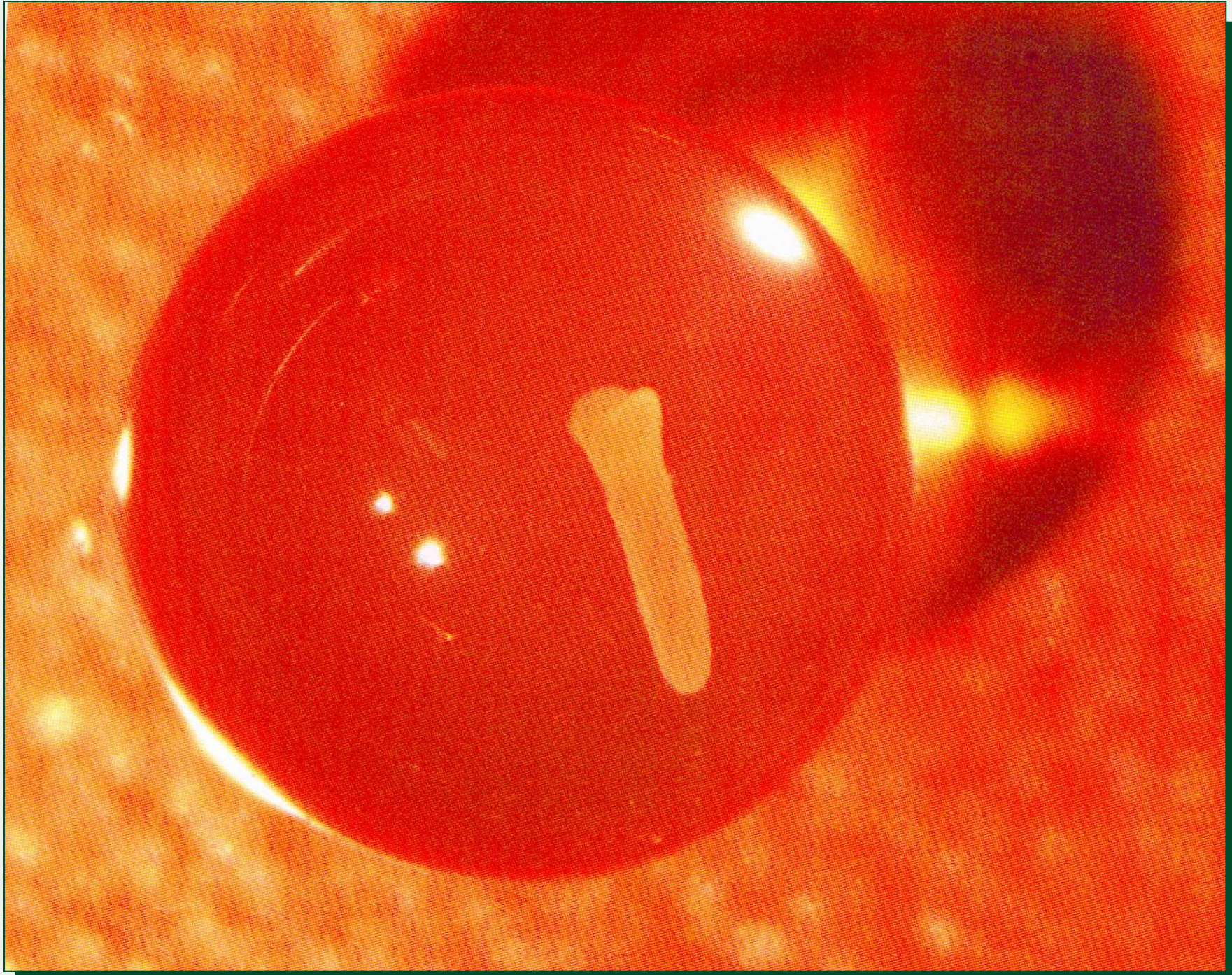


*Информация о генетическом контроле эмбриогенеза важна и для биотехнологии, поскольку соматический эмбриогенез используется для размножения ценных генотипов*

# Соматический эмбриогенез

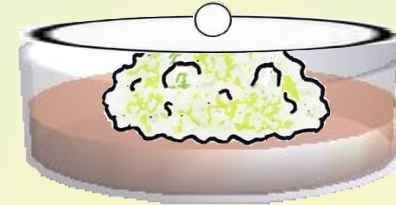


# Искусственные семена моркови

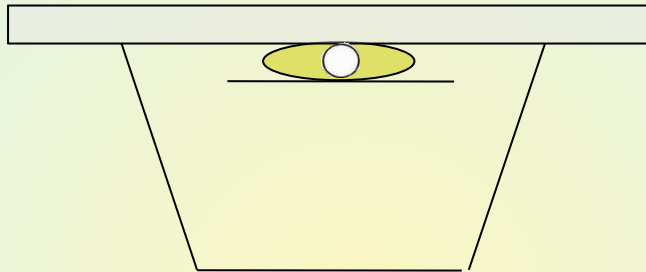


# Разработка методов культивирования единичных клеток in vitro

## 1. Метод культуры-няньки автор: Р. Г. Бутенко



*На активно растущий каллус помещают фильтровальную бумагу с единичной клеткой на ней*



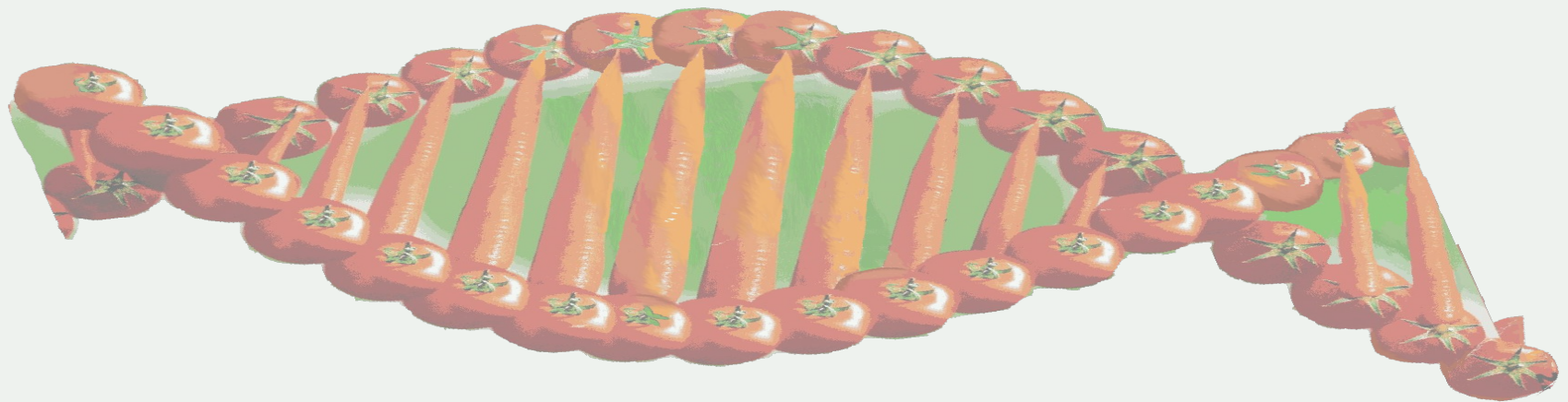
*На предметное стекло с лункой наносят каплю питательной среды и в каплю помещают единичную клетку.*

*Каплю закрывают покровным стеклом и конструкцию переворачивают*

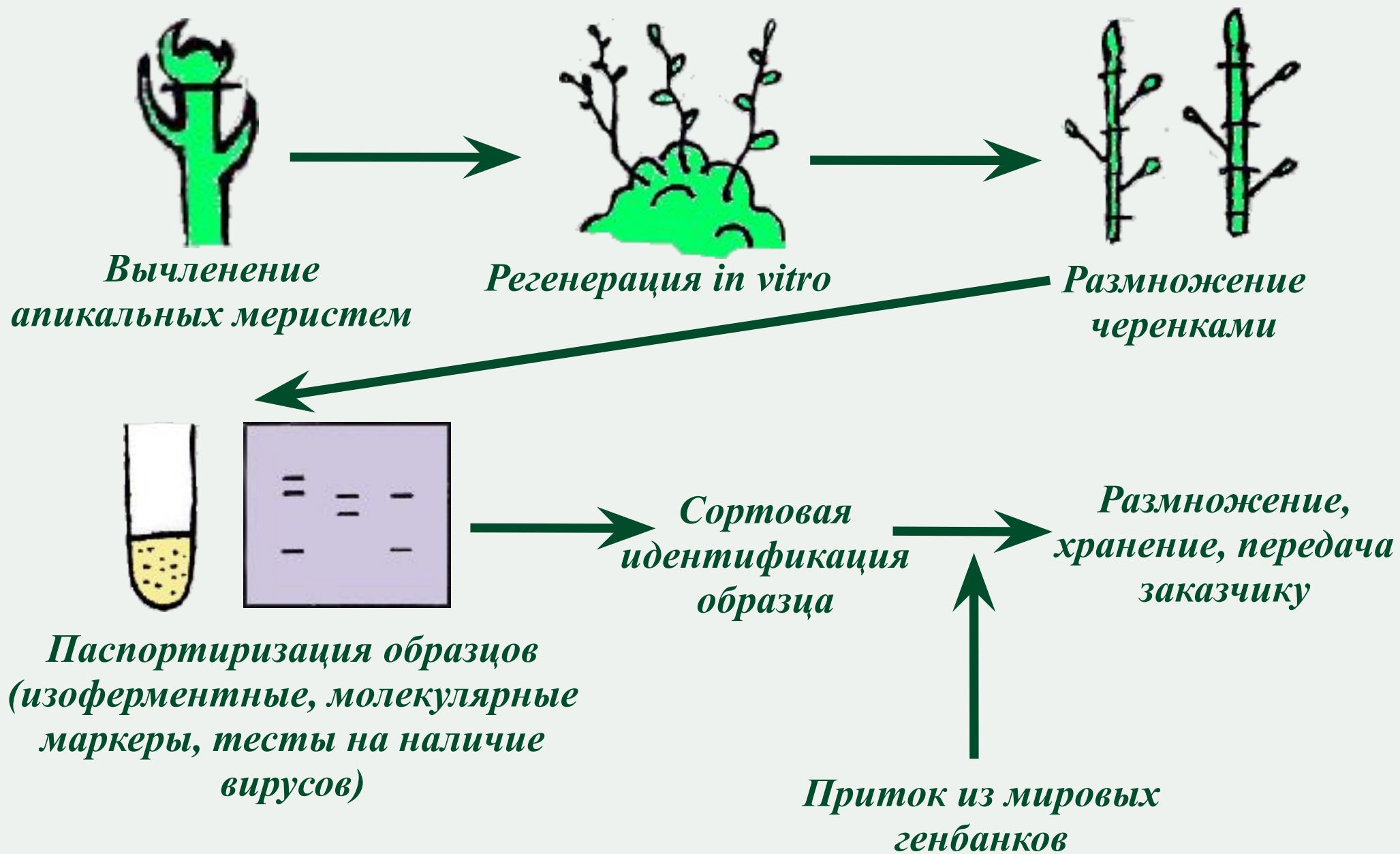
## 2. Метод висячих капель автор: Ю.Ю. Глеба

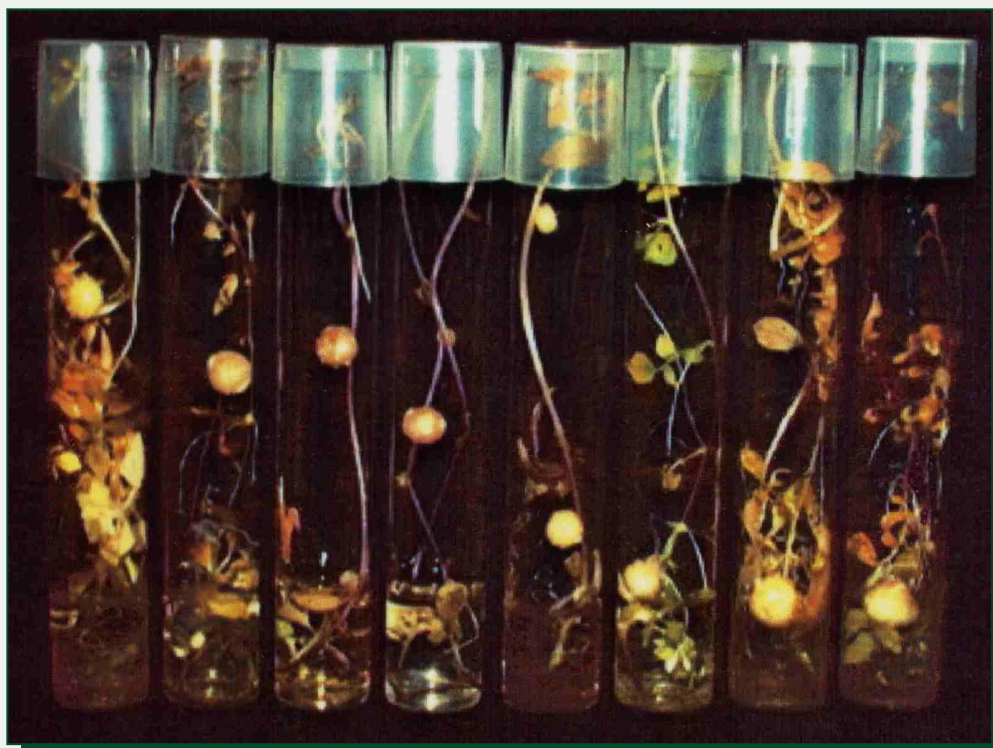


*Микроклональное*  
*размножение*



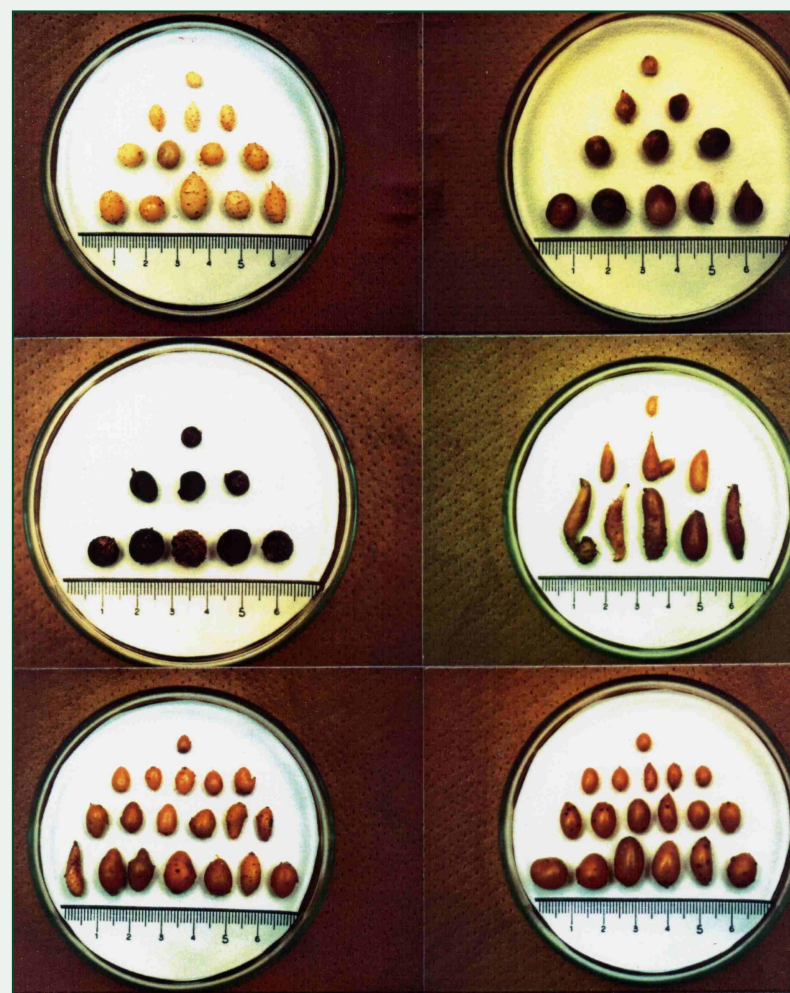
# Схема микроклонального размножения растений *in vitro*





*Микроклубни картофеля  
Solanum tuberosum различных  
сортов*

*Получение микроклубней  
картофеля  
Solanum tuberosum  
в пробирках*



# Схема получения микроклубней *in vitro*

## 1. Получение субкультуры и размножение

Вычленение апикальной меристемы



Материнское растение



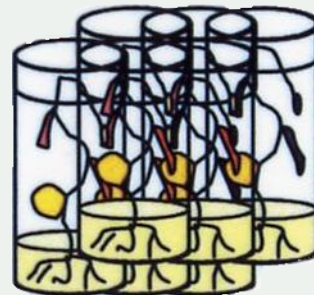
Получение субкультуры через 2-4 недели



## 2. Получение микроклубней *in vitro*



Содержание в темноте в течение 1 месяца

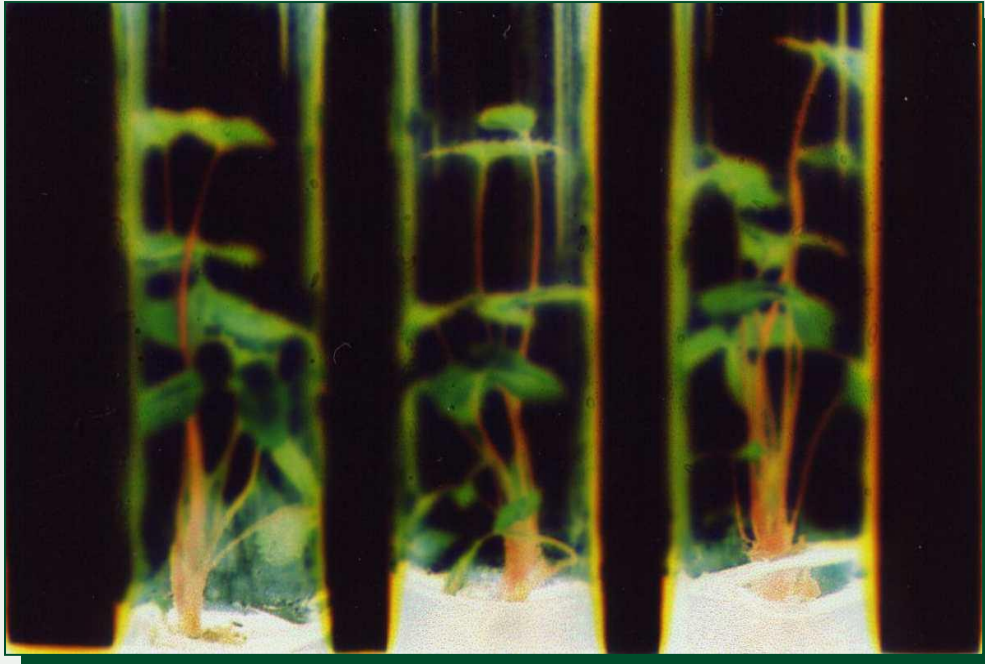


Формирование микроклубней



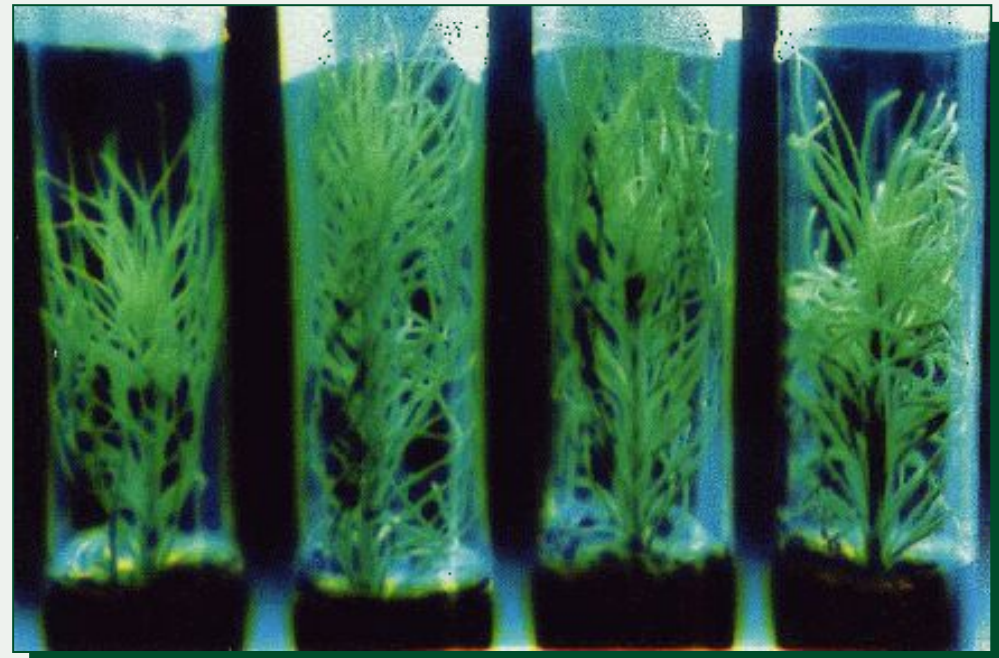
Сохранение при +4 °C

*Примеры поддержания различных культур in vitro*



*Культура земляники*

*Культура сосны*

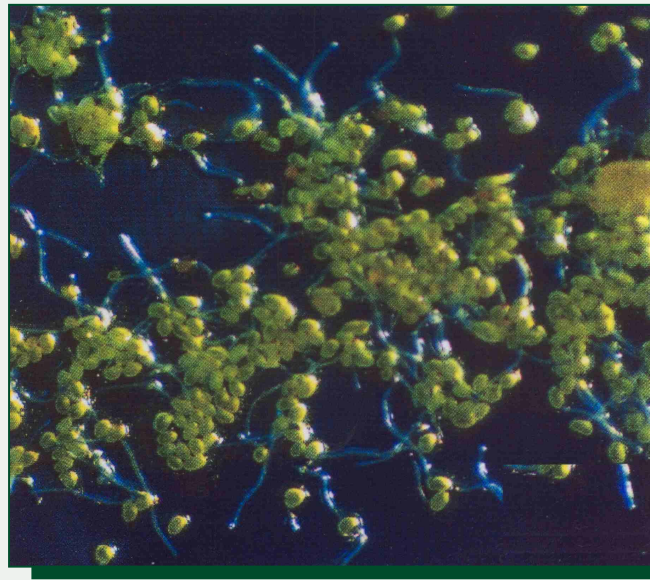
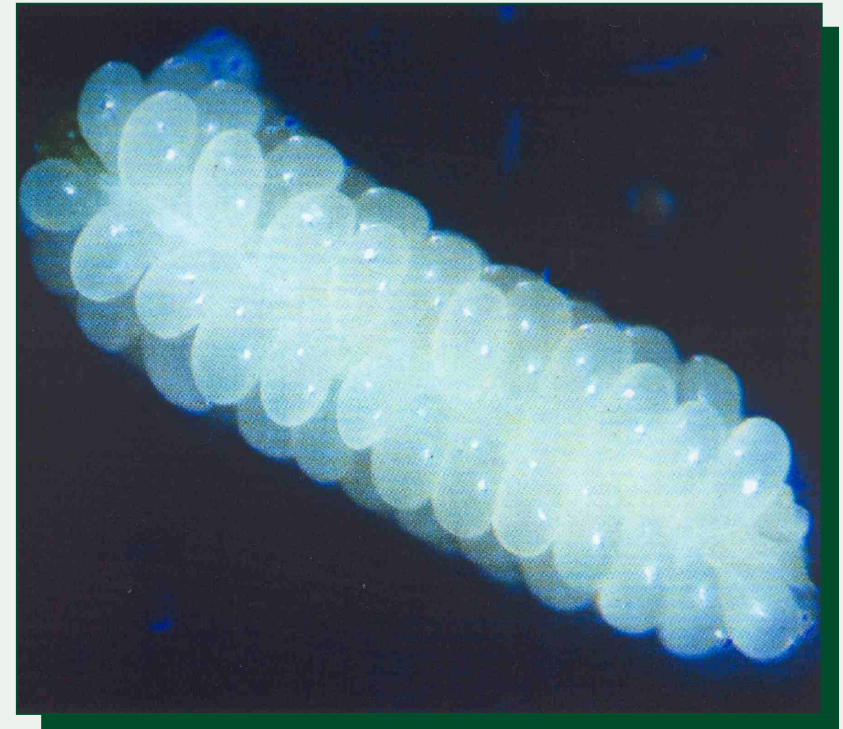


# Получение отдаленных гибридов *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости)

*Проростание пыльцы*



*Изолированный  
зародышевый мешок*

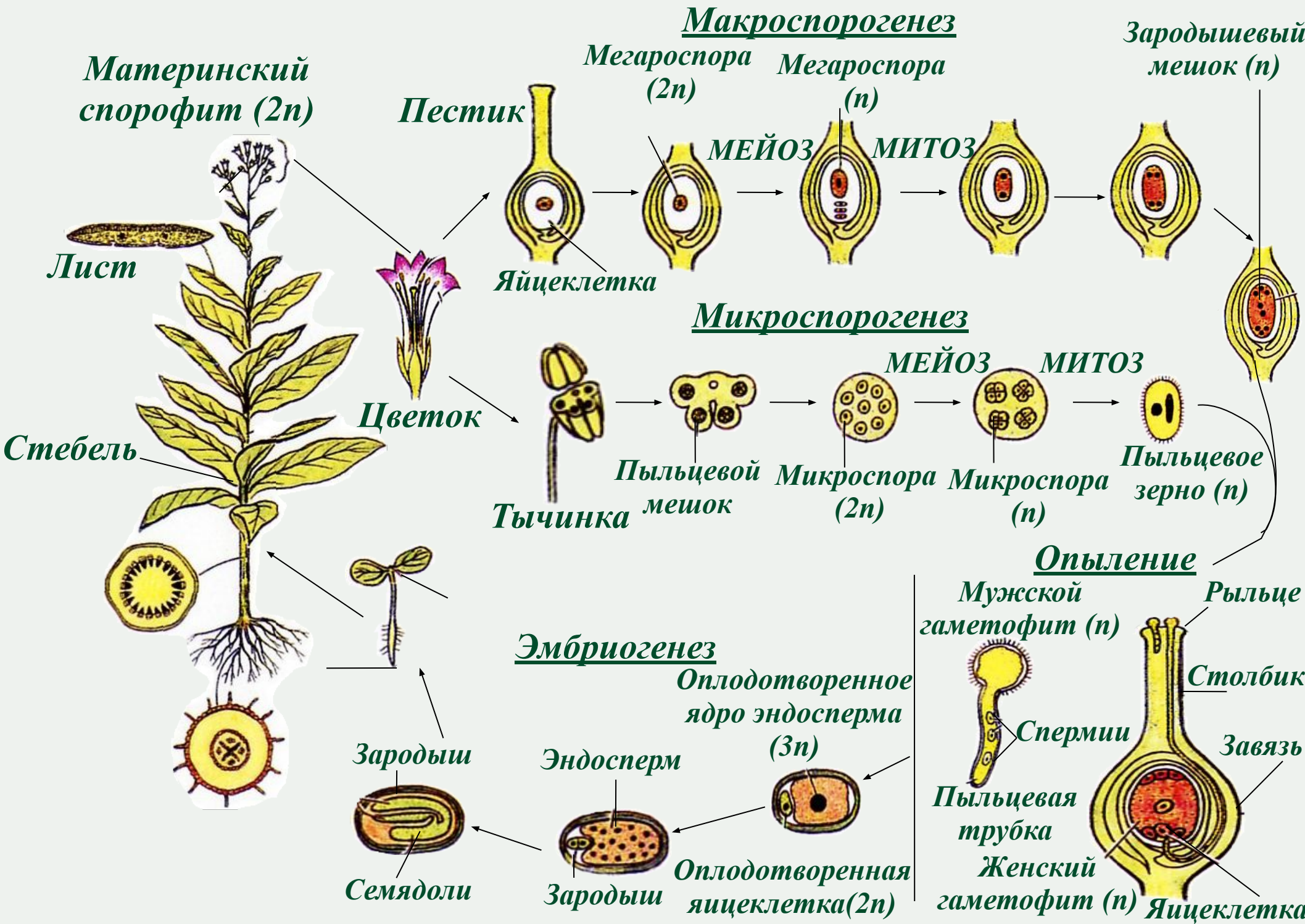


*Вокруг зародыша в условиях *in vitro* помещают прорастающую пыльцу. Пыльца начинает прорастать с эффектом внедрения в зародыш и оплодотворяет яйцеклетку*

*Экспериментальное получение гаплоидов in vitro*

- 1) Получение гаплоидных растений на основе андрогенеза
- 2) Получение гаплоидных растений на основе гиногенеза
- 3) Получение гаплоидных растений на основе галопродюсеров

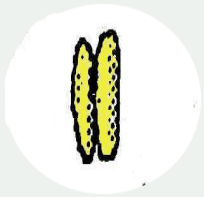
# Схема двойного оплодотворения





# Схема получения гаплоидов на основе андрогенеза

*Условия in vivo*



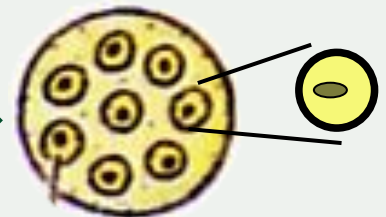
Пыльники



Пыльцевой мешок



Материнская микроспора (2n)



Мейоз



Микроспоры (n)

Митоз I

Митоз II

Многоядерная клетка с гаплоидными (n) ядрами

Индукция равного деления

Индукция гибели одного из гаплоидных ядер

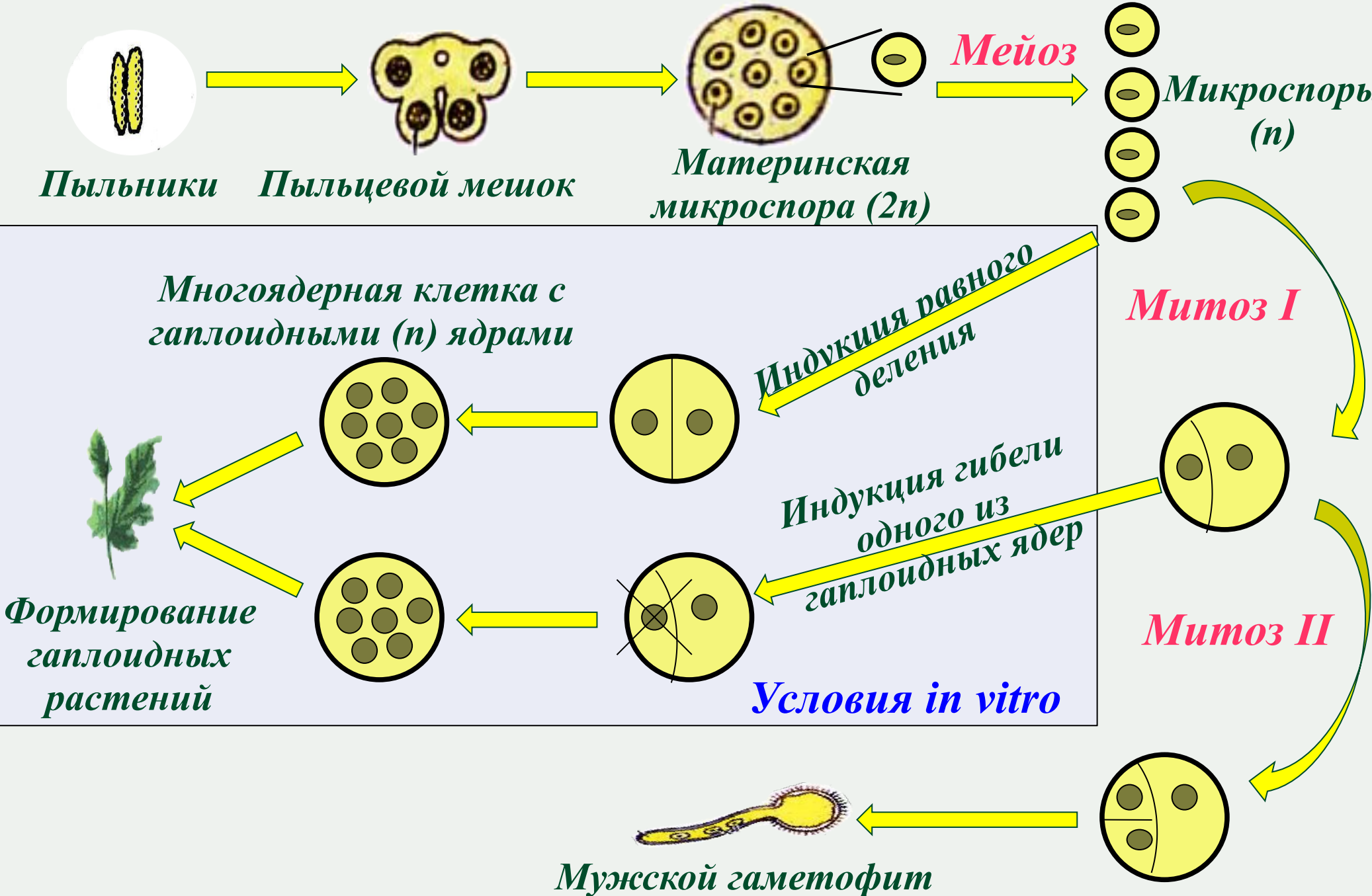
*Условия in vitro*



Формирование гаплоидных растений



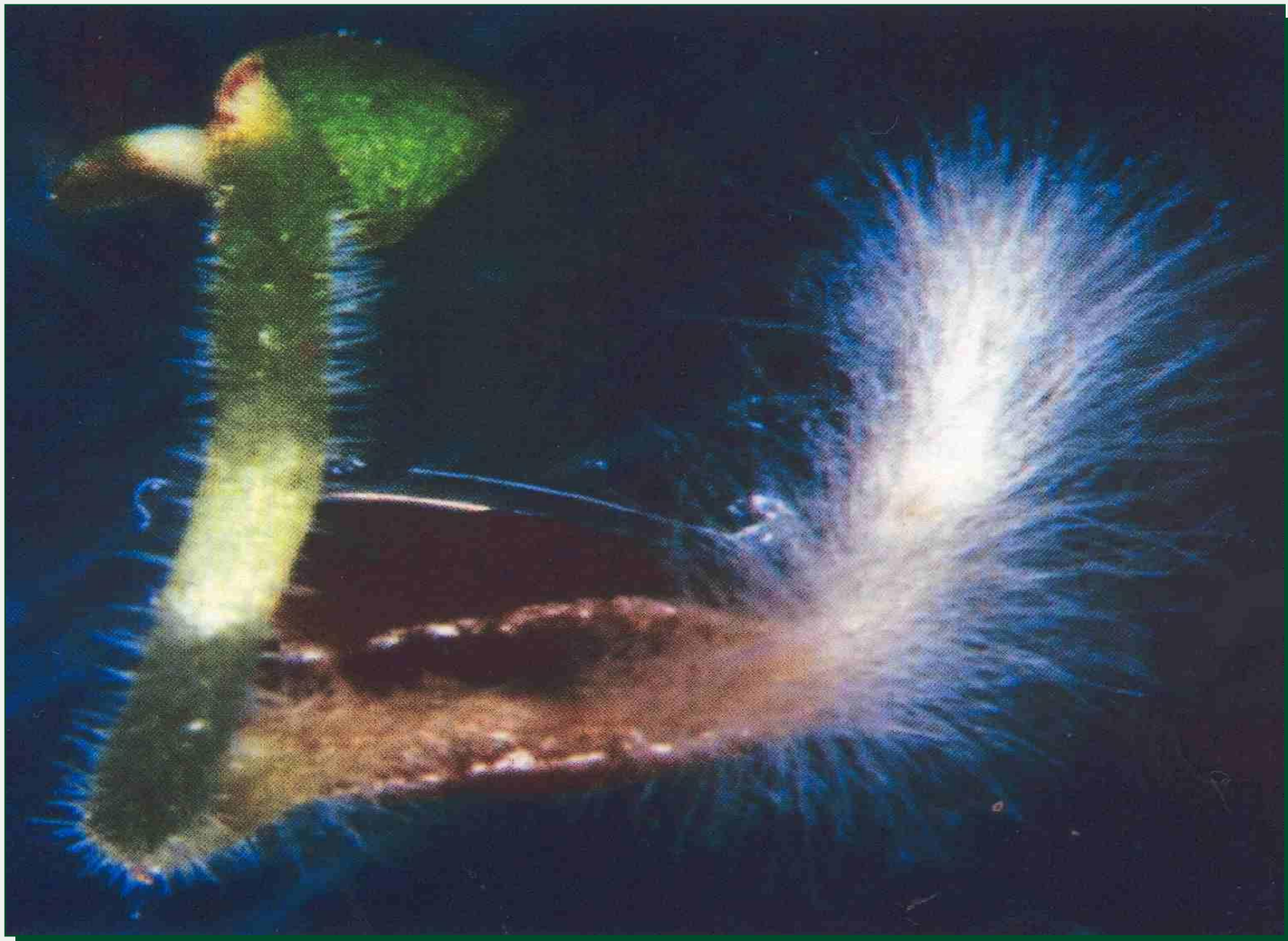
Мужской гаметофит



Формирование каллусов на поверхности  
пыльников



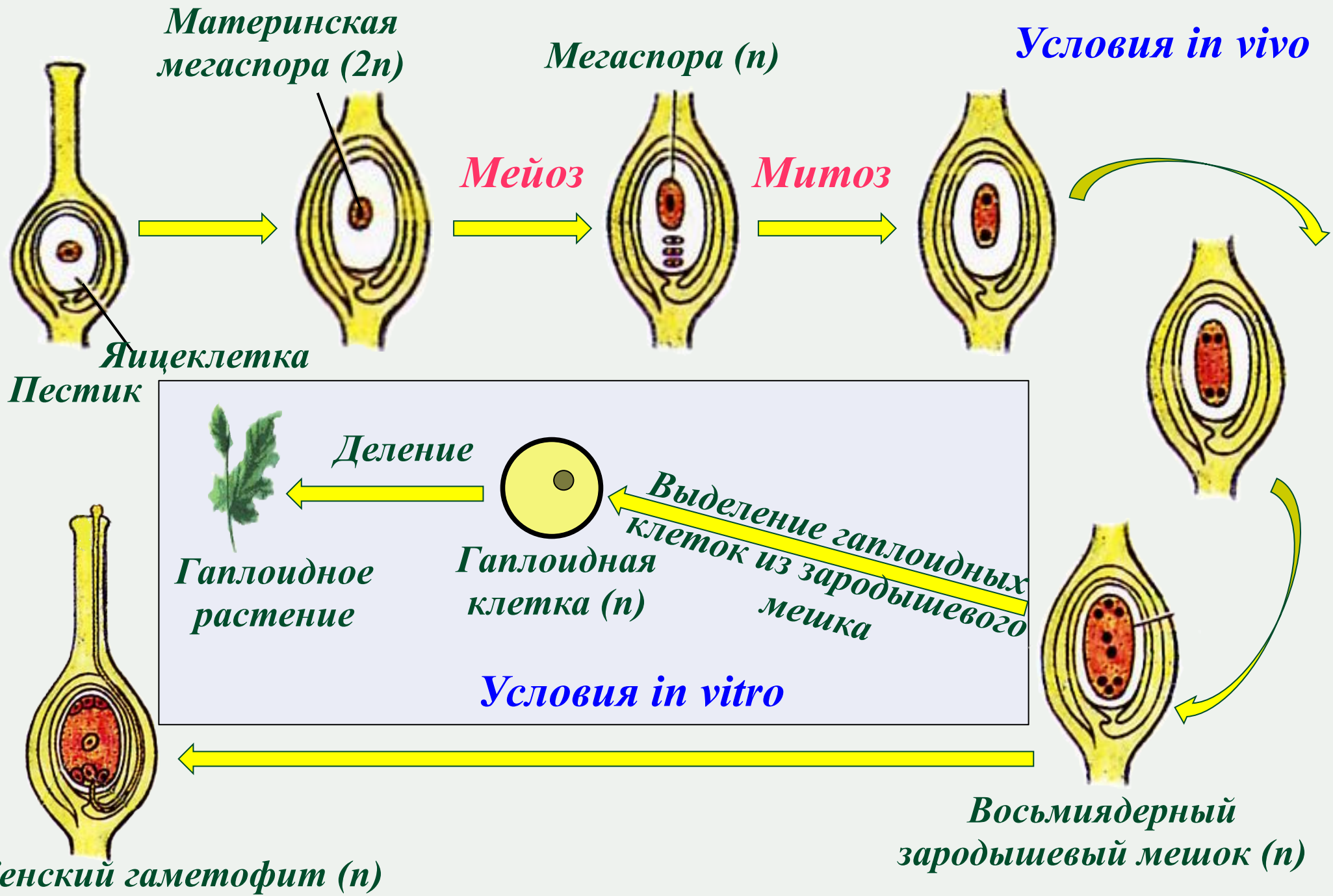
Гаплоидное растение табака  
(*N. tabacum*)



# Типы андрогенеза in vitro



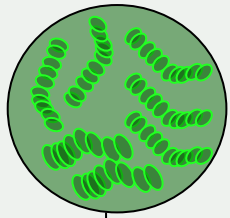
# Схема получения гаплоидов на основе гиногенеза



Формирование гаплоидного растения из гаплоидных клеток зародышевого мешка (сахарная свекла)



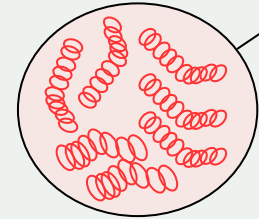
# Получение гаплоидов на основе гаплопродюсеров



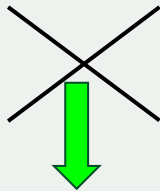
*N. vulgaris* (VV)  
( $2n=14$ )



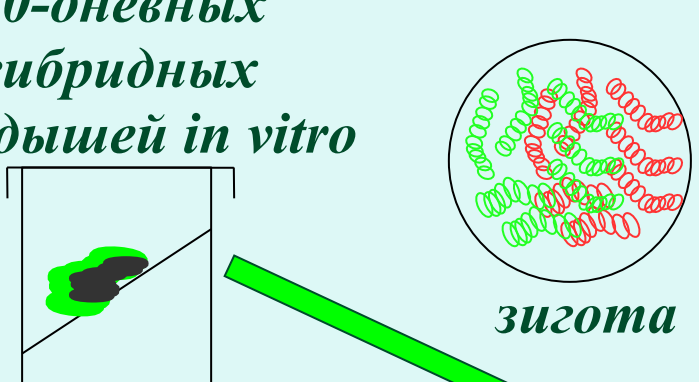
гаметы



*N. glauca* (BB)  
( $2n=14$ )



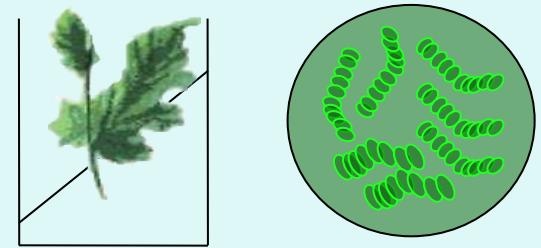
Культивирование  
10-дневных  
гибридных  
зародышей *in vitro*



зигота

Элиминирование  
В хромосом

Гаплоидное растение (V)  
( $2n=7$ )



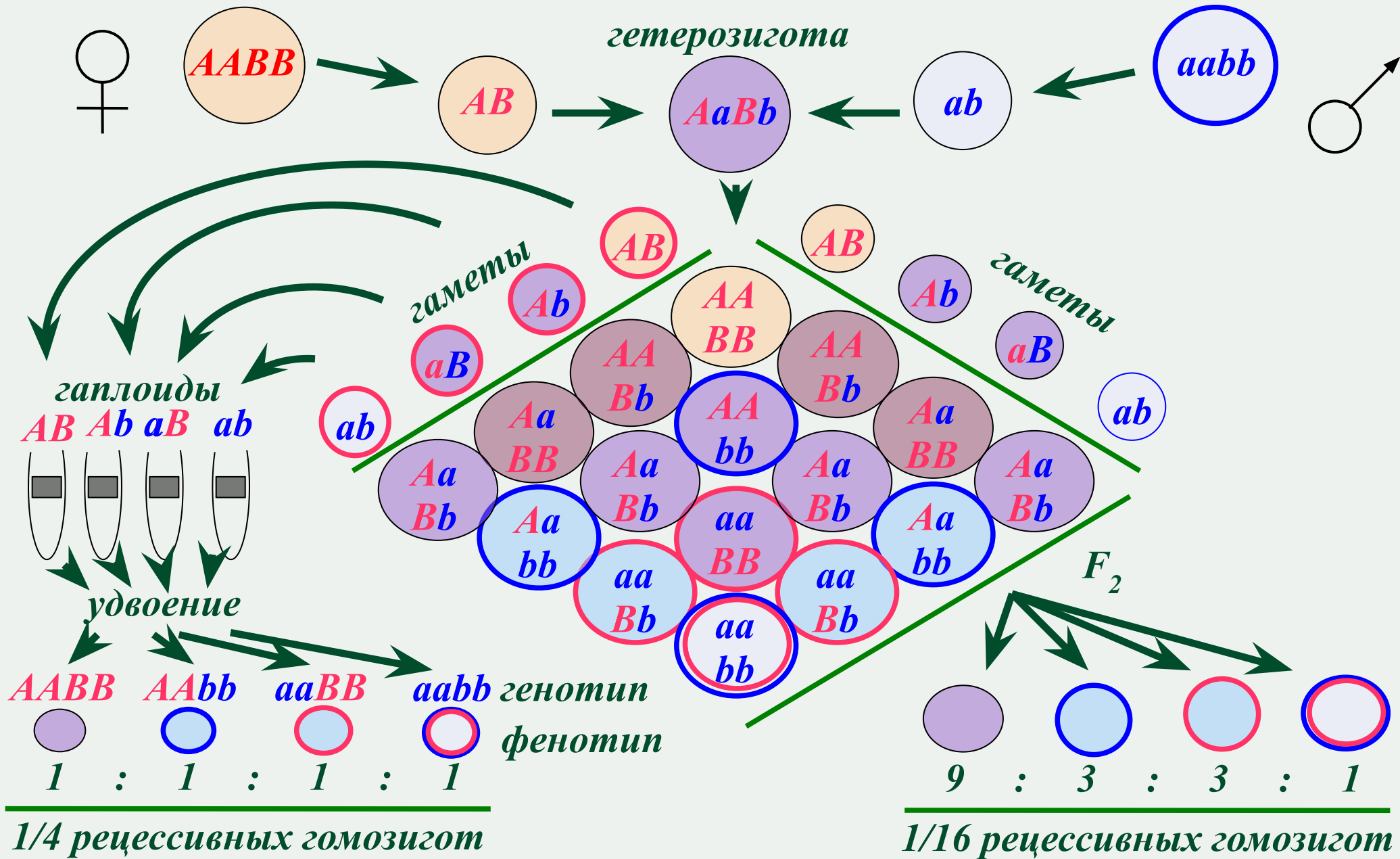
Удвоение хромосом  
(колхицинирование)

Диплоидное растение (VV)  
( $2n=14$ )



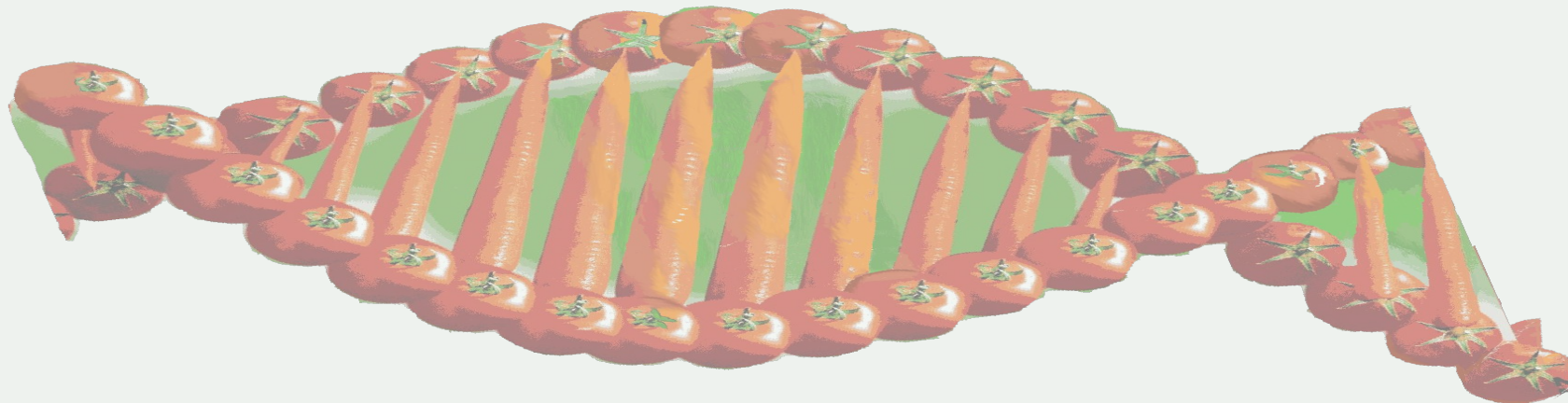
Стабильная гомозигота

# Эффективность получения рецессивных гомозигот по двум селективируемым признакам у диплоидов и дигамплоидов





# Соматоклональная изменчивость



*“Природа и скорость изменчивости, возникающей  
in vitro, выявляет хрупкость генома растений при  
нарушении нормального хода развития”*

*У. Р. Скаукрофт, 1990*

## Типы соматклональной изменчивости

1. **Нестабильность клеточной культуры — изменчивость, проявляющаяся на уровне каллуса**
2. **Соматклональная изменчивость — генетическая изменчивость, накапливаемая *in vitro* и проявляющаяся на уровне растения-регенеранта**

*Примеры нестабильности генома,  
проявляющиеся на уровне каллуса*

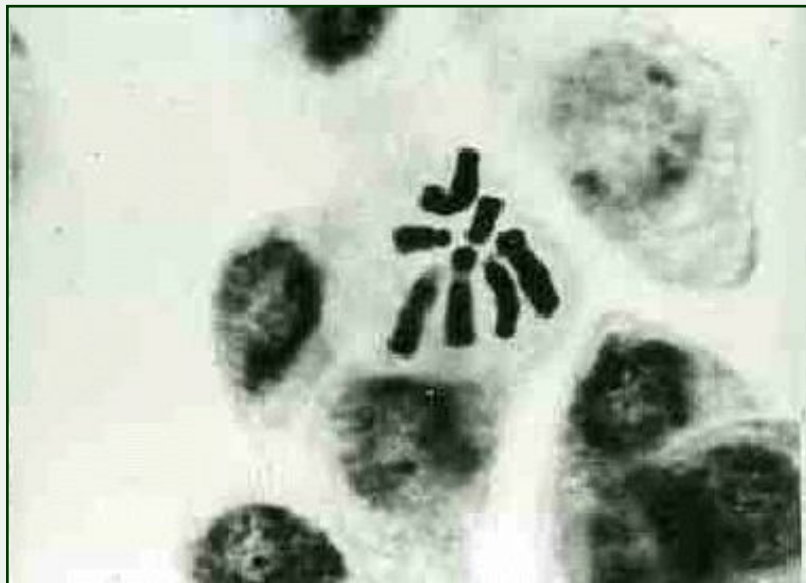


*Каллус гаплопартуса*

*Хромосомы гаплопартуса*



*Метафазные пластинки хромосом гаплопруса*



*Коллекция мутантов кукурузы,  
полученных in vitro*



*Коллекция мутантов*  
*кукурузы, полученных in vitro*



*Коллекция мутантов томатов,*  
*полученных in vitro*



**Genetic variation among cultivars and related species of tomato for fruit characteristics which includes variation for size, shape, and color.**



Koornneef M , Stam P Plant Physiol. 2001;125:156-159





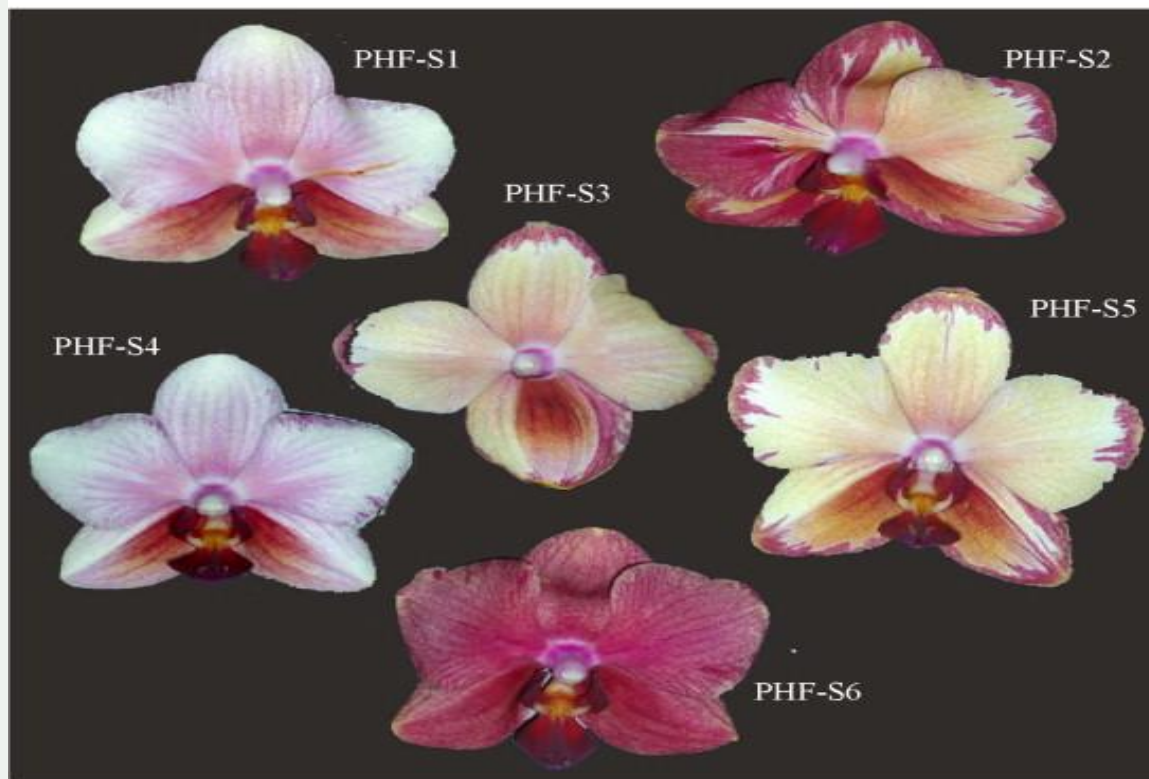
# Соматклоны орхидеи



(A)



(B)



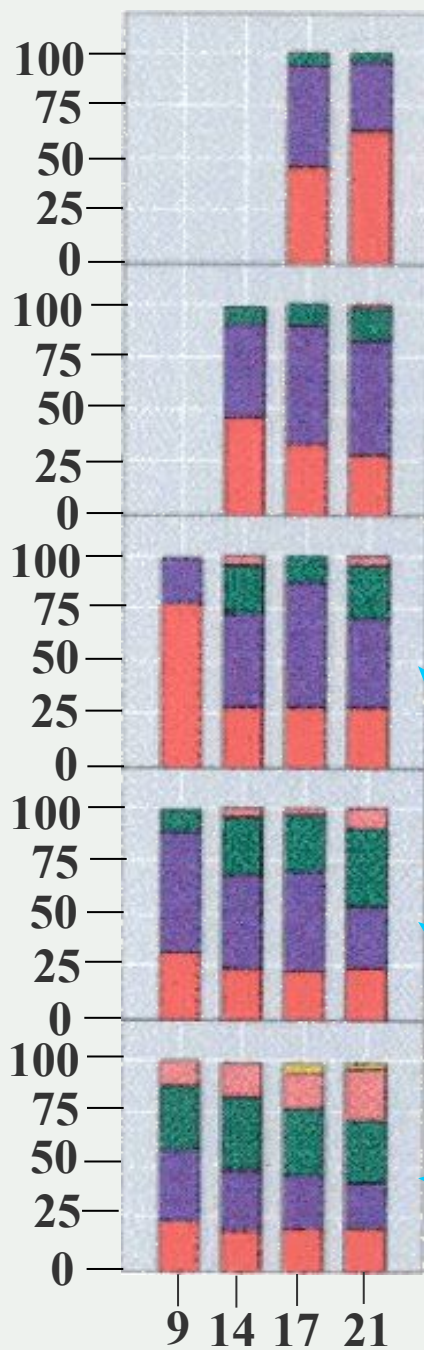
(C)

**Факторы, влияющие на**  
**сомаклональную изменчивость**

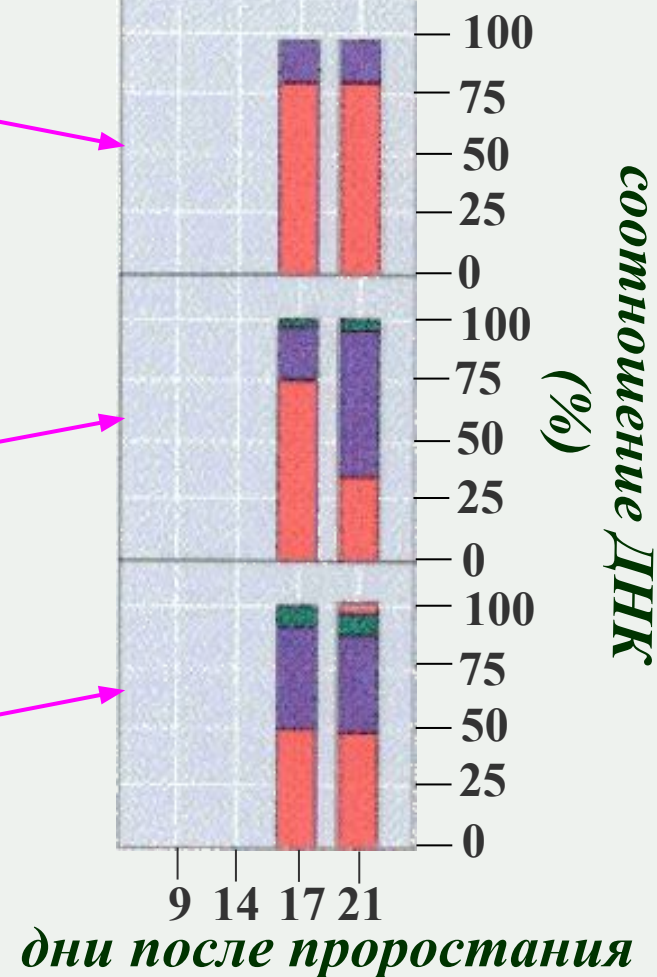
- 1) Способ размножения – половое, бесполое**
- 2) Изменчивость, предшествующая и возникающая в процессе культивирования**
- 3) Генотип**
- 4) Типы эксплантов и методы культивирования**
- 5) Продолжительность культивирования**

# Реорганизация ДНК в процессе морфогенеза

соотношение ДНК (%)



дни после проростания



дни после проростания

соотношение ДНК (%)



# Причины соматклональной изменчивости

*Генетическая гетерогенность соматических клеток экспланта:*

*а) соматические мутации*

*б) запрограммированные изменения генома в онтогенезе*

*Генетическая гетерогенность культивируемых клеток*

*Мутагенез*

*Включение механизмов адаптации*

*Изменение уровня метилирования*

*адаптации*

*Амплификации и делеции*

*Активация “молчащих” генов*

*Активация транспозонов*

*Перестройки хромосом*

*Точковые мутации*

# Генетическая нестабильность у фиалки

