

Культивирование растительных клеток

• **Культуры клеток высших растений**

- Можно выделить две основные тенденции применения культур клеток высших растений :
- 1. Изучение биологии клетки, существующей вне организма, обуславливающее ведущую роль клеточных культур в фундаментальных исследованиях по генетике и физиологии, молекулярной биологии и цитологии растений.
- 2. Культивируемые клетки высших растений могут рассматриваться как типичные микрообъекты, достаточно простые в культуре, что позволяет применять к ним не только аппаратуру и технологию, но и логику экспериментов, принятых в микробиологии.

- Вместе с тем, культивируемые клетки способны перейти к программе развития, при которой из культивируемой соматической клетки возникает целое растение, способное к росту и размножению.

- Можно назвать несколько направлений создания современных технологий на основе культивируемых клеток растений:
- 1. Получение биологически активных веществ растительного происхождения:
 - - традиционных продуктов вторичного метаболизма (токсинов, гербицидов, регуляторов роста, алкалоидов, стероидов, терпеноидов, имеющих медицинское применение);
 - - новых необычных соединений, что возможно благодаря исходной неоднородности клеточной популяции, генетической изменчивости культивируемых клеток и селективному отбору клеточных линий со стойкими модификациями, а в некоторых случаях и направленному мутагенезу.
- Кроме того, суспензионные культуры могут применяться как мультиферментные системы, способные к широкому спектру биотрансформаций химических веществ. В результате биотрансформации получают уникальные биологически активные продукты на основе синтетических соединений или веществ промежуточного обмена растений.

- 2. Ускоренное клональное микроразмножение растений, позволяющее из одного экпланта получать от 10000 до 1000000 генетически идентичных растений в год.
- 3. Получение безвирусных растений.
- 4. Использование эмбриокультуры и оплодотворения *in vitro* для преодоления постгамной несовместимости или щуплости зародыша при получения растений после отдаленной гибридизации.
- 5. Антерные культуры – культуры пыльников и пыльцы – используются для получения гаплоидов и дигаплоидов.
- 6. Клеточный мутагенез и селекция. Тканевые культуры в результате соматического варьирования позволяют получать регенеранты, фенотипически и генотипически отличающиеся от исходного материала, даже без мутагенной обработки.

- 7. Криоконсервация и другие методы сохранения генофонда.
- 8. Иммуобилизация растительных клеток.
- 9. Соматическая гибридизация на основе слияния растительных протопластов.
- 10. Конструирование клеток путем введения различных клеточных органелл.
- 11. Генетическая трансформация на хромосомном и генном уровнях.
- 12. Изучение системы «хозяин – паразит» с использованием вирусов, бактерий, грибов и насекомых).

• История метода

- Самые ранние работы по изолированию культур принадлежат **Блоцишевскому (1876), Брауну и Моррису (1892), Боннэ и Саксу (1893)**. В этих исследованиях зародыши вычленялись из семени и выращивались в искусственных условиях. Первым исследователем, занявшимся установлением минимального размера экспланта, был **Карл Рехингер (1893)**. Он выращивал тонкие срезы корня свеклы и одуванчика и сегменты стебля тополя на песке с применением водопроводной воды, без стерильных условий. Эти исследования показали, что каллус образуется при толщине среза не менее 1,5 мм.

- **Готлиб Габерландт (1902)** научился культивировать отдельные клетки в течение некоторого времени. Но он выбрал для культивирования зеленые клетки, изолированные из палисадной паренхимы яснотки пурпурной и волосков традесканции вирджинской и медуницы мягкой, резонно рассудив, что при этом отпадет потребность в источниках углеводов. Габерландт также выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой клетки растения, которая впоследствии была подтверждена экспериментально и которую еще в 1892 г. сформулировал **Герман Фёхтинг** на основании результатов собственных экспериментов. При этом им была убедительно показана полярность как органов, так и клеток.
- Ряд ученых, в том числе и ученики Габерландта, последовали его примеру и также получили отрицательные результаты. Некоторые на основании этого усомнились в гипотезе тотипотентности растительных клеток. Исследования Габерландта с фотосинтезирующими клетками были неудачны, что привело к потере интереса к культивированию тканей и клеток растений. Однако они все же положили начало поиску адекватных питательных смесей и условий, необходимых для поддержания роста органов, тканей и клеток растений.

- **Мольяр в 1921г.** культивировал сегменты корня молодых побегов редьки. Они были способны к росту в условиях культуры, но при этом не происходило формирования новых тканей.
- В 1922 г. один из учеников **Рехингера - Коттэ** начал эксперименты с лишенными пигментов меристематическими тканями - изолированными кончиками корней, и добился успеха.
- Практически одновременно и независимо от **Коттэ Роббинс** подобрал состав питательной среды, обеспечивающий в культуре рост апикальной меристемы корня томатов и кукурузы. Эти опыты положили начало культивированию изолированных органов растений на питательных средах.

- Начало длительным и удачным исследованиям по культивированию клеток и тканей растений положили работы американского исследователя **Ф. Уайта** и француза **Р. Готре**. Они показали, что изолированные органы и ткани могут расти в культуре неограниченно долгое время, если их пересаживать на свежую питательную среду. Такую же способность наблюдал Ф. Уайт для клеток опухолевого происхождения. Результаты чужих и собственных экспериментов Уайт обобщил в монографии «Культура растительных тканей». В ней он выделяет несколько периодов в истории развития метода культуры клеток, тканей и органов растений:
 - 1. 1834 -1900 гг. - создание и разработка клеточной теории.
 - 2. 1900 –1922 гг. - сформулирована идея культуры тканей.
 - 3. 1922 – 34 гг. - безуспешные поиски методов, обеспечивающих длительное культивирование тканей.
 - 4. 1934 - 39 гг. - детальная разработка техники культуры растительных тканей.

- Период 1940 - 1960 гг. значительно расширил список видов, выращиваемых *in vitro*. В монографию Готре, вышедшую в 1959 г., включено уже 142 вида.
- Были разработаны составы питательных сред, изучено значение микро- и макроэлементов для поддержания нормальной ростовой активности тканей, определено влияние витаминов и стимуляторов роста. Проводились работы по выявлению значения различных натуральных растительных экстрактов для поддержания неорганизованного клеточного роста, а также для стимуляции органогенеза. Было показано значение кинетина для пролиферации клеток *in vitro* и индукции стеблевого морфогенеза. Изучением этих вопросов занимались такие ученые, как **Р. Хеллер, И. Нич, Ф. Скуг, Ф. Стевард, Р. Г. Бутенко**. В это же время разработаны методы получения и выращивания клеточных суспензий, а также культивирования отдельной клетки, деление которой индуцируется с помощью ткани-няньки.

- В 1960 - 1975 гг. положено начало методу получения изолированных протопластов из тканей корня и плодов томатов путем обработки их смесью пектолитических и целлюлолитических ферментов. Основоположник этого метода - **Э. Коккинг. Такебе** с сотрудниками определили условия культивирования изолированных протопластов, при которых они образуют клеточные стенки, делятся и дают начало клеточным линиям, способным к морфогенезу. Были разработаны методы гибридизации соматических клеток путем слияния протопластов и введения в них вирусных РНК, клеточных органелл, бактерий. В лабораториях **Р. Г. Бутенко, Ю. Ю. Глебы** проводились исследования поведения ядерного и цитоплазматического геномов партнеров в гибридных клеточных линиях и потомстве соматических гибридов растений - регенерантов. В этот же период были разработаны методы получения безвирусных растений из меристематических тканей. Начались эксперименты по созданию установок для глубинного культивирования клеток.

- Начиная с 1976 г., разрабатывались методы электрослияния протопластов и селекции гибридных клеток, культивирования гаплоидных клеток и получения новых форм и сортов сельскохозяйственных растений. Удалось создать системы иммобилизованных клеток для получения различных химических соединений и их биотрансформации. Ведутся работы по переносу генов в растительные клетки и получению трансгенных растений.

- **Культуры клеток высших растений**

- **Методы создания клеточных культур растений**

- Методы культивирования изолированных фрагментов растений основаны на исследовании такого важного свойства растительной клетки, как **тотипотентность** (свойство клетки реализовывать генетическую информацию, обеспечивающую ее дифференцировку и развитие до целого организма). В экспериментальных условиях при выращивании эксплантов возможна реализация супрессированной (подавленной) в естественных условиях тотипотентности под действием фитогормонов.
- Следует отметить, что в отличие от животной, растительная клетка предъявляет менее жесткие требования к условиям культивирования.

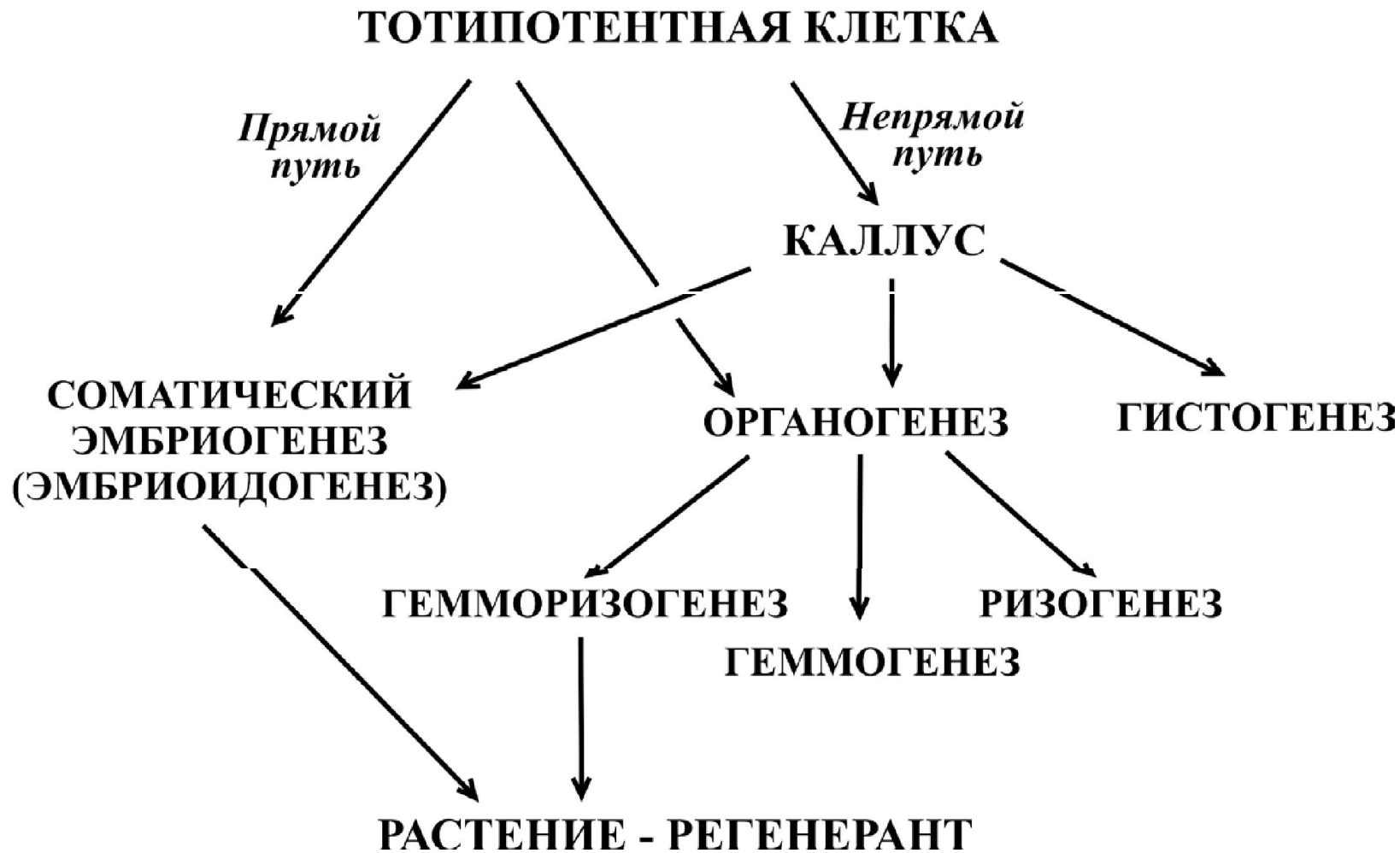


Рис. Морфогенетические пути развития клетки *in vitro*

Основным типом культивируемой растительной клетки является **каллусная**.

- Каллусная клетка, в результате деления которой возникает каллусная ткань или **каллус**, представляет один из типов клеточной дифференцировки, присущей высшему растению. Для растения каллус является тканью, возникающей под действием «раневых гормонов» путем неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток при исключительных обстоятельствах (обычно при травмах) и функционирующей непродолжительное время. Эта ткань защищает травмированное место, накапливает питательные вещества для анатомической регенерации или генерации утраченного органа.
- Образование каллуса не всегда связано с травматическим воздействием. Каллус может возникнуть и в результате пролиферации внутренних тканей экспланта без связи с поверхностью среза из-за нарушения гормонального баланса. Растущий каллус разрывает слои ткани и развивается на поверхности.

- Каллус на травмированной виноградной лозе





- Культура каллусных клеток – это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из недифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т.е. дифференцируются.
- Значительно реже культивируют клетки опухолей растений различного происхождения (*растительные* – бактериальной или вирусной этиологии; *генетические*, возникающие на межвидовых гибридах). Культуры опухолевых клеток независимо от способа культивирования на уровне морфологии мало отличаются от культур каллусных клеток. Значительным их физиологическим отличием является *гормоннезависимость*, позволяющая им делиться и расти на питательных средах без добавок фитогормонов или их аналогов. Однако опухолевые клетки лишены способности давать начало нормально организованным структурам. В некоторых случаях они способны образовывать *тератомы*.

Каллусные

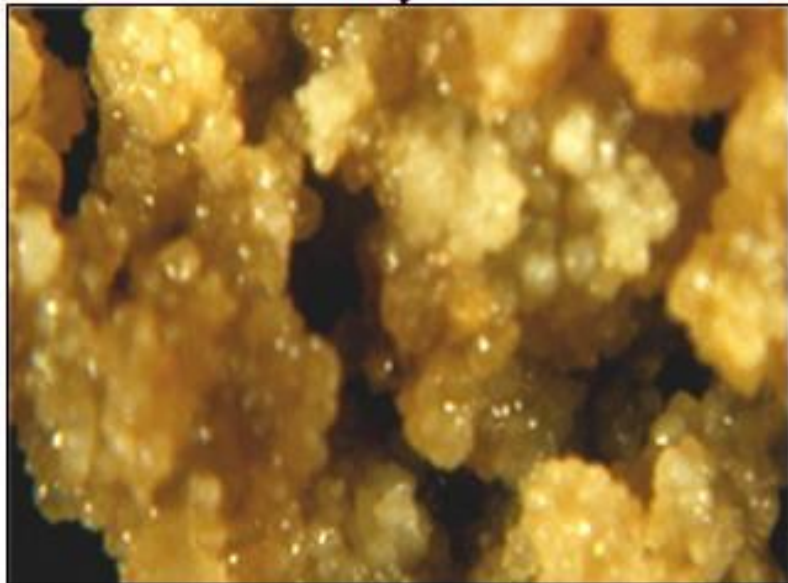


Рис. 3.1. Каллусная ткань, выращенная из одной клетки на питательной среде

Каллусная ткань образуется в результате повреждения на целых растениях. Её также можно вырастить в стерильной культуре на питательной среде. Возникновение каллуса связано с неорганизованным делением (пролиферацией) дифференцированных клеток.

Опухолевые



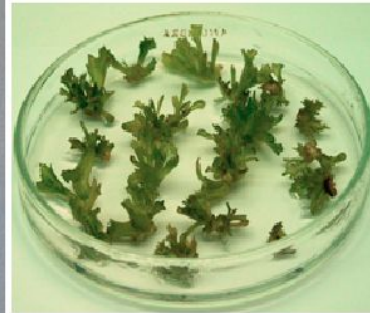
Рис. 3.2. Патологическое разрастание качественно изменившихся растительных клеток

Растительные опухоли имеют бактериальное или вирусное происхождение. Превращение растительных клеток в опухолевые связано с проникновением в них ДНК бактериальной клетки, так называемой Ti-плазмиды, которая значительно изменяет свойства клетки.

- Каллусные клетки способны делиться только при наличии в питательной среде фитогормонов. Однако при длительном культивировании в некоторых случаях они могут утрачивать зависимость от наличия в среде ауксинов и цитокининов. Природа такой независимости к фитогормонам, чаще всего применяемым при выращивании клеточных культур растений, может быть генетической (результат мутации) или эпигенетической (результат экспрессии генов, определяющих гормонезависимость клетки). При генетической гормонезависимости каллусные клетки ведут себя как опухолевые, при эпигенетической они могут утрачивать признак в ряду превращений клетка-растение-клетка. Такие клетки принято называть «*привыкшими*». В них также как и в опухолевых клетках идет интенсивный синтез собственных гормонов. Часто ткани, образованные «привыкшими» клетками, называют *химическими опухолями*. Подобно опухолевым, такие ткани не способны к нормальной регенерации и образуют тератомы.

- Для получения культивируемых каллусных клеток фрагменты тканей различных органов высших растений - корней, листьев, стеблей, пыльников, зародышей (**экспланты**) помещают на искусственную среду, содержащую ауксины, в пробирки, колбы, чашки Петри.

Экспланты



- Процесс получения первичного каллуса и поддержание пересадочной культуры требует строго стерильных условий. Растительные ткани сами по себе могут являться серьезным источником контаминации вследствие присутствия эпифитной микрофлоры. Поэтому до извлечения экспланта часть растения предварительно промывают водой с детергентом, а затем ополаскивают стерильной водой. Затем выделенные экспланты помещают в стерильные растворы, содержащие хлор или ртуть (гипохлориты, сулема, диацид), к которым для лучшего смачивания добавлены детергенты. После выдерживания эксплантов в дезинфицирующем растворе их несколько раз промывают стерильной дистиллированной водой и скальпелем стерильно удаляют на срезах несколько слоев клеток.
- В некоторых случаях (в основном у тропических и субтропических растений) может встречаться и внутреннее инфицирование тканей. В этом случае принято использовать антибиотики, хотя это и не всегда позволяет получить стерильный эксплант.

- Процессу образования каллуса предшествует дедифференцировка тканей экспланта. При дедифференцировке ткани теряют структуру, характерную для их специфических функций в растении, и возвращаются к состоянию делящихся клеток.
- Основным условием превращения растительной клетки в каллусную является присутствие в питательной среде фитогормонов. *Ауксины* вызывают процессы дедифференцировки клетки, готовящие ее к делению, а *цитокнины* – пролиферацию дедифференцированных клеток. Если эксплант, состоящий из дифференцированных клеток, поместить в питательную среду без гормонов, деление клеток не произойдет, и каллус не образуется. Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с возобновлением под влиянием фитогормонов клеточного деления.

- В качестве ауксинов используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), α -нафтилуксусную кислоту (НУК), индолилмасляную кислоту (ИМК), индолилуксусную кислоту (ИУК) в концентрации 0,5 - 10 мг/л в зависимости от вида экспланта.
- Для возбуждения процессов подготовки к делению достаточно начального кратковременного действия ауксина. Поэтому процессы, происходящие в клетках под влиянием ауксина, можно разделить на *первичные*, непосредственно индуцированные ауксином, и *вторичные*, являющиеся следствием первичного индуцирующего действия.
- В качестве цитокининов применяют зеатин, кинетин и др.

- В клетках экспланта, состоящего из неделящихся специализированных клеток, в самом начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, вызываемые и травматическими синтезами, и дедифференцировкой, и подготовкой к процессу деления. Для разделения этих процессов можно применять преинкубацию эксплантов на среде без гормонов в течение нескольких суток (3-6). Это позволяет исключить не только изменения, связанные с травмой, но и возможное неконтролируемое влияние эндогенных гормонов экспланта на изучаемые процессы.

- Процесс перехода к каллусному росту начинается с остановки клеточных делений. Лаг-фаза продолжается 24-48 часов, в течение которых клетки увеличиваются в размерах и ткань экспланта разрыхляется. Далее клетки начинают быстро делиться, образуя каллусную ткань.
- В каллусных клетках появляются специфические белки и одновременно исчезают белки, характерные для фотосинтезирующих клеток.
- В клетках каллусной ткани происходят не только биохимические, но и цитологические изменения. Через 6-12 часов после индукции дедифференцировки клеточная стенка разрыхляется и набухает, увеличивается число свободных рибосом, элементов аппарата Гольджи, а также изменяются число и размеры ядрышек. Все это предшествует началу процессов деления, которые начинаются через 48-72 часа.

- Каллусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки, включая деление, растяжение и дифференцировку, после чего наступает старение и отмирание клетки. Однако клеточный цикл у каллусных клеток более длителен.
- Их характерной особенностью является выраженная гетерогенность по возрасту в пределах каллусной ткани.
- Они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными клетками, что свидетельствует о снижении эффекта Пастера.
- Клетки каллусной ткани также обладают выраженной генетической гетерогенностью (различаются по числу хромосом, что связано с неорганизованным, несинхронным, анархичным развитием). Встречают диплоидные, полиплоидные и анеуплоидные клетки, причем, чем длительнее процесс культивирования, тем сильнее различие клеток по пloidности.
- В каллусных клетках достаточно часто происходят хромосомные абберации, что сказывается на биологических особенностях клеток.

- Одной из причин гетерогенности культуры каллусной ткани является различное тканевое происхождение первичных каллусных клеток, так как некоторые функциональные особенности исходных дифференцированных клеток передаются в ряду клеточных поколений как стойкие модификации или эпигенетически наследуемые признаки.

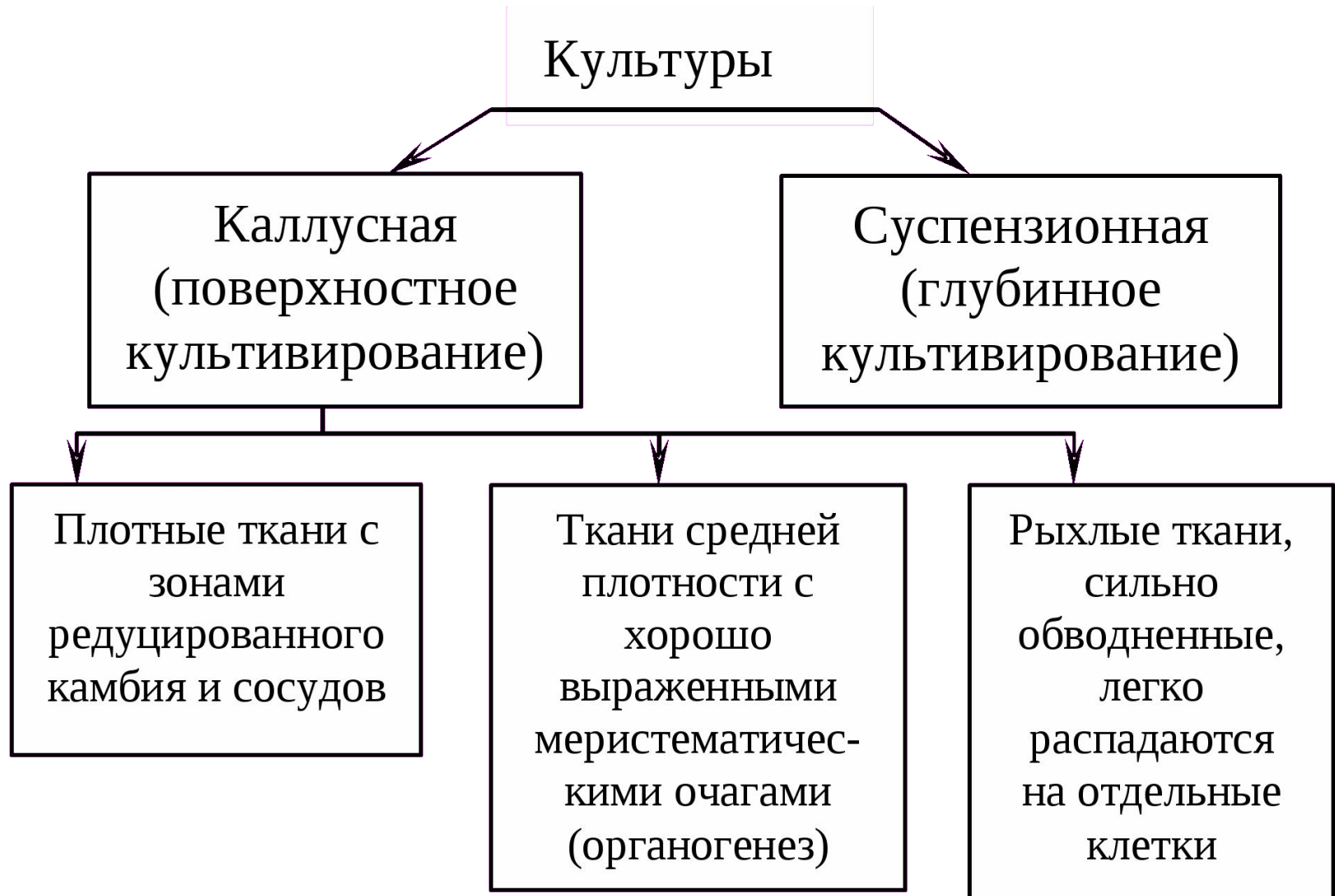
- Первичный каллус, возникший на эксплантах через 4-6 недель (в зависимости от скорости роста клеток), для того, чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и дальнейшему росту, а также отмирания каллусных клеток, переносится на свежую питательную среду (пассируется или субкультивируется). Размер транспланта (переносимого фрагмента) при культивировании на агаризованной питательной среде обычно составляет от 60 до 100 мг массы ткани на 30-40 мл питательной среды.
- В процессе субкультивирования формируется штамм, характеризующийся индивидуальными генетическими и физиологическими особенностями.

- Большинство каллусных клеток могут расти в условиях сильного освещения или в темноте, поскольку не способны фотосинтезировать. Вместе с тем, свет может выступать как фактор, обеспечивающий морфогенез и активирующий процессы вторичного синтеза. Для обеспечения протекания данных процессов важны не только интенсивность освещенности, но и качество света. Для достижения оптимизации процесса культивирования часто используют люминесцентные лампы с интенсивностью около 1000 люкс и непрерывным «холодным белым» светом.

- Для роста и развития большинства каллусных культур оптимальной является температура 26 °С. Однако индукция процессов морфогенеза требует более низких температур (18-20 °С).
- Оптимальная влажность в культуральной лаборатории должна составлять 60-70 %. Большое значение для успешного культивирования каллусных клеток также имеет аэрация.

- При культивировании растительных клеток и при выращивании культуры тканей применяются среды Мурасиге-Скуга, Нагата-Такебе, Хеллера, Нича-Нича, Кнудсона и другие в различных модификациях.
- Основными компонентами питательных сред для культуры клеток и тканей растений являются минеральные соли (макро- и микроэлементы), источник углеродного питания (обычно сахароза или глюкоза), витамины, регуляторы роста. Иногда в состав питательных сред включают комплексные органические добавки (гидролизат казеина или смесь аминокислот, дрожжевой экстракт, экстракты из разных органов растения).

- **Методы выращивания культур растительных клеток**



- **Поверхностное культивирование**

- Культура каллусных тканей выращивается поверхностным способом на полужидкой агаризованной среде (концентрация агар-агара 0,6-1%), среде с применением других желирующих полимеров либо на мостиках из фильтровальной бумаги или дисках из пенополиуретана, погруженных в жидкую питательную среду.

- Каллусная ткань, выращиваемая поверхностным способом, представляет собой аморфную массу тонкостенных паренхимных клеток, не имеющую строго определенной анатомической структуры. Цвет массы может быть белым, желтоватым, зеленым, красным — пигментированным полностью или зонально.
- Темно-коричневая окраска каллуса возникает чаще при старении каллусных клеток или неоптимальных условиях выращивания и связана с накоплением в них фенолов, окисляющихся до хинонов. Для избавления от них в питательные среды вводятся антиоксиданты.

Биотехнологическое получение пектиновых веществ



Каллус ряски малой

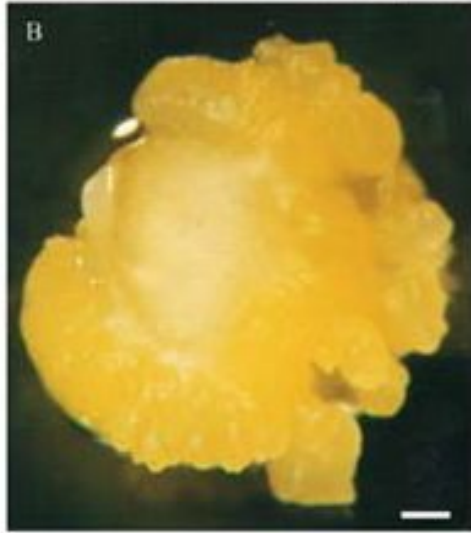
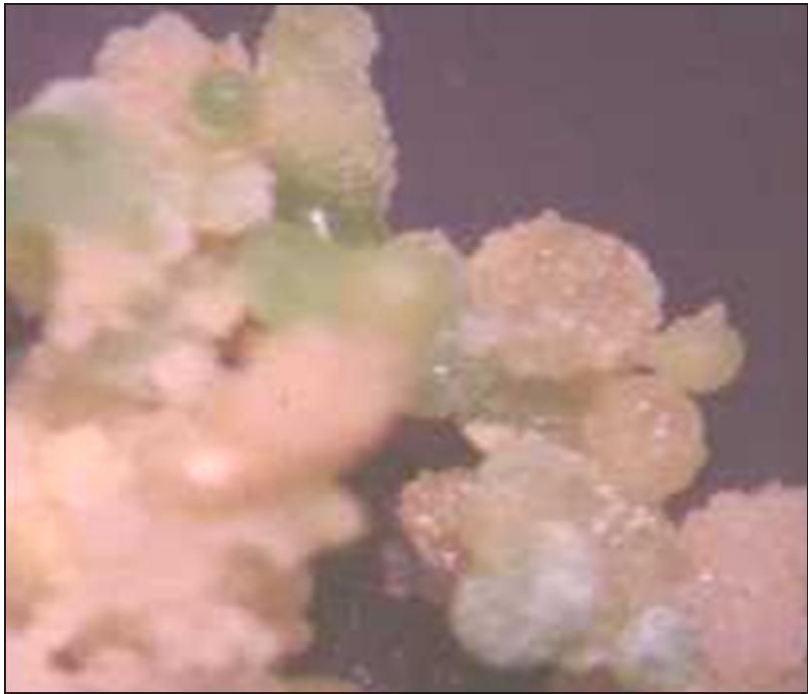
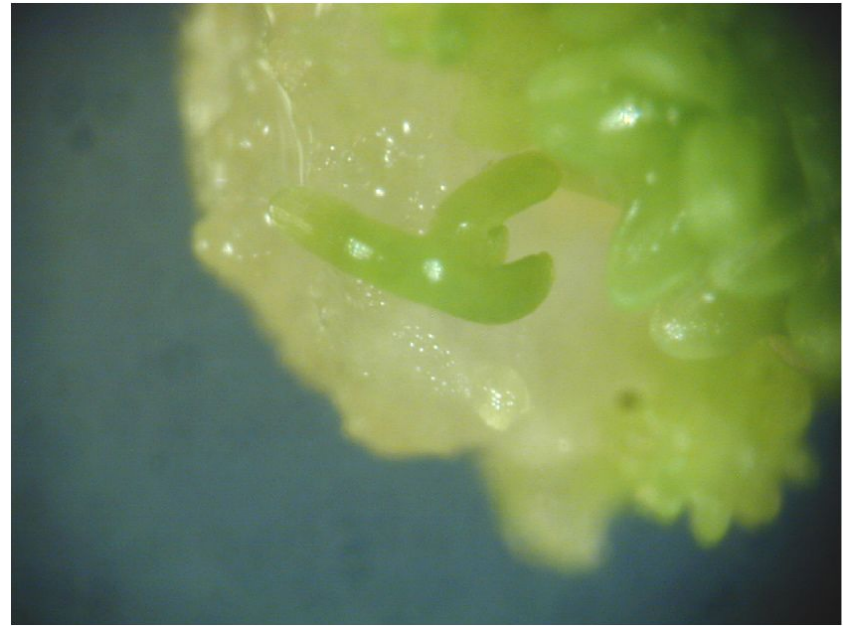
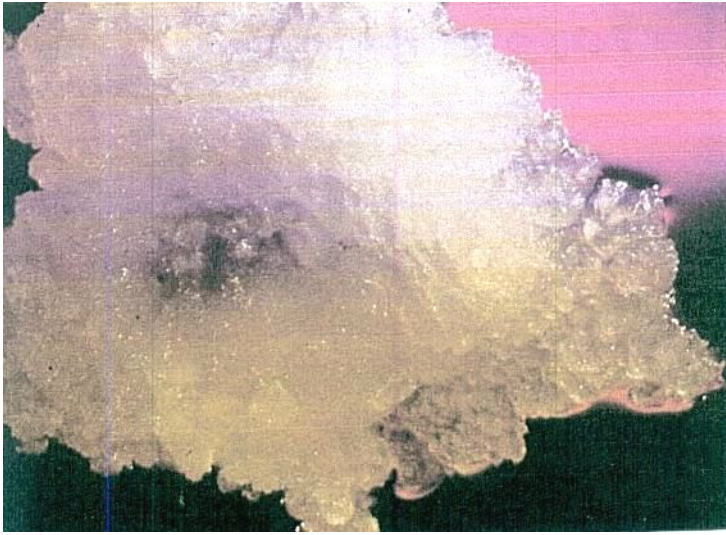


Каллус смолёвки обыкновенной

Каллус [Nicotiana tabacum](#)



Каллус [Nicotiana tabacum](#)



- Неорганизованно растущая каллусная ткань характеризуется тремя типами клеток:
- мелкими,
- средними,
- крупными.
- При пассировании ткани на среду, содержащую индукторы органогенеза, мелкие клетки приступают к делению и формируют меристематические очаги. Деление клеток меристематического очага приводит либо к формированию почек и последующему развитию из них побегов (геммогенез), либо к ризогенезу.

- Каллусы с высоким морфогенетическим потенциалом обычно матовые, компактные, структурированные, имеют зеленые хлорофиллсодержащие участки, которые представляют собой зоны морфогенеза. Рыхлые каллусы, не имеющие глобулярного характера либо совсем не способны к органогенезу, либо формируют только корни. Эти каллусы могут остаться ризогенными, и регенерировать из них растения не удастся. Неморфогенные каллусы могут быть переведены в суспензионную культуру для получения вторичных метаболитов.

- В отношении гормональной регуляции органогенеза Скугом и Миллером в 1957 г. была выдвинута концепция, которая в настоящее время известна как **«гипотеза гормонального баланса, или правило Скуга-Миллера»**.
- Согласно данной концепции можно получить образование стеблей, корней или недифференцированный рост каллуса, изменяя относительное содержание ауксинов и цитокининов. В самом простом случае индукция и образование каллуса наблюдается при сбалансированном отношении ауксинов к цитокининам, стеблевые почки образуются при повышении уровня цитокининов по отношению к ауксинам, корни формируются при высоком содержании ауксинов в среде.

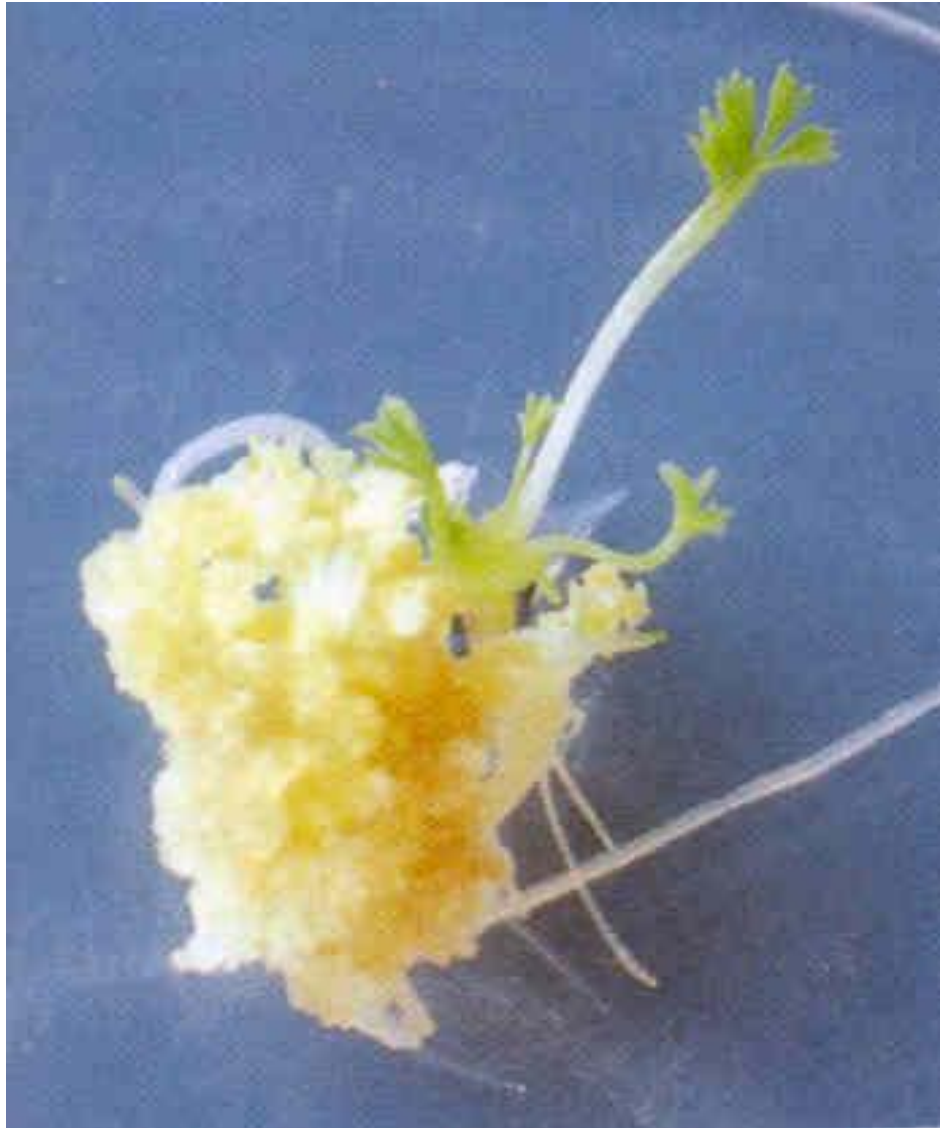
- Ризогенный каллус



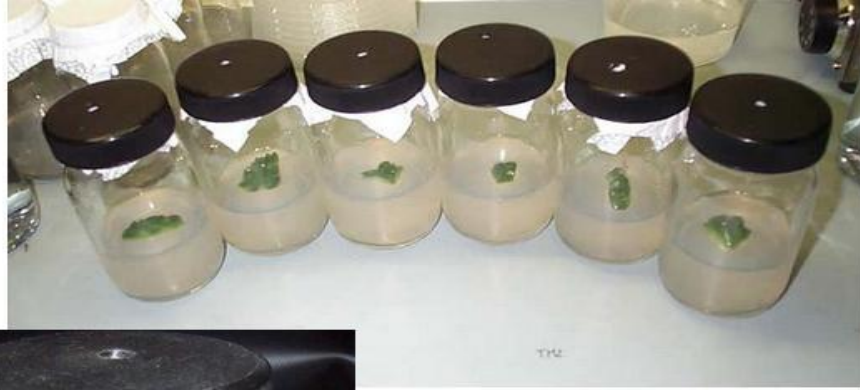
- Геммогенный каллус



- Ризогеммогенный каллус



- У всех каллусных тканей, а у некоторых уже начиная с 4-го пассажа, заметно снижается, а затем и полностью утрачивается способность к регенерации. Поэтому из старых пересадочных культур получить растения-регенеранты не удастся.
- Каллусные клетки, выращиваемые поверхностным способом, часто применяют для сохранения в растущем состоянии коллекций разных штаммов, линий, мутантов, для регенерации растений, из них также получают суспензии клеток, культивируемых в жидкой питательной среде.



• Суспензионное культивирование

- Культуры клеток растений, выращиваемые в жидкой питательной среде, обычно называют *суспензионными культурами*. Термин этот не является строго научным и очень точным, так как не объясняет основной особенности поведения клеток при таком выращивании.
- Получено еще сравнительно мало культур клеток высших растений, по своим параметрам полностью удовлетворяющих требованиям суспензионного (глубинного) культивирования. В значительной мере это объясняется трудностями получения культуры клеток, состоящей преимущественно из отдельных клеток или небольших их агрегатов.

- Обычно для получения суспензионной культуры используются рыхлые обводненные каллусные ткани. Оптимальными подходами для получения суспензии являются выращивание каллусов на среде с 2,4-Д, исключение из среды ионов кальция, обработка пектиназой транспланта, предназначенного для выращивания в суспензионной культуре.

- Для получения культуры клеток берется наиболее жизнеспособная (пролифелирующая) часть каллусной ткани, а ее количество должно быть в 15-20 раз больше в расчете на объем питательной среды, чем при серийном культивировании на агаре (примерно 2-3 г свежей массы каллусной ткани на 60-100 мл жидкой питательной среды или примерно $0,5-2,5 \times 10^5$ кл/мл).
- При этом может использоваться питательная среда того же состава, что и для поверхностного культивирования, но в некоторых случаях увеличивают количество ауксинов и (или) уменьшают количество цитокининов.
- Режим перемешивания и аэрации как при инициации культуры клеток, так и при дальнейших серийных субкультивированиях обеспечивается выращиванием на роллерах и качалках (круговая качалка – 10-12 об/мин). Часто интенсивность перемешивания повышается до 100-120 об/мин.

Суспензионная культура



- Образование первичной суспензии растительных клеток можно считать результатом трех процессов:
- 1) распадение каллусной ткани на клетки и небольшие клеточные агрегаты в момент внесения в жидкую питательную среду;
- 2) отделение клеток и клеточных агрегатов с поверхности кусочков ткани в течение первых субкультивирований;
- 3) деления и роста клеток, образовавшихся по первым двум способам, и распадения разрастающихся клеточных агрегатов на более мелкие агрегаты и клетки. Последний процесс является типичным для роста стабилизировавшейся перевиваемой культуры клеток высших растений.

- Первичную суспензию перед субкультивированием либо в специальном цилиндре разделяют на фракции по скорости седиментации (используют верхнюю фракцию), либо фильтруют через 1-2 слоя марли, нейлоновые или металлические сита, чтобы избавиться от крупных плотных кусков каллусной ткани, остатков экспланта и очень крупных агрегатов.
- Фильтрация рекомендуется и в нескольких последующих субкультивированиях до приобретения клеточной суспензией желательных характеристик. Однако агрегированность суспензии зависит не только от характеристик начальной линии, но и от условий культивирования.

- По степени агрегированности выделяют:
- мелкоагрегированную культуру (40% - одиночные клетки, 60% - мелкие агрегаты);
- среднеагрегированную культуру (40% - одиночные клетки, 40% - мелкие агрегаты, 20% - крупные агрегаты);
- крупноагрегированную культуру (40% - мелкие агрегаты, 60% - крупные агрегаты).

- Для глубинного культивирования растительных клеток применяются способы, разработанные для микробиологических целей. Используются закрытые или открытые системы в периодическом или проточном режимах. Однако при глубинном выращивании растительных клеток принцип турбидостата практически не применяется. Одной из причин этого является разрушения части клеток при отводе их к оптическому прибору. Выращивание суспензии клеток растений в установках непрерывного культивирования по принципу хемостата применяется как для изучения метаболизма клеток, стабильно поддерживающихся в разных фазах клеточного цикла, так и при промышленном выращивании клеточной биомассы с целью получения экономически важных продуктов.

- Однако до настоящего времени наиболее изученным и распространенным режимом глубинного культивирования клеточных суспензий является закрытая периодическая система.
- При этом признаками качественной суспензионной культуры служат способность клеток к перестройке метаболизма и высокая скорость размножения в конкретных условиях культивирования.
- *Морфологические характеристики такой культуры:*
 - высокая степень дезагрегации (5-10 клеток в группе);
 - морфологическая выравненность клеток (небольшие размеры, сферическая или овальная форма, плотная цитоплазма);
 - отсутствие трахеидоподобных элементов.

- Рост суспензионных культур клеток можно оценивать по одному или нескольким следующим параметрам:
- 1. *Объем осажденных клеток (ООК)*. ООК - величина, которую составляет отношение объема осадка клеток после центрифугирования в течение 5 минут при 200 g к объему суспензии, обычно в %.
- 2. *Число клеток*. Для определения количества клеток суспензию диспергируют до одноклеточного состояния обработкой 5-10% хромовой кислотой и проводят подсчет клеток в 1 мл клеточной суспензии, нанесенной на сетку счетной камеры Фукса-Розенталя.
- 3. *Сырая и сухая масса*. Суспензия клеток фильтруется под слабым вакуумом через смоченный и взвешенный нейлоновый фильтр, вложенный в воронку Бюхнера. Клетки промывают дистиллированной водой для удаления остатков питательной среды, оттягивают воду под вакуумом и взвешивают снова вместе с фильтром. Сухая масса – определяется аналогично, но взвешивается сухой фильтр, а клетки сушат обычно в течение суток вместе с фильтром в термостате при 60 °C до постоянной массы.

- 4. *Содержание белка.* Для определения белка клетки собирают на фильтре из стекловолокна, дважды промывают кипящим раствором 70% этанола, сушат ацетоном, гидролизуют 1М NaOH при температуре 85 °С полтора часа. Затем фильтруют и определяют белок.
- 5. *Проводимость среды.* Определяют с помощью кондуктометра. Как правило, она обратно пропорциональна свежей массе клеток.
- 6. *Жизнеспособность клеток.* Выражается отношением количества жизнеспособных клеток к общему их количеству в 1 мл суспензии. Оценивают, изучая движение цитоплазмы под микроскопом, а также с помощью прижизненных красителей (0,01% р-р флюоресцеиндиацетата, 0,5% р-р синий Эванса). Перед использованием подбирают рН инкубационного буфера, концентрацию красителя, время инкубации, строят калибровочные кривые для смеси живых и убитых клеток.

- По полученным данным строят ростовые кривые, которые имеют типичную S-образную форму.

I – лаг-фаза, II – экспоненциальная фаза,

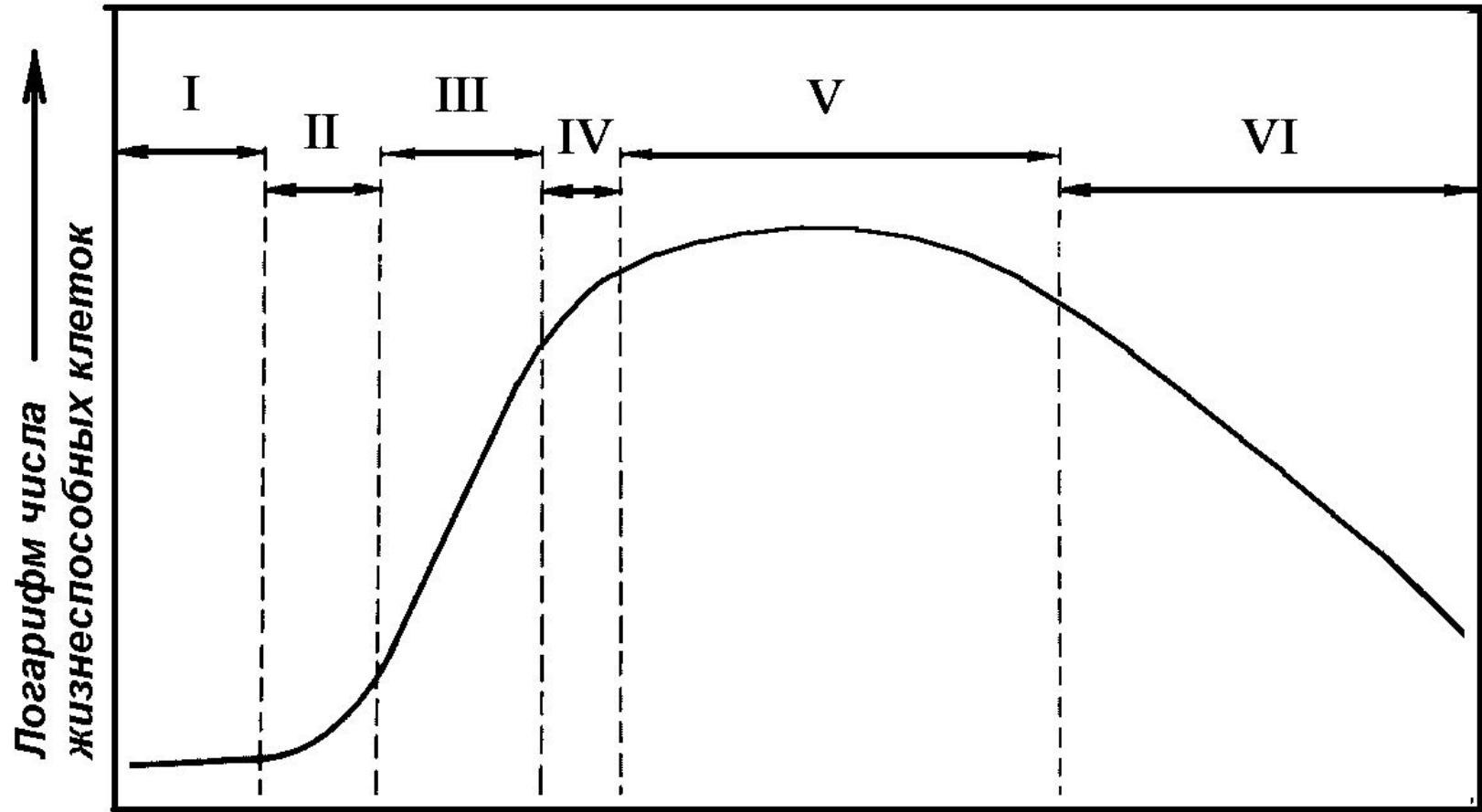


Рис. Фазы кривой роста популяции растительных клеток:

I – лаг-фаза, II – экспоненциальная фаза,

III – фаза линейного роста, IV – фаза замедленного роста, V – стационарная фаза, VI – фаза отмирания

- 1) (лаг) фазу, в которой видимый рост инокулята не наблюдается ни по одному из критериев. При этом наблюдается высокая интенсивность дыхания, поглощения воды и питательных веществ, максимальные значения энергетического уровня, интенсивный синтез ДНК, РНК, белков и других компонентов клетки, но низкий митотический уровень. Длительность периода адаптации зависит от количества и физиологического состояния инокулята и условий культивирования.

- 2) экспоненциальную фазу, характеризующуюся ростом с максимальной скоростью, максимальными величинами митотической активности, а также преобладанием мелких клеток меристематического типа.
- Можно выделить *раннюю* и *позднюю* экспоненциальные фазы. В течение ранней наблюдается ряд цитологических изменений: в клетках исчезает большая вакуоль, происходит увеличение объема цитоплазмы, числа рибосом и митохондрий. Активируется клеточный метаболизм. В поздней экспоненциальной фазе наблюдается замедление клеточного деления, но увеличение размера клеток.

- 3) фазу замедления роста, связанную с субстратным лимитированием и ингибированием продуктами обмена, и характеризующуюся несбалансированным ростом популяции по основным критериям, снижением уровня дыхания, переходом части клеток в дифференцированное состояние, увеличением доли крупных вакуолизированных клеток. Увеличивается синтез вторичных метаболитов (сердечных гликозидов, антрахинона, диосгенина).

- 4) стационарную фазу, характеризующуюся еще малой скоростью деградации клеток, которая уравнивается делением клеток, высокими биосинтетическими и биотрансформирующими потенциями жизнеспособных дифференцированных клеток, низким уровнем дыхания и появлением чрезвычайно крупных вакуолизированных клеток. К этому периоду суспензионная культура достигает максимума сухого веса. В среднем от начала культивирования до стационарной фазы проходит 21-28 суток.

- 5) фазу деградациии клеток с удельной скоростью роста, принимающей отрицательное значение.
- Форма реальных ростовых кривых может значительно отличаться продолжительностью фаз от модельной. Процессы ростового цикла определяются видом растения, количеством внесенного материала и условиями культивирования (состав питательной среды, температура, начальное значение рН, состав газовой фазы, скорость перемешивания).

- Клетки растений в десятки, сотни раз крупнее клеток бактерий, кроме того, их размеры меняются в процессе онтогенеза. Если в начале экспоненциальной фазы роста они мелкие и плотные, то в стационарной фазе роста они сильно увеличиваются в размерах и вакуолизируются.
- Чем крупнее становится клетка, тем больше возрастает опасность ее механического повреждения в процессе перемешивания. В то же время клетки растений, крупные и тяжелые, требуют эффективного перемешивания. Оседание их приводит к появлению в сосудах «мертвых» зон, в которых происходит быстрое накопление и деградация клеток.

- На культуры некоторых типов клеток отрицательное влияние может оказывать механический стресс при выращивании в ферментере с турбинными мешалками при скоростях перемешивания свыше 100 об/мин. Для таких культур целесообразнее использовать мягкое перемешивание и аэрацию пневматическим способом потоком сжатого стерильного воздуха, подаваемого в ферментер. К сожалению, и этот способ имеет свой недостаток, потому что в культуральной среде возникает избыток воздуха, приводящий к кислородному голоданию, а от концентрации кислорода в среде зависят рост и вторичный метаболизм клеток. Однако необходимо помнить, что высокая степень аэрации также может оказывать негативное действие на рост и синтез продуктов вторичного метаболизма.

- Отличительная особенность суспензионных культур клеток растений — высокая плотность, необходимая для роста. Поэтому другим осложнением при культивировании клеток растений является увеличение вязкости, сопровождающее рост биомассы. Это ведет к адгезии клеток друг к другу и к поверхностям культурального сосуда. В верхней части сосуда постепенно может образовываться пена, состоящая из выделяемых клетками продуктов метаболизма. При этом часть клеток скапливается в этой пене, образуя «корку», или «безе». С увеличением биомассы клеток увеличивается и эта «корка», снижая интенсивность перемешивания, что в конце концов может привести культуру к гибели.

- Клетки растений обладают меньшей физиологической и метаболической активностью по сравнению с микроорганизмами. Время генерации (интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями) растительной клетки в 60—100 раз превосходит время генерации микробной клетки. Пул пролиферирующих клеток не превышает 50—60%, многие клетки быстро прекращают деление и переходят в фазу покоя.

- Суспензионные культуры наиболее часто используют для промышленного получения вторичных метаболитов. Вещества, продуцируемые растительными клетками, применяются в медицине, парфюмерной промышленности, растениеводстве и других отраслях промышленности. К ним относятся: **алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, пигменты, антиканцерогены (платтецин, харрингтонин), пептиды (ингибиторы фитовирусов).**

• **Культивирование отдельных (одиночных) клеток**

- Отдельные клетки культивируют для получения клонов, изучения их генетической и физиологической изменчивости или стабильности. Кроме того, культивирование отдельных клеток позволяет изучать условия, определяющие возникновение стимулов к делению у клеток, изолированных от влияния других клеток популяции или ткани. Отдельные клетки также важны для клоновой селекции мутантных, гибридных и трансформированных линий. Обычно в такие клетки вводят маркерные гены, которые позволяют осуществлять селекцию.
- Кроме того, отдельные клетки могут служить моделью для сравнительного изучения физиологических процессов в ткани и изолированной клетке. Например, для изучения фотодыхания.

- Работа с изолированными одиночными клетками складывается из двух этапов:
- 1) изолирование неповрежденной клетки растительной или каллусной ткани;
- 2) создание условий, благоприятных для роста и развития изолированной клетки.

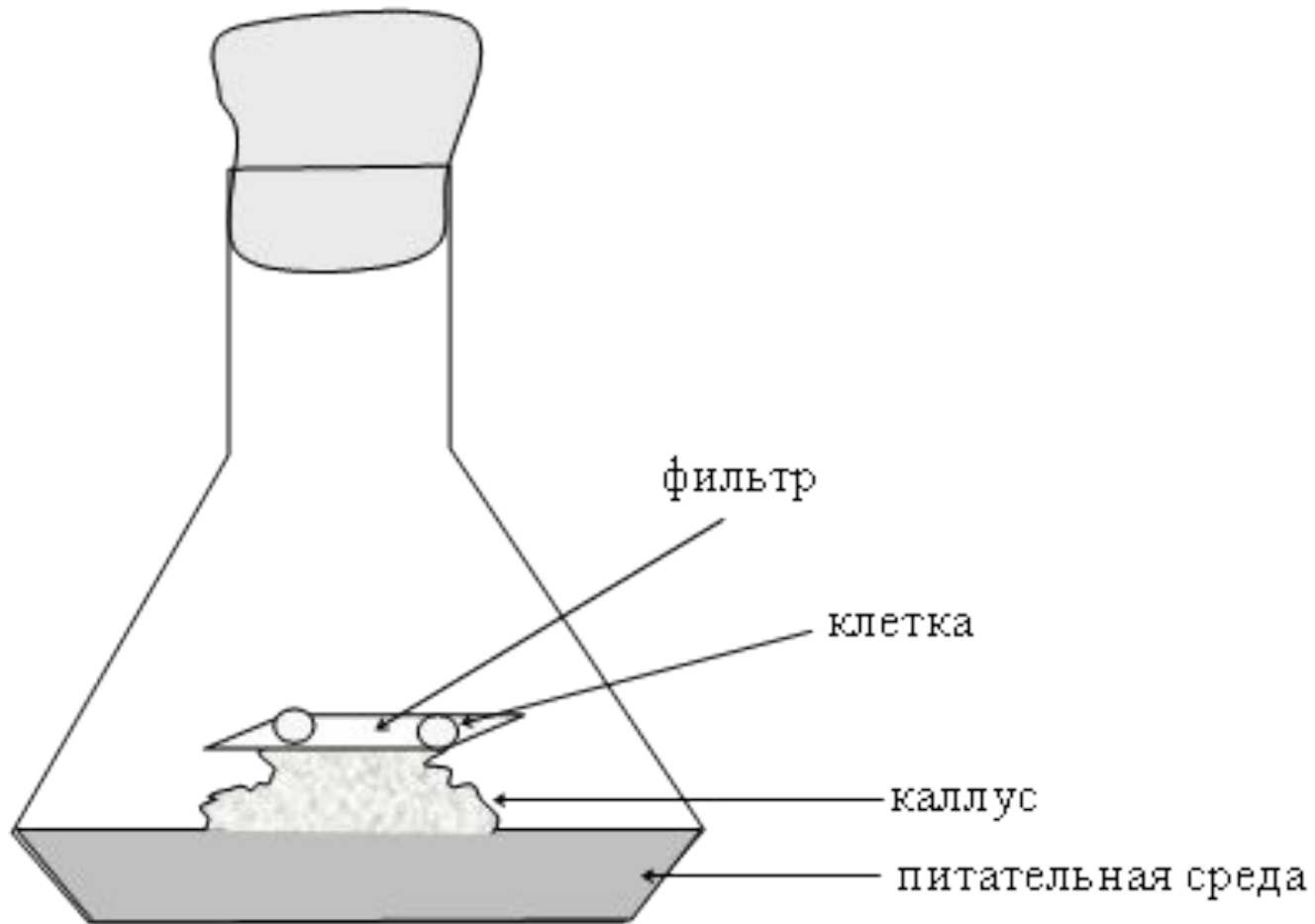
- На первом этапе необходимо выделить неповрежденную и жизнеспособную клетку из ткани целого растения или каллусной ткани.
- Этого возможно достичь разными путями:
- 1. Отдельные клетки можно получать из ткани целого растения путем ее мацерации. Для получения отдельных мацерированных клеток используются специальные мацерирующие ферментные препараты, содержащие пектолитические ферменты, поливинилпирролидон, сульфат калия, сорбит (маннит), 2-N-морфолиноэтансульфоновую кислоту. Данная процедура производится в условиях строгой стерильности.
- Мацерированные клетки ткани растения являются хорошей моделью для сравнительного изучения физиологических процессов в ткани и отдельной клетке. Однако процесс мацерации может привести к утрате способности отдельных клеток к последующим делениям.

- 2. Удобнее получать отдельные клетки из суспензионных культур с использованием микроманипулятора, проточного цитофлюориметра или путем последовательных разбавлений. В этом случае суспензии готовятся разными способами: 1) либо 1-2 мл суспензии отбирают из супернатанта после оседания основной массы клеток, 2) либо суспензию фильтруют через фильтры с уменьшающимся диаметром пор.
- Для последовательных разведений используют платы для микротитрований, что позволяет микроскопически контролировать клеточный состав при последовательных разведениях.
- Получение одиночных клеток на основе суспензионных культур связано с меньшим риском повреждения по сравнению с выделением непосредственно из тканей растения.
- 3. Отдельные клетки могут быть получены из рыхлых каллусов при помощи микроманипуляторов.
- 4. Идеальными отдельными клетками являются протопласты, образовавшие клеточную стенку.

- При первых же попытках культивирования отдельных клеток стало ясно, что они ведут себя иначе, чем их скопления в виде агрегатов в суспензии или каллусной массы на поверхности питательной среды.
- Возникла важная научная проблема: как заставить делиться клетки, изолированные от влияния других клеток популяции или тканей.
- Было предложено несколько вариантов культивирования отдельных клеток.

- Впервые подобрать условия, подходящие для деления отдельных клеток, удалось в 1954 году **Мьюиру, Хильденбрандту и Райкеру**. Этот способ получил название *метода «ткани – няньки»*.
- При этом клетку изолируют из рыхлого каллуса непосредственно на кусочек фильтра, помещенный за 2-3 дня до изолирования на верхушку каллусной ткани, из которой была взята клетка. В качестве «няньки» можно также использовать каллусную ткань другого растения родственного вида. В любом случае каллус должен находиться в фазе активного роста. Только тогда клетки способны расти и делиться.
- По мере старения каллуса-няньки фильтр с клетками переносится на молодой каллус. При достижении колонией, выросшей из отдельной клетки, размера 0,5-1 мм, она может быть перенесена для дальнейшего выращивания на агаризованную питательную среду непосредственно либо на фильтр, помещенный на поверхность питательного агара.

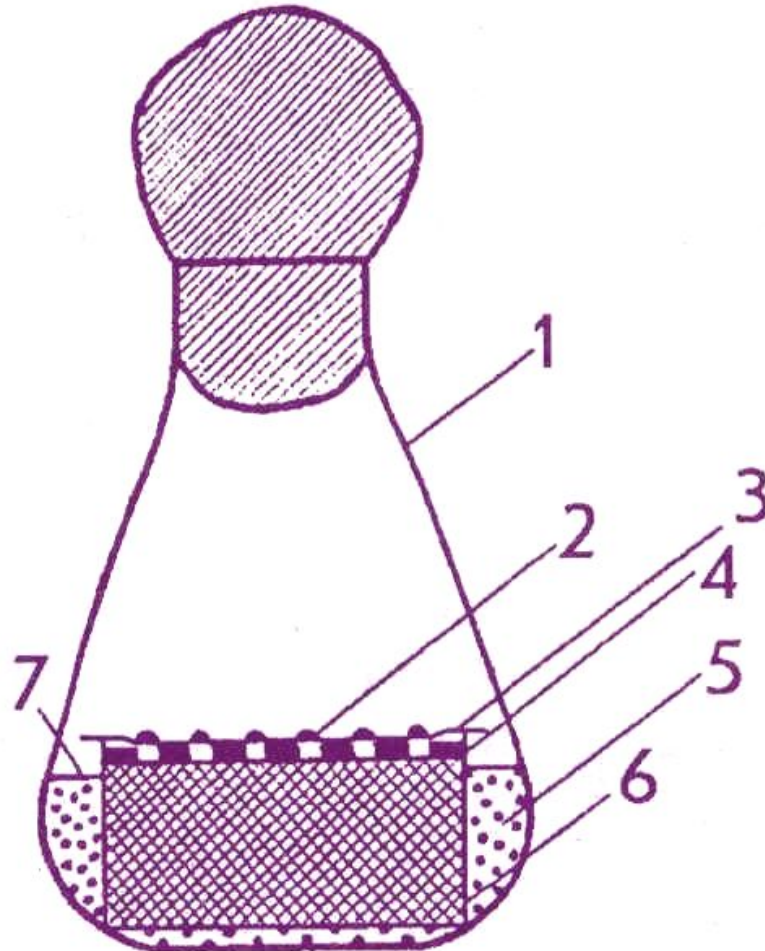
- Метод «ткани-няньки»



- Другой вариант культивирования одиночных клеток на основе метаболитов делящихся клеток – *метод кондиционирования среды*. В этом случае используют культуральную жидкость длительно выращиваемой суспензионной культуры. При этом клеточную суспензию для удаления клеток фильтруют через бактериальный фильтр, после чего фильтрат (среду с метаболитами) добавляют в среду для культивирования одиночных клеток.

- Можно также использовать *метод «кормящего слоя»*. Для этого в качестве кормящего одиночные клетки слоя берут суспензию клеток того же вида, что и одиночная клетка, или близкого вида. Клеточная суспензия должна находиться в ранней экспоненциальной фазе ростового цикла.

- Рис. Использование «кормящего слоя» (суспензионная культура) при выращивании колоний из одиночных клеток: 1 - колба, 2 - колония, возникшая из отдельной клетки, 3 - фильтровальная бумага, 4 - металлическая сетка, 5 - суспензия клеток «кормящего слоя», 6 - подложка (пенополиуретан), 7 - питательная среда.



- **Метод плейтинга** был разработан для массового культивирования отдельных изолированных клеток. В 1959 г. **Бергман** предложил фильтровать суспензионную культуру (в его экспериментах это были табак и фасоль) стерильно через один слой батиста (ячейки 0,3 x 0,1 мм). В результате получали суспензию, на 90% состоящую из отдельных клеток. Эту суспензию смешивали с питательной средой того же состава, что использовался при культивировании суспензии (среда содержала 0,6% агара). Смесь разливали тонким слоем (1 мм) в чашки Петри. Агар разделял клетки, но не препятствовал обмену химическими сигналами между ними, а толщина слоя позволяла наблюдать за их поведением под микроскопом.

- **Метод микрокультуры (микрокапель)** базируется на использовании очень малых объемов очень богатой питательной среды, например, среды Као-Михайлюк. При этом объем среды, в которую помещаются клетки, должен был минимальным (микрокапли объемом до 20 мкл). Однако даже при соблюдении всех этих условий процент разделившихся клеток остается низким. Метод предложил академик Ю.Ю. Глеба. В микрокапле удобно наблюдать за получением и делением клеток при соматической гибридизации.

- **Метод микрокамеры** был разработан **Джонсом** в 1960 г., и может быть использован при оптимальной сбалансированности состава питательной среды для культивирования отдельной клетки.

Метод включает следующие процедуры: на предметное стекло с помощью жидкого парафина на небольшом расстоянии наклеивают покровные стекла; между которыми наносят квадрат из жидкого парафина; в камеру из парафина помещают каплю питательной среды с отдельной клеткой; сверху камеру накрывают еще одним покровным стеклом; за развитием клеточной колонии наблюдают под микроскопом.

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

- Сложности культивирования отдельных клеток способствовали возникновению гипотезы о «факторе кондиционирования». Так было названо вещество или вещества, стимулирующие деление отдельных клеток. По-видимому, «фактор кондиционирования» вырабатывается самими клетками, но в небольшом количестве. И только увеличивая число клеток, вырабатывающих этот фактор, или же уменьшая объем среды, в котором выращивается клетка, можно заставить ее делиться.
- Было выяснено, что фактор кондиционирования имеет химическую природу, термолабилен, водорастворим, низкомолекулярен, видонеспецифичен, не заменяет известные фитогормоны. Однако, несмотря на многочисленные попытки определить природу веществ, индуцирующих деление отдельной клетки, и механизм действия фактора кондиционирования, данный вопрос окончательно не выяснен.