

# **БИОТЕХНОЛОГИЯ**

## **Культура растительных клеток**

- **Культуры клеток высших растений**

# Культуры клеток высших растений имеют две сферы применения:

- **1. Изучение биологии клетки, существующей вне организма, обуславливает ведущую роль клеточных культур В фундаментальных исследованиях по генетике и физиологии, молекулярной биологии и цитологии растений.**

Популяциям растительных клеток присущи специфические *особенности: генетические, эпигенетические (зависящие от дифференцированной активности генов) и физиологические*. При длительном культивировании гетерогенной по этим признакам популяции идет размножение клеток, фенотип и генотип которых соответствуют данным условиям выращивания, следовательно, *популяция эволюционирует*. Все это позволяет считать, что *культуры клеток являются новой экспериментально созданной биологической системой, особенности которой пока мало изучены*. Культуры клеток и тканей могут служить адекватной моделью при изучении метаболизма и его регуляции в клетках и тканях целого растения.

## **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.

**Направления по созданию новых технологий на основе культивируемых тканей и клеток растений:**

- 1. Получение биологически активных веществ растительного происхождения (традиционных, новых, биотрансформация)**
- 2. Ускоренное клональное микроразмножение растений**
- 3. Получение безвирусных растений**
- 4. Эмбриокультура и оплодотворение *in vitro***
- 5. Антерные культуры**
- 6. Клеточный мутагенез и селекция**
- 7. Криоконсервация и другие методы сохранения генофонда**
- 8. Иммобилизация 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, 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)**.
- В 19 веке **Х. Фёхтинг** провел ряд экспериментов, доказывающих тотипотентность клетки. При этом им убедительно показана полярность как органов, так и клеток.
- Основы экспериментальной эмбриологии растений были заложены исследованиями **Моссарта (1902)**, было высказано предположение, что пыльцевая трубка не только обеспечивает передвижение спермиев к яйцеклетке, но и переносит в завязь ауксины, стимулирующие ее рост.



- **Г. Габерланд (1902) научился культивировать отдельные клетки в течение некоторого времени, выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой клетки растения, которая впоследствии была подтверждена экспериментально.**
- **Французский ученый Мольяр уже в 1921 культивировал сегменты корня и зародыша молодых побегов редьки. Они были способны к росту в условиях культуры, но при этом не происходило формирования новых тканей.**
- **Американец Ф. Уайта и француз Р. Готре показали, что изолированные органы и ткани могут расти в культуре неограниченно долгое время, если их пересаживать на свежую питательную среду.**

**Уайт выделяет несколько периодов в истории развития метода культуры клеток, тканей и органов растений:**

- *1834 -1900 гг. - создание и разработка клеточной теории.*
- *1900 – 1922 гг. - сформулирована идея культуры тканей.*
- *1922 – 34 гг. - безуспешные поиски методов, обеспечивающих длительное культивирование тканей.*
- *1934 - 39 гг. - детальная разработка техники культуры растительных тканей.*

Период **1940 - 1960** гг. значительно расширил список видов, выращиваемых *in vitro* - **142** вида;

- разработаны **составы питательных сред,**
- **методы стимуляции органогенеза,**
- **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. Основоположник этого метода - Э. Коккинг.**

- **Были разработаны методы гибридизации соматических клеток** путем слияния протопластов и введения в них вирусных РНК, клеточных органелл, бактерий, а также
- **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.**



# Культивирование соматических клеток

**В основе культивирования растительных клеток лежит свойство тотипотентности,**

благодаря которому соматические клетки растения способны полностью реализовать наследственную информацию, то есть обеспечить развитие всего растения. Следует отметить, что **в отличие от животной, растительная клетка предъявляет менее жесткие требования к условиям культивирования.**

- **Основным типом культивируемой растительной клетки является каллус.**

**Каллусная ткань - один из видов клеточной дифференцировки**, возникает путем неорганизованной пролиферации дедифференцированных клеток органов растения. У растений в природе каллусная ткань возникает в исключительных обстоятельствах (например, при травмах) и функционирует непродолжительное время. Эта ткань защищает место поранения, может накапливать питательные вещества для анатомической регенерации или регенерации утраченного органа.



- **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.**
- **Различное тканевое происхождение каллусных клеток является одной из причин гетерогенности каллусной ткани,** так как некоторые функциональные особенности исходных клеток передаются в ряду клеточных поколений как стойкие модификации.
- **Одним из важнейших гормонов, применяемых при культивировании *in vitro* является ауксин,** который активирует деление и растяжение клеток. Проникая в клетки, он связывается со специфическими рецепторами, оказывая влияние на функциональную активность мембран, полирибосом и работу ядерного аппарата.

- **Выделяют два типа культивируемых растительных клеток: *нормальные* и *опухолевые*.**
- ***Опухолевые* клетки морфологически мало отличаются от каллусных. Физиологическим различием является гормонезависимость опухолевых клеток.** Благодаря этому свойству опухолевые клетки делятся и растут на питательных средах без добавок фитогормонов. Эти клетки также лишены способности дать начало нормально организованным структурам (корни, побеги) в процессе органогенеза. Иногда они образуют тератомы (уродливые органоподобные структуры), дальнейшее развитие которых невозможно.
- ***Нормальные* клетки в культуре могут существовать в двух видах: в виде *суспензии* в жидкой питательной среде и *на поверхности* твердой питательной среды в виде каллуса.** Поверхностное культивирование осуществляют на полужидкой агаризованной среде, среде с добавлением других желирующих полимеров, на дисках из полиуретана, на мостиках из фильтровальной бумаги, полупогруженных в жидкую питательную среду. Можно также использовать комочки ваты, пропитанные питательной средой, которые сверху покрываются кусочком фильтровальной бумаги

- В цикле выращивания каллусной ткани клетки после ряда делений приступают к росту растяжением, дифференцируются как зрелая каллусная ткань и деградируют. Для того,
- **чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и дальнейшему росту, а также отмирания каллусных клеток, первичный каллус переносят на свежую питательную среду через 28 - 30 дней, то есть проводят *пассирование* или *субкультивирование каллусной ткани*.**

**Неорганизованно растущая каллусная ткань характеризуется тремя типами клеток:**

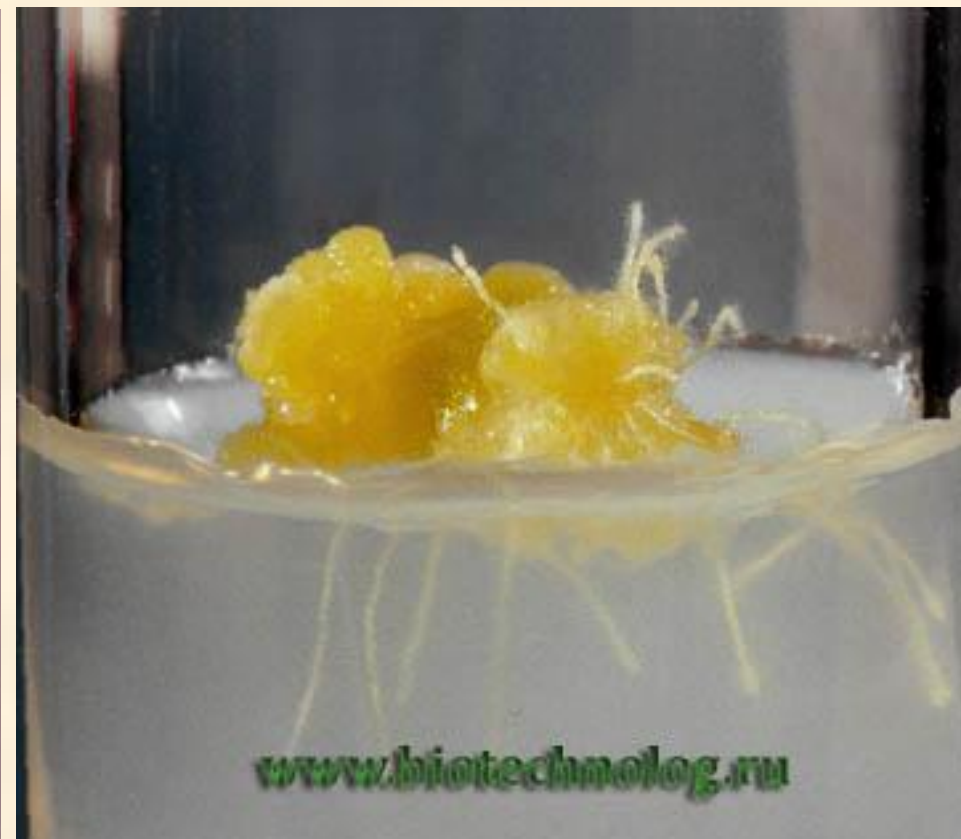
*мелкими,  
средними и  
крупными.*

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 (рис.).**



**Морфогенный каллус**



**Ризогенный каллус**

Из каллусных клеток средних размеров образуются ***соматические эмбриониды***, развитие которых через ряд стадий ведет к регенерации целого растения с корнями и побегами.



**Растение-регенерант из каллусов  
высокого морфогенетического  
потенциала**



**Прямой органогенез  
из соматических эмбрионидов**



- **Каллусы с высоким морфогенетическим потенциалом** обычно матовые, компактные, структурированные, имеют зеленые хлорофиллсодержащие участки, которые представляют собой **зоны морфогенеза**. Впоследствии там формируются **побеги или растения-регенеранты**. В культуре также встречаются **каллусы рыхлые, не имеющие глобулярного характера**. Такие каллусы либо совсем не способны к органогенезу, либо формируют **только корни**. Появление корней свидетельствует о сдвиге гормонального баланса в сторону ауксинов, что препятствует образованию побегов. Эти каллусы могут остаться ризогенными, и регенерировать из них растения не удастся. **Неморфогенные каллусы могут быть переведены в суспензионную культуру для получения вторичных метаболитов**.

- ***У растений почти всякая дифференциация обратима*** при условии, если дифференцированная клетка живая, в протопласте сохранилось ядро и не образовалась вторичная оболочка. Даже такие высокоспециализированные клетки, как микроспоры, с помощью ряда экспериментальных процедур можно заставить пролиферировать и дать начало целому растению. ***Итак, в определенных условиях многие из зрелых растительных клеток сохраняют способность делиться, а в некоторых случаях даже вступить на новый путь развития. Однако вопрос о том, как это происходит, какие события на молекулярном уровне сопровождают этот процесс, остается открытым.***



После деления перед каждой дочерней клеткой открывается одна из трех возможностей:

1. Клетка может *оставаться эмбриональной* и **вновь вступить в клеточный цикл с последующим митозом,**
  2. может оказаться как бы «вне цикла» (*Go*), *перестав делиться,*
  3. или, *приобретя компетенцию,* постепенно детерминироваться и вступить на путь дифференцировки (специализации).
- *Компетенция* — способность клетки воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.

# Суспензионные культуры

- Суспензионные культуры - отдельные клетки или группы клеток, выращиваемые во взвешенном состоянии в жидкой среде. **Представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, которую легко подвергнуть воздействию химических веществ.**
- Суспензионные культуры широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма, индукции ферментов и экспрессии генов, деградации чужеродных соединений, цитологических исследований и др.

Для *глубинного культивирования* растительных клеток применимы способы, разработанные в микробиологии. Различают **два вида систем культивирования: открытую и закрытую.**

- *Для закрытой системы характерен периодический режим выращивания.* Клеточная масса (инокулят) помещается в определенный объем среды. Система закрыта по всем параметрам, кроме газов, до конца выращивания. Периодически подается свежая питательная среда, а старая удаляется в том же объеме. Клетки остаются в системе в течение всего цикла выращивания.
- *Открытые (проточные) культуры характеризуются поступлением свежей питательной среды,* при котором отбирается не только старая питательная среда, но и часть урожая клеточной массы.

Наиболее изучено и распространено закрытое глубинное культивирование.

Для культивирования суспензий в производственных масштабах применяется аппаратура, разработанная для микробиологической промышленности

***Отличительная особенность суспензионных культур клеток растений — высокая плотность, необходимая для роста.***

- *Периодическое, или накопительное, культивирование — это самый простой способ выращивания клеток, являющийся пока традиционным.*
- **Суспензионные культуры используют для промышленного получения вторичных метаболитов.**

*Вещества, продуцируемые растительными клетками используются в медицине, парфюмерной промышленности, растениеводстве и других отраслях промышленности. К ним относятся: алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, пигменты, антиканцерогены (платецин, харрингтонин), пептиды (ингибиторы фитовирусов).*

- **В настоящее время в разных странах около 100 видов растений используется в биосинтетической промышленности для получения экономически важных веществ, среди них — женьшень, раувольфия змеиная, наперстянка шерстистая и пурпурная, диоскорея дельтовидная, воробейник, беладонна, паслен дольчатый, дурман обыкновенный, ландыш майский, клещевина, агава, мак снотворный и др.**

# Культивирование отдельных клеток

Отдельные клетки культивируют для получения клонов, изучения их генетической и физиологической изменчивости или стабильности.

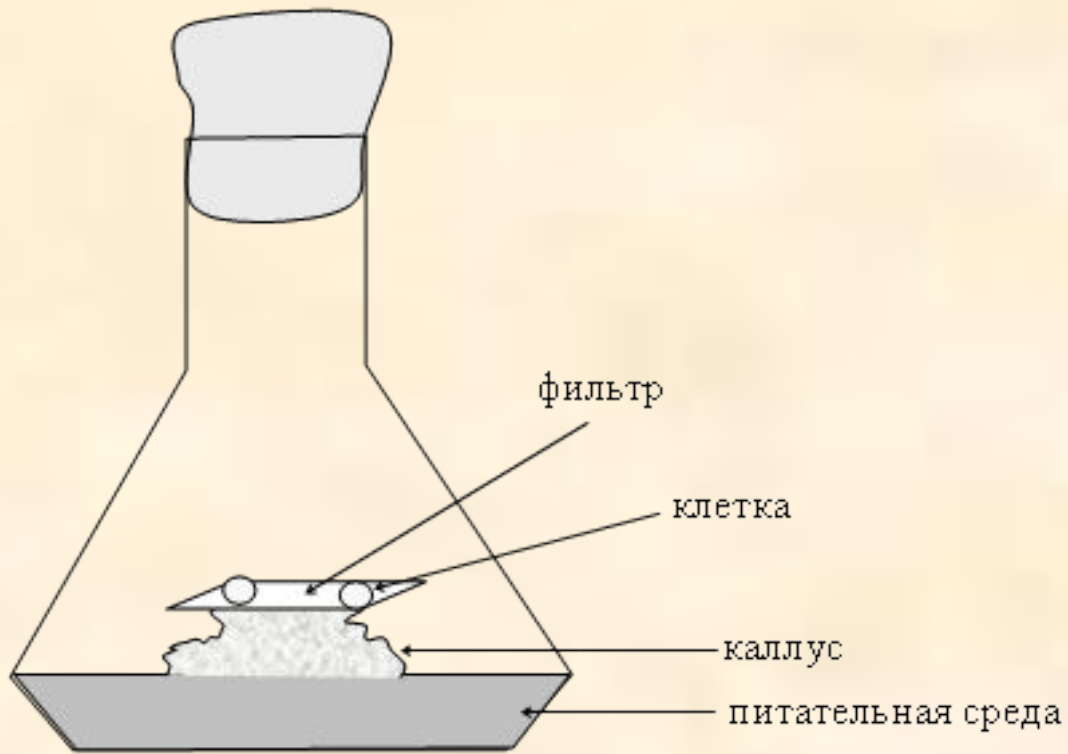
- Позволяет изучать условия, определяющие возникновение стимулов к делению у клеток, изолированных от влияния других клеток популяции или ткани.
- Важны для клоновой селекции мутантных, гибридных и трансформированных линий. Обычно в такие клетки вводят маркерные гены, которые позволяют осуществлять селекцию.
- Могут служить моделью для сравнительного изучения физиологических процессов в ткани и изолированной клетке. Например, для изучения фотодыхания можно сравнивать процесс фотосинтеза на уровне отдельных клеток мезофилла листа и целой ткани.

## Выращивание изолированных клеток складывается из двух этапов:

- 1) *изоляция 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. Далее клетки изолируют либо при помощи микроманипуляторов, либо путем ряда последовательных разведений. Впервые подобрать условия, подходящие для деления отдельных клеток, удалось в 1954 году Мьюиру, Хильденбранту и Райкеру. Этот способ получил название метода «ткани – няньки» (рис.).

Можно также использовать метод «кормящего слоя». Для этого берут суспензию клеток того же вида, что и одиночная клетка, или близкого вида.



**Схема использования каллуса в качестве «ткани - няньки»**

# Культуры гаплоидных клеток растений, их значение для генетики и селекции

Большой интерес для селекционеров представляют гаплоидные растения. Гаплоиды получают двумя способами.

- **Первый способ классический – *отдаленная гибридизация*, когда в зиготе отдаленного гибрида хромосомы одного из видов элиминируют.**
- **Второй способ основан на методиках культивирования *in vitro*, где из неоплодотворенных половых клеток с редуцированным набором хромосом можно регенерировать целые растения.** Обычно они стерильны, так как у них нарушено формирование мужских и женских гамет. При культивировании *in vitro*, однако, может произойти **спонтанное удвоение хромосом**, или его можно вызвать искусственно, например, обработав колхицином клетки или растения. **Дигаплоиды** фертильны и вполне жизнеспособны.



# Гаплоиды и дигаплоиды имеют ряд преимуществ в селекционной работе:

1. гаплоидные растения имеют один набор хромосом, характерный для гамет, что дает селекционерам **возможность наблюдать мутации сразу же в ходе осмотра гаплоидных растений**, поскольку все рецессивные генные мутации в гаплоидных организмах не маскируются доминантными аллелями;
  2. если гаплоидные клетки подвергнуть полиплоидизации с помощью колхицина, то возникнут **дигаплоиды, характеризующиеся абсолютной гомозиготностью**. *Скращивание гомозиготных линий дает, как правило, высокопродуктивное потомство;*
  3. гомозиготные растения используются селекционерами и в других целях: **количественный генетический анализ, изучение взаимодействия генов, изучение генетической изменчивости, определение групп сцепления, установление числа генов, действующих на количественные признаки, определение локализации полигенов и т.д.**
- гаплоидные растения *лишены летальных или сублетальных мутаций*, ведущих к гибели или ослаблению потомства.

## Наиболее распространены следующие методы индуцирования гаплоидов:

- **индуцированный андрогенез** в культуре пыльников и пыльцы;
- **селективная элиминация хромосом** в гибридном зародыше. Этот метод чаще всего используется в селекции злаковых;
- **псевдогамия** - развитие гаплоидного зародыша после оплодотворения инородной пыльцой без оплодотворения яйцеклетки или же развитие изолированной семязпочки (**гиногенез**).

В клеточной инженерии чаще применяется первый метод. **Впервые гаплоидные растения были получены в 1964 году индийскими исследователями С. Гуха и С. Махешвари при культивировании пыльников дурмана.** С тех пор таким методом получены гаплоидные растения более чем у **200 ВИДОВ**, в том числе у пшеницы, ячменя, ржи, риса, картофеля и других культур.

**Новые экспериментальные системы для  
изучения синтеза вторичных  
метаболитов с использованием  
культуры тканей растений**

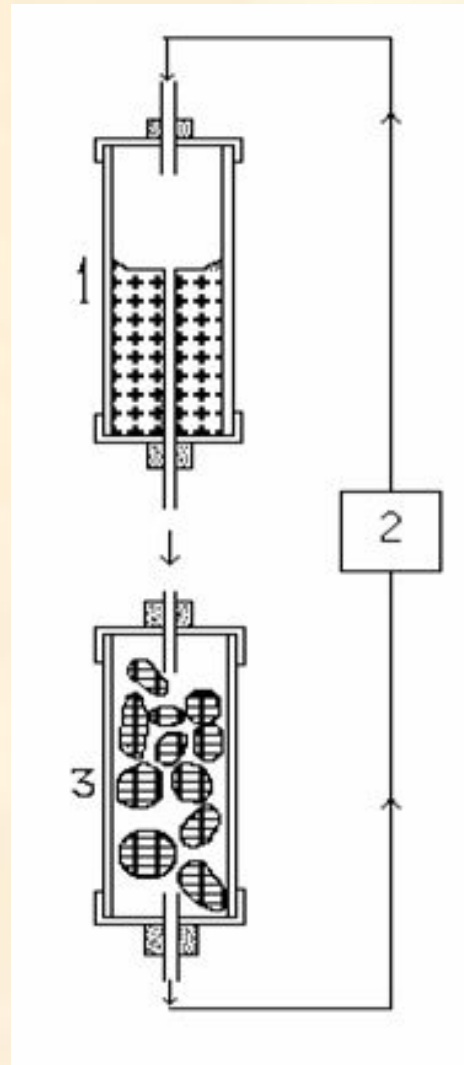
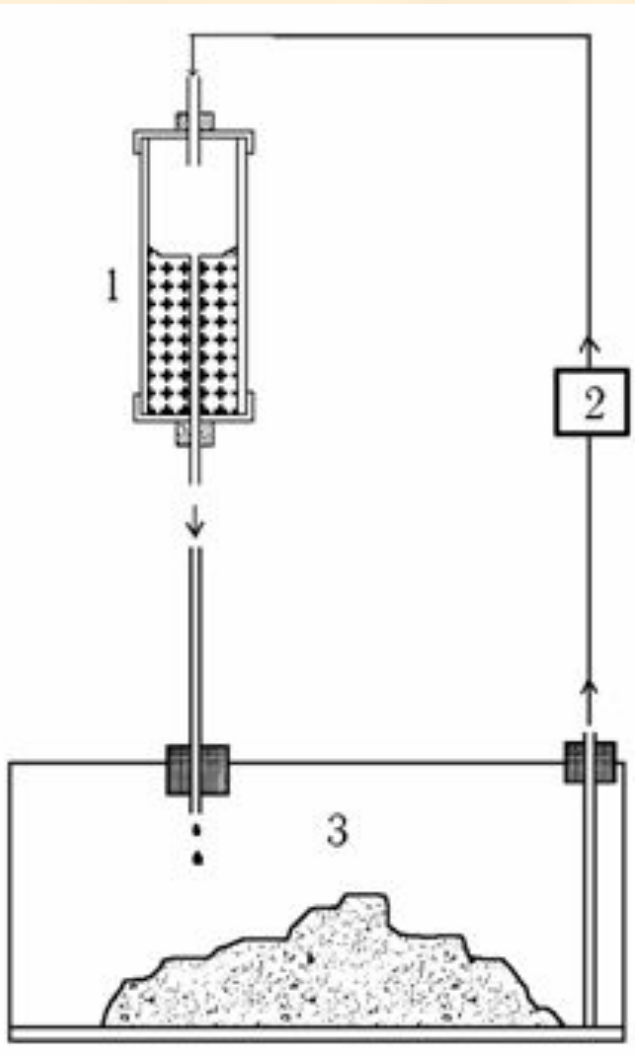
- *Необходимость иммобилизации  
растительных клеток*

**Новым подходом, направленным на увеличение выхода вторичных метаболитов, является иммобилизация клеток и тканей растений. Первая удачная попытка зафиксировать целые клетки была осуществлена в 1966 г. Мосбахом.** Он зафиксировал клетки лишайника *Umbilicaria pustulata* **в полиакриламидном геле.** На следующий год ван Вецель выращивал клетки эмбрионов животных, иммобилизованных **на микрошариках ДЭАЭ** (диэтиламиноэтил сефадекса, на основе декстрана). После этого клетки были иммобилизованы на **разных субстратах.** В основном это были **клетки микроорганизмов.**

**В последнее время интерес к иммобилизации клеток растений значительно возрос, это связано с тем, что иммобилизованные клетки имеют определенные преимущества перед каллусными и суспензионными культурами при использовании их для получения вторичных метаболитов.**

- Методы иммобилизации клеток делят на 4 категории:
  1. *Иммобилизация клеток или субклеточных органелл в инертном субстрате.* Например, клетки *Catharanthus roseus*, *Digitalis lanata* в альгинатных, агарозных шариках, в желатине и т.д. Метод предполагает обволакивание клеток одной из различных цементирующих сред – альгинат, агар, коллаген, полиакриламид.
  2. *Адсорбция клеток на инертном субстрате.* Клетки прилипают к заряженным шарикам из альгината, полистирола, полиакриламида. Метод применялся в экспериментах с животными клетками, а также клетками *Saccharomyces uvarum*, *S. cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *E. coli*.
  3. *Адсорбция клеток на инертном субстрате с помощью биологических макромолекул (таких, как лектин).* Применяется редко, есть сведения об экспериментах с различными линиями клеток человека, эритроцитами крови барана, адсорбированными на покрытой белком агарозе.
  4. *Ковалентное связывание с другим инертным носителем типа КМЦ.* Очень редко применяется, известна удачная иммобилизация для *Micrococcus luteus*. В основном проводились эксперименты по иммобилизации клеток животных и микроорганизмов.

- 1. Клетки, иммобилизованные в или на инертном субстрате, образуют биомассу гораздо медленнее, чем растущие в жидких суспензионных культурах.
- 2. Кроме медленного роста иммобилизация клеток позволяет им расти в тесном физическом контакте друг другом, что благоприятно отражается и на химических контактах.
- 3. Регулировать выход вторичных метаболитов можно также, изменяя химический состав окружающей среды.
- 4. В некоторых случаях возникают проблемы с выделением идиолинов. Иммобилизация клеток способствует легкой изоляции идиолинов.



Существует 2 типа систем культивирования

иммобилизованных клеток:

1. Система культуры с плоской основой, клетки выращиваются в горизонтально расположенном сосуде.

2. Система колоночной культуры, где клетки выращиваются в вертикальном сосуде.

В обеих системах жидкая среда циркулирует вокруг физически неподвижных клеток.

- Система культуры с плоской основой и
- Система культуры в колонке



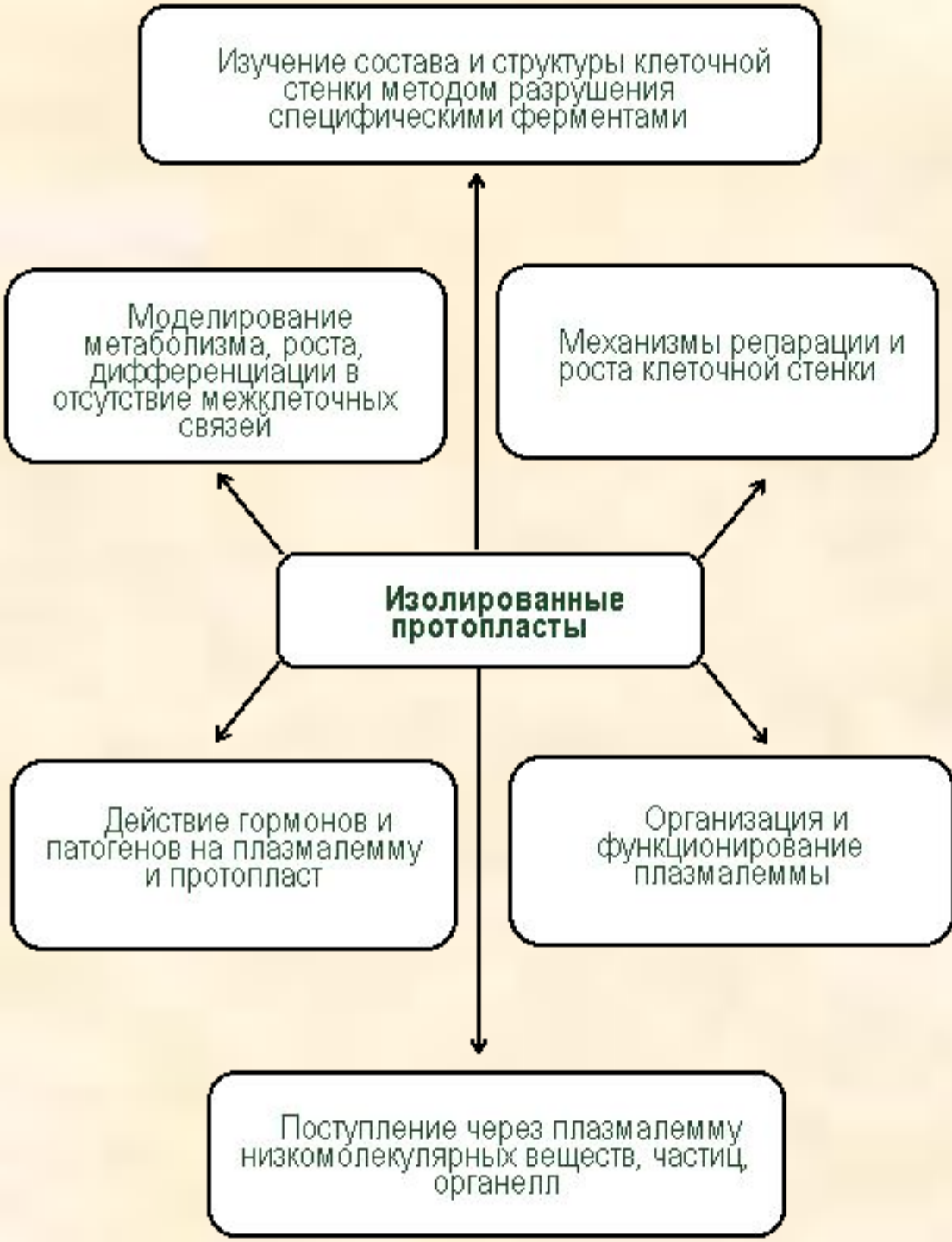
## Протопласты растительных клеток как объект биологического конструирования

- *Протопласты являются уникальной моделью для изучения фундаментальных физиологических проблем у растений. Они незаменимы при изучении состава, структуры и функционирования плазмалеммы в норме и при воздействии на нее гормонами, ингибиторами, фитотоксинами, а также при взаимодействии самих протопластов в популяции. Кроме того, протопласты могут использоваться для определения состава и архитектоники первичной клеточной стенки и изучения механизма ее репарации после разрушения.*



**Изолированные протопласты имеют ряд областей применения, как теоретического, так и прикладного характера:**

- 1. Изучение химии и структуры клеточной стенки (и при разрушении, и при синтезе «de novo»).**
- 2. Изучение свойств плазмалеммы, трансмембранных перемещений.**
- 3. «Мягкое» выделение органелл.**
- 4. Наблюдение за закономерностями дифференцировки клеток при слиянии протопластов, отслеживание взаимодействия ядра и цитоплазмы в полученной гибридной клетке, изучение соматических гибридов.**
- 5. Введение чужих органелл.**
- 6. Введение чужеродных генов в растительную клетку (трансгенез).**



- **Изолированные протопласты – объект и модель в физиологических исследованиях (по Р.Г. Бутенко, 1981)**

- **Протопласт - клетка, лишенная целлюлозной оболочки, окруженная цитоплазматической мембраной, сохраняющая все свойства, присущие растительной клетке. *Впервые протопласты в 1892 г. выделил Дж. Клеркер, который использовал механический способ.* При этом способе у плазмолированных клеток разрезают клеточную стенку, протопласты выходят в среду. В настоящее время метод претерпел модификации, улучшен, но имеет ряд ограничений:**
  - невысокая производительность,
  - можно использовать ткани только с экстенсивным плазмолизом,
  - трудоемкость и длительность.

- Другой метод выделения протопластов - **энзиматический**, с использованием ферментов. В 1952 году Салтон с помощью фермента **лизоцима** впервые разрушил клеточную стенку бактерий. В 1960 году Коккинг обработал кончики корней томата гидролитическим ферментом из культуральной жидкости плесневых грибов (*Myrothecium verrucaria*) и впервые получил изолированные протопласты высших растений энзиматическим способом.
- Преимущества энзиматического метода по сравнению с механическим:
  - одновременно выделяется большое количество протопластов (до 10 млн. из грамма ткани или клеток),
  - клетки не подвергаются сильному осмотическому стрессу,
  - клетки не повреждаются,
  - метод сравнительно быстрый.

- **Существуют два способа культивирования протопластов: метод *жидких капель* и метод *платирования*.**
- ***В первом случае* суспензию протопластов в виде капель помещают на пластиковые чашки Петри. Вариацией этого способа является культивирование единичных изолированных протопластов в микрокаплях объемом 1 мкл, предложенное Ю. Глебой в 1978 г.**
- ***Во втором* - суспензию протопластов наливают в пластиковые чашки Петри, добавляют равный объем той же среды с 1% агаром при температуре не выше 45°C. После остывания чашки Петри переворачивают и культивируют при 28°C. В данном случае протопласты фиксированы в одном положении и физически отделены друг от друга. Это дает возможность наблюдать за развитием интактного протопласта: формированием клеточной стенки, делением, ростом и развитием растения. Вариантом этой техники является использование кормящих протопластов или клеток, подвергнутых воздействию рентгеновского или  $\gamma$ -излучения, что блокирует их способность к делению. Такие протопласты или клетки смешивают с жизнеспособными протопластами и они поддерживают и стимулируют их рост.**

- Изолированные протопласты, еще не образовавшие клеточной стенки, могут сливаться между собой. ***Слияние протопластов - своеобразный метод гибридизации, так называемая парасексуальная, или соматическая гибридизация.*** В отличие от обычной, где сливаются половые клетки (гаметы), в качестве родительских при парасексуальной гибридизации используются диплоидные клетки растений. Внеядерные генетические детерминанты у большинства высших растений наследуются в половом процессе строго одноядерно и матерински.

## **Техника парасексуальной гибридизации может позволить:**

- скрещивание филогенетически отдаленных видов растений (организмов),**
- получение асимметричных гибридов, несущих генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами, органеллами или цитоплазмой другого,**
- слияние трех и более клеток,**
- получение гибридов, представляющих сумму генотипов родителей,**
- перевод мутаций в гетерозиготное состояние, что позволяет получать жизнеспособные формы при слиянии протопластов, поскольку мутагенез довольно часто дает дефектное по морфогенезу растение,**
- получение растений, гетерозиготных по внеядерным генам и др.**

- **Первое сообщение о получении соматических гибридов на уровне растений появилось в 1972 году (Карлсон и коллеги), в нашей стране подобное осуществили в лаборатории Бутенко Р.Г. в 1975 году.**



- Слияние протопластов приводит либо к образованию *гибрида*, либо к образованию *цибрида*.
- Соматический гибрид - продукт слияния и цитоплазмы, и ядра обоих протопластов.
- Цибрид (цитоплазматический гибрид) - растение-регенерант, содержащее цитоплазму обоих родителей и ядро одного из них. Цибриды получают, облучая перед слиянием один из протопластов  $\gamma$ -лучами для разрушения ядра. Скрининг таких клеток проводится по генам – маркерам ядерного и цитоплазматических (митохондриального и хлоропластного) геномов. Есть указания на рекомбинацию ДНК митохондрий и хлоропластов в гибридных клетках (Ю.Ю. Глеба, К.М. Сытник, 1984).
- При слиянии могут образовываться и так называемые *асимметричные гибриды* – продукты слияния, имеющие полный хромосомный набор одного из партнеров и часть хромосом другого партнера. Такие гибриды часто возникают при слиянии клеток организмов, филогенетически удаленных друг от друга. Асимметричные гибриды бывают устойчивее, плодовитее и жизнеспособнее, чем симметричные, несущие полные наборы генов родительских клеток.

- Впервые зрелый *межвидовой гибрид*, полученный в результате парасексуальной гибридизации протопластов 2 сортов табака (*Nicotiana glauca*, с 24 хромосомами и *N.langsdorfii* с 18 хромосомами), описан Карлсоном в 1972 г. Каллус амфиплоидного гибрида мог расти на безгормональной среде. Гибридное растение цело. С тех пор были получены жизнеспособные внутривидовые, межвидовые, межродовые гибриды.
- Осуществлено слияние протопластов культурного картофеля сорта Приекульский ранний (*Solanum tuberosum*) с протопластами дикого картофеля (*S. chacoense*). Известно, что у дикого картофеля клубни очень мелкие. Вместе с тем, растение устойчиво ко многим заболеваниям. Картофель сорта Приекульский ранний образует крупные клубни, но растения этого сорта восприимчивы к болезням.

- Первая попытка по созданию *межродовых гибридов* принадлежит Г. Мельхерсу, создавшему в 1978 году гибрид картофель + томат, так называемый *томатофель*.
- Японскими исследователями (Х. Кисака с соавт., 1997) путем электрослияния протопластов ячменя и риса был получен межродовой соматический гибрид.
- Ю. Ю. Глебой с сотрудниками проводились многочисленные эксперименты по созданию *межтрибных гибридов*. Триба - таксономическая единица между семейством и родом. Получены удачные гибриды между *Arabidopsis* и *Brassica* (турнепс) - *Arabidobrassica*. У гибридных линий индуцировали морфогенез корней и растения. Растения генетически и морфологически униформны, не цвели. На вид - уродливы, очень много тератомоподобных образований, похожих на цветки.
- Первые работы по получению *межсемейственных гибридов* проведены К. Као и В.Веттером в 1976-77 гг. (soя + табак). Позднее в лаборатории Ю.Ю. Глебы провели аналогичные эксперименты пасленовые + бобовые и лилейные (горошек + табак и лук + табак). И.Ф.Каневскому удалось индуцировать морфогенез стеблеподобных тератом в культуре межсемейственных гибридов *N.tabacum* + *Vicia faba*.

- Практически во всех случаях наблюдалась *видоспецифичная элиминация хромосом одного из родителей*. В культурах межсемейственных гибридов наблюдалось много многоядерных клеток, клеток с мини ядрами, в метафазах делений встречались гигантские хромосомы. Отмечена асинхронность в расхождении родительских хромосом в анафазе. Морфогенез у такого материала отмечен не был.

Для отдаленных гибридов характерно:

- 1. *Относительная стабильность гибридного состояния, при котором не наблюдается полной элиминации генетического материала одного из родителей.*
- 2. *Генетические перестройки (реконструкция и частичная элиминация хромосом).*
- 3. *Генетическая разнокачественность клонов гибридных клеток.*
- 4. *Ограниченная морфогенетическая способность.*

- Изучение *межцарственных гибридов* клеток "**животное + растение**" показало, что на этапе слияния видоспецифичность не проявляется, поэтому можно слить даже животную и растительную клетки. На более поздних этапах онтогенеза эти различия сказываются, что было установлено в экспериментах по слиянию протопластов арабидопсиса и табака с лимфоцитами человека. При этом происходило слияние цитоплазмы, ядра не сливались. *Эдвард Коккинг* параллельно проводил изучение ультраструктуры таких гибридов, работая с *клетками амфибий и протопластами моркови*. После объединения клеток ядра амфибии были окружены тонким слоем собственной цитоплазмы, но уже через 48 часов отмечалось полное смешивание цитоплазмы и регенерация клеточной стенки вокруг гетерокариона.

## Конструирование клеток

- Протопласты широко используются в качестве реципиентов для клеточных органелл. *В 1973 году И. Потрикусс и Ф. Хоффман успешно трансплантировали изолированные ядра пегуны в протопласты табака.*
- Трансплантируют ядра и другие органеллы, такие как митохондрии и хлоропласты.
- Клеточные органеллы можно переносить, например, посредством липосом.



# Клеточная селекция

- 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.
- 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.

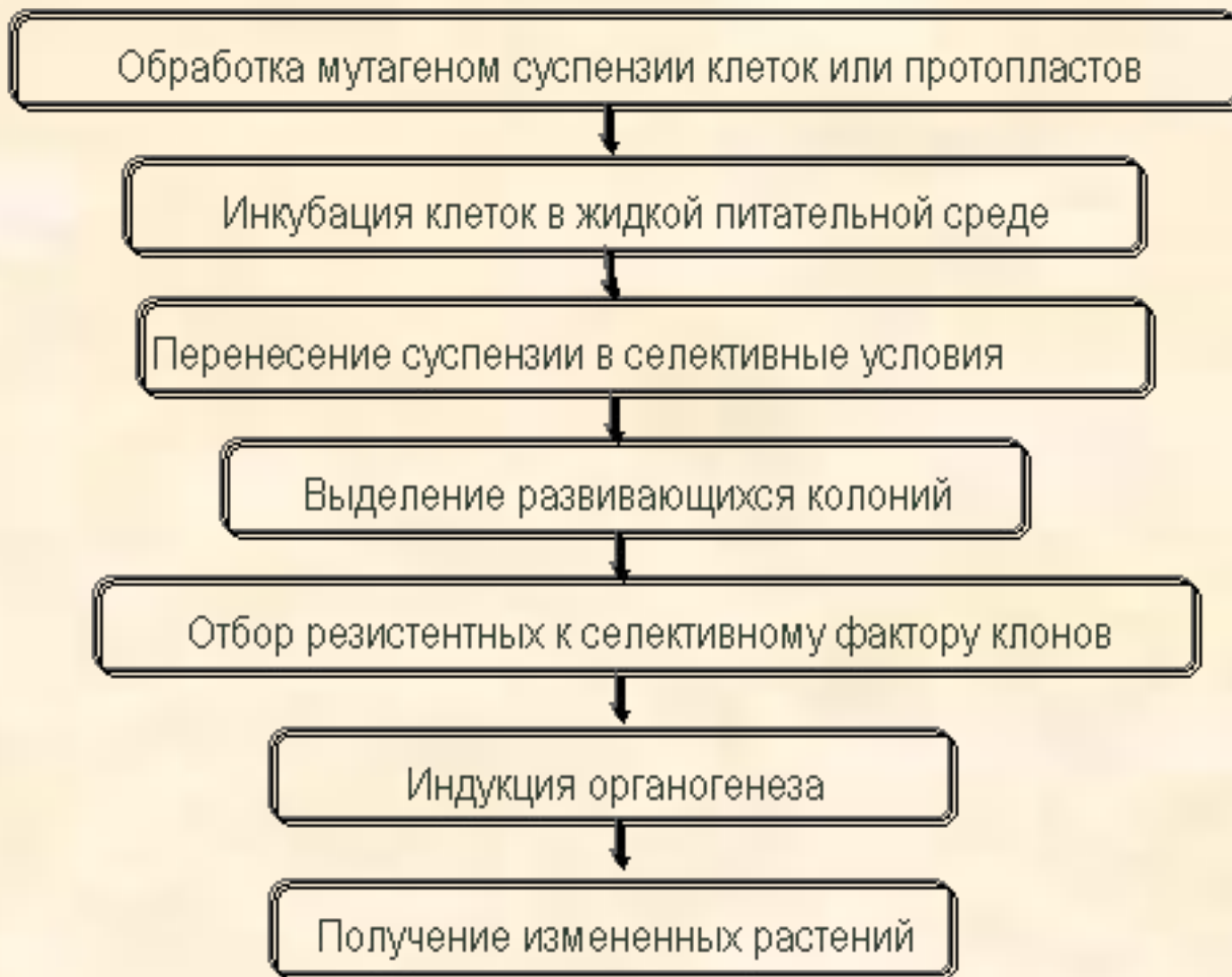


- **Выращивание зародышей в искусственной питательной среде называется эмбриокультурой.** Среда для выращивания зрелого зародыша может быть простой, без добавок физиологически активных веществ (например, среда Уайта) или любая другая, содержащая минеральные соли и сахарозу. При более отдаленных скрещиваниях 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.
- Метод эмбриокультуры находит все более широкое применение в межвидовой гибридизации овощных растений. Для лука, томатов и других овощных растений.
- Культура изолированных зародышей как вспомогательный метод при отдаленной гибридизации применяется не только для преодоления постгамной несовместимости, но также с целью микроразмножения ценных гибридов. В этом случае микроразмножение идет путем каллусогенеза, индукции морфогенеза и получения растений-регенерантов из каллусной ткани. Техника клонирования незрелых зародышей позволяет размножать ценные генотипы растений на ранних стадиях жизненного цикла. Еще одна возможность применения культуры зародышей — использование ее в клеточной селекции.

- 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 делящихся клеток дикого типа и выживания метаболически неактивных клеток, но требующая дополнительной идентификации у них мутационных изменений;
- **тотальная селекция**, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны;
- **визуальная селекция и неселективный отбор**, когда вариантная линия может быть идентифицирована среди всей популяции клеток визуально или при использовании биохимических методов (тонкослойная или жидкостная хроматография, радиоиммунный анализ, микроспектрофотометрия и др.).

- 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 легко доступный материал, который наиболее часто используют для клеточной селекции. Большое число работ по культивированию каллуса, с целью получения нового селекционного материала, проведено на пшенице, ячмене, рисе, сорго, а также на картофеле, томатах, люцерне и, крайне редко, на древесных.
- Например, путем культивирования и селекции *in vitro* зародышей из семян получены растения ячменя, устойчивые к аналогам аминокислот, с улучшенным содержанием белка. Для картофеля разработан эффективный метод обработки побегов и черенков мутагеном, приводивший к получению химерных мутантов хлорофиллдефектности и антибиотикоустойчивости.
- Проведение селекции на клеточном уровне позволяет создавать новые формы растений в 2—4 раза быстрее по сравнению с традиционными способами селекции.

- По сравнению с экспериментальным мутагенезом на уровне целых растений метод мутагенеза на уровне клеток имеет ряд преимуществ:
  - экономится площадь, так как в одной чашке Петри диаметром 10 см можно культивировать  $10^7 - 10^8$  клеток, а для такого же количества растений необходима площадь свыше тысячи гектаров;
  - мутантные признаки на уровне отдельных клеток проявляются довольно быстро;
  - возможно получение новых типов мутаций, в том числе и биохимического характера;
  - экономится время и трудозатраты на получение нового желаемого признака.
- Основным требованием для успешного использования клеточного мутагенеза является хорошо разработанная система регенерации растений. Важным условием является также возможность получения гаплоидов у того или иного вида растений. В дальнейшую селекционную работу включаются только те генотипы, у которых мутации проявляются на уровне целого растения.
- Растения с измененными признаками, полученные в результате мутагенеза на клеточном уровне, называются *вариантами* (термин «мутант» используется тогда, когда мутация подтверждается генетическими или молекулярно-генетическими методами).



- **Схема получения мутантных форм путем клеточной селекции (по В.И. Артамонову, 1989)**



# Микроклональное размножение и оздоровление растений

- В природе существует два способа размножения растений: *половой (семенной) и вегетативный*. Оба эти способа имеют как свои преимущества, так и недостатки.
- К недостаткам *семенного* размножения относятся *генетическая пестрота* семенного материала и *длительность ювенильного периода*.
- При *вегетативном* размножении генотип материнского растения сохраняется, а также сокращается длительность ювенильного периода. Однако *большинство видов плохо размножается вегетативным способом*, к ним относятся многие *древесные породы*. Например, эффективность размножения, даже на ювенильной стадии, дуба, сосны, ели, орехоплодных не очень высока. Кроме того, с помощью черенкования невозможно размножить многие виды древесных растений в возрасте старше 10-15 лет. *Трудно получить стандартный посадочный материал, так как существует возможность накопления и передачи инфекции*. Операции по размножению с помощью прививок сложны и трудоемки.



- ***Клональное микроразмножение - получение in vitro, неполовым путем, генетически идентичных исходному экземпляру растений.***  
**В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность. Термин "клон" был предложен в 1903 году Уэбстером (от греческого klon - черенок или побег, пригодный для размножения растений). В соответствии с научной терминологией клонирование подразумевает получение идентичных организмов из единичных клеток.**



Этот метод 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 растений и  $10^4$  - 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 всего года;*
- *возможность автоматизации процесса выращивания.*

- **Пионером клонального микроразмножения считается французский ученый Жан Морель, который в 50-х годах нашего столетия получил первые растения - регенеранты орхидей.**
- Под руководством Р.Г.Бутенко были изучены условия микроразмножения картофеля, сахарной свеклы, гвоздики, герберы и др. растений и предложены промышленные технологии. В дальнейшем исследования по клональному микроразмножению охватили и древесные растения.
- Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 20-х годов нашего столетия и связаны с именем Готре, который показал, что камбиальные ткани некоторых растений способны к каллусогенезу *in vitro*. Но первые растения - регенеранты осины, доведенные до почвенной культуры, были получены лишь в середине 60-х годов Матесом.
- В настоящее время, несмотря на перечисленные трудности, насчитывается более 200 видов древесных растений из 40 семейств, которые были размножены *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, сосна, ель, секвойя и др.).
- **см. презентацию**

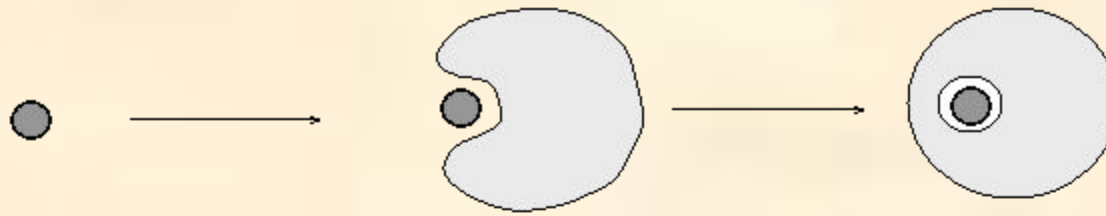
# Создание искусственных ассоциаций культивируемых клеток высших растений с микроорганизмами

- Экспериментальные клеточные системы называются ассоциациями.
- Ассоциации могут быть как *внутриклеточные* (эндосимбиотического типа), так и *межклеточные* (экзосимбиотического типа).
- *В первом* случае микроорганизмы вводят в изолированные протопласты высших растений.
- *Во втором* - совместно культивируют клетки и ткани растений с микроорганизмами.
- При создании ассоциаций предполагается, что клетки и их популяции должны приобретать новые свойства, обусловленные присутствием в них микроорганизмов.

- **Цели создания популяций:**
- **1. Экспериментальная проверка гипотезы теории симбиотического происхождения эукариотической клетки, которое предположительно проходило через стадии эндо- и экзосимбиоза. Реконструкция отдельных стадий эволюционного процесса симбиогенеза.**
- **2. Моделирование природных симбиотических отношений растений и микроорганизмов, играющих огромную роль в процессе фиксации атмосферного азота (обеспечение связанным азотом природных экосистем, а также агроценозов).**
- **3. Повышение продуктивности растительных клеток-продуцентов экономически важных веществ.**
- **4. Получение растений с *новыми свойствами*, при условии, что отношения, складывающиеся между клетками партнеров при совместном выращивании, сохраняются в растениях-регенерантах. В литературе обсуждаются возможность улучшения таким способом сельскохозяйственных растений, а также получение растений со способностью к автономной фиксации азота.**

- **Улучшение сельскохозяйственных растений предполагает получение растений, способных к фиксации молекулярного азота.**
- **Для повышения доли биологической фиксации азота используют 3 подхода:**
- **1. Инокуляция азотфиксирующими микроорганизмами (бактериальные удобрения). Недостаток - низкая выживаемость интродуцируемых чистых культур и вытеснение их естественной почвенной микрофлорой.**
- **2. Создание азотфиксирующих растений методами генной инженерии. При этом предлагается вводить гены *nif* в протопласты высших растений. Препятствия на этом пути: процесс требует большого количества энергии, которой нет в растительной клетке, нет также систем транспорта, запасов железа и молибдена, необходимых для синтеза нитрогеназы, нет систем защиты нитрогеназы от инактивации кислородом.**
- **3. Введение целых азотфиксирующих организмов в растения. Такие ассоциации должны учитывать особенности организации природных азотфиксирующих симбиозов:**
  - - целостность обоих партнеров,
  - - интеграция партнеров в пределах организма макросимбионта,
  - - относительная обособленность макросимбионта.

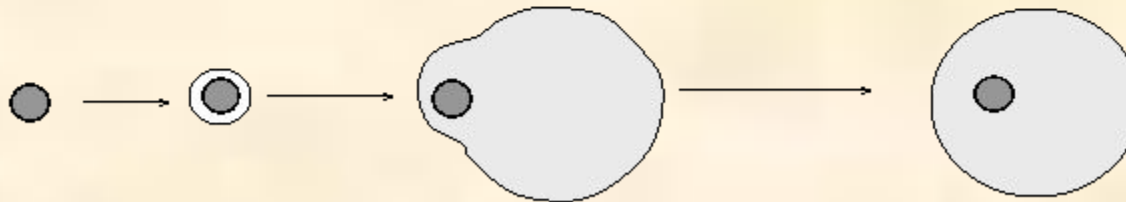
- **В изолированные протопласты растений вводили микроорганизмы следующих систематических групп: бактерии, дрожжи, цианобактерии, цианеллы.**
- **Существует несколько способов введения микроорганизмов в протопласты (рис.):**
- **1 Эндоцитоз (инвагинация плазмалеммы), при этом везикула с микроорганизмом высвобождается в цитоплазме протопласта.**
- **2. Интеграция (слияние) мембран протопласта и микроорганизма, органеллы водорослей высвобождаются в цитоплазму протопласта, но при этом они не окружены плазмалеммой протопласта.**
- **3. Заключение микроорганизма в искусственные мембраны - липосомы. Например, в протопласты лука вводили цианобактерии, заключенные в липидные капли.**



а) эндоцитоз (поглощение путем инвагинации мембраны)



б) слияние мембран



в) слияние мембраны протопласта с липосомой

- **Введение микроорганизмов в изолированные протопласты высших растений (по L. Folke, O.Gamborg, 1981)**
- **К сожалению, жизнеспособных систем на основе изолированных протопластов в настоящее время не получено, так как в процессе культивирования происходило разрушение либо микроорганизма, либо протопласта. Необходимы дальнейшие исследования.**



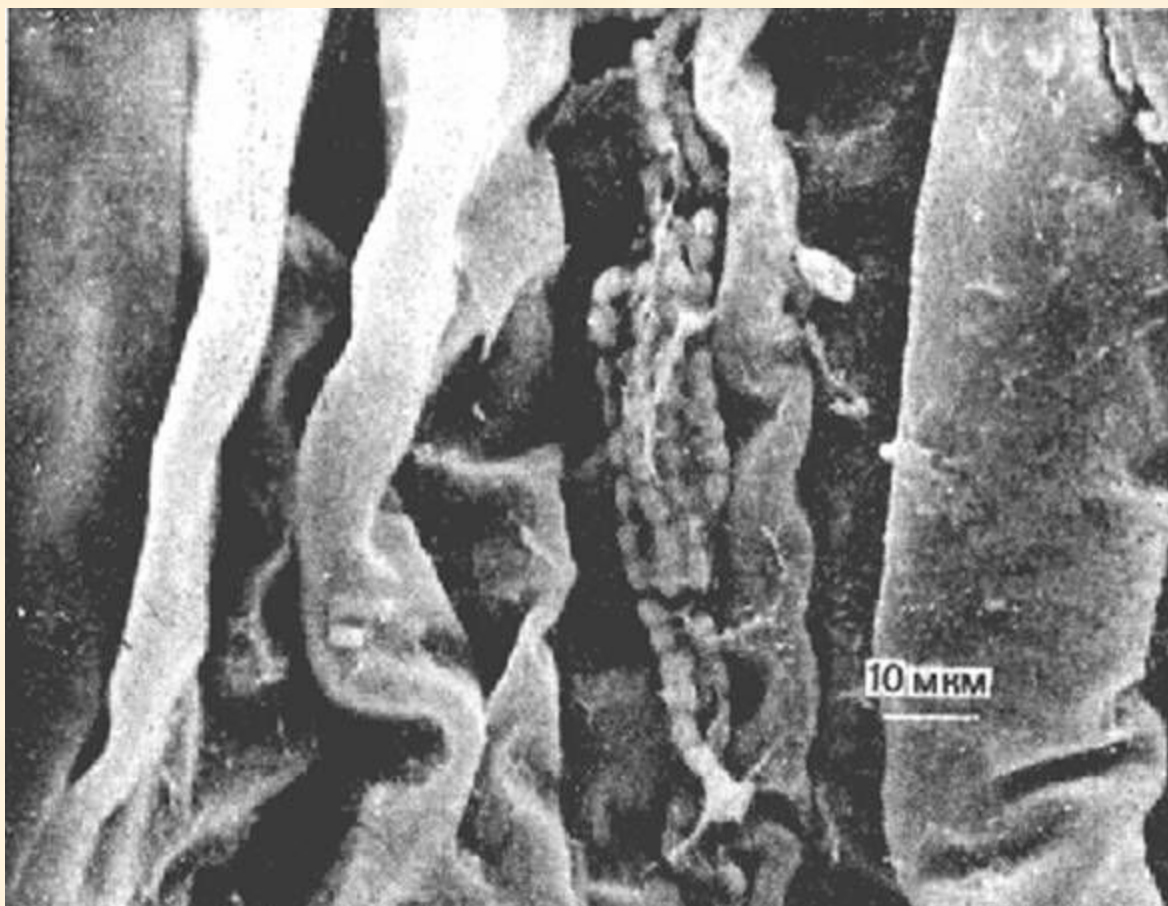
- **Ассоциации со свободноживущими азотфиксаторами**
- *Azotobacter, Azospirillum* живут в ризосфере растений и иногда образуют с ними ассоциации. Главная задача проведения экспериментов с этими бактериями - получение эффективных азотфиксирующих систем, растущих на среде без связанного азота, с перспективой регенерации растений.
- В таких экспериментах была обнаружена видовая специфичность. *Каллусные культуры табака, проса* быстро "обрастали" *Azospirillum*, но через 4 недели погибали. Ткань сахарного тростника субкультивировали в аналогичных условиях 18 месяцев, при этом стабильные ассоциации формировались только на среде с низким содержанием связанного азота или без него. Бактерии проявляли НГА во всех случаях.
- И *Azotobacter*, и *Azospirillum* в соответствующих ассоциациях были локализованы на поверхности или в межклетниках и никогда не проникали внутрь клетки. Растения-регенеранты пока не получены.



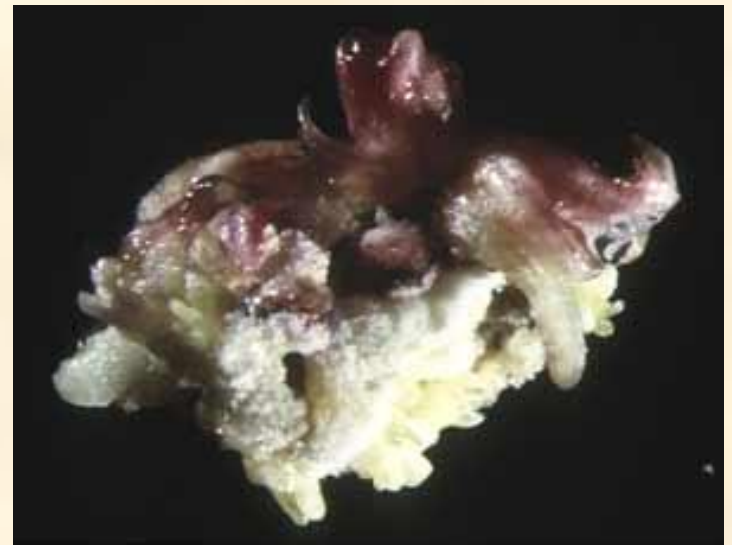
- **Ассоциации с зелеными водорослями**
- *Каллус моркови* инокулировали одним из штаммов *Chlorella*, культивировали на свету на среде с дефицитом азота, каллус жил несколько месяцев. Контрольные же растения погибали. Клетки водоросли не проникали внутрь растительных.
  
- **Ассоциации с грибами**
- *Ткань руты* отдельно культивировали с различными грибами, при этом на клетки растений влияли диффундирующие через агар выделения гриба. В некоторых случаях добавляли культуральную жидкость грибов. Совместное культивирование с *Botritis allii* увеличивало синтез алкалоидов в 10 раз по сравнению с контролем, а добавление культуральной жидкости - в 50 раз.

- **Цианобактерии в искусственных ассоциациях с растительными клетками**
- Цианобактерии как партнеры в искусственных ассоциациях имеют ряд особенностей:
- предполагают, что *древние цианобактерии сыграли роль в формировании эукариотической клетки;*
- чаще других фототрофов вступают в симбиотические отношения с другими организмами в природе;
- в симбиозах осуществляют различные метаболические функции: с автотрофами играют роль азотфиксаторов, с гетеротрофами обеспечивают партнеров продуктами фотосинтеза;
- способны выделять в среду углеводы, аминокислоты, пептиды, витамины, гормоны;
- в процессе фотосинтеза выделяют кислород, которые растения в процессе дыхания потребляют;
- находят практическое применение в улучшении обеспечения растений связанным азотом.

- **Результаты по получению ассоциаций цианобактерий с растениями - регенерантами представляют интерес в связи с проблемой повышения доли биологически связанного азота в азотном питании растений.**



- Цепочки *Anabaena variabilis* в углублениях складчатой поверхности стебля табака (по Р. Г. Бутенко и др., 1987)



- Построенная финским концерном “Кемира” в 1991 году **станция искусственного климата “Биотрон”** предоставляет собой уникальный комплекс позволяющий проводить исследования, как в новейших областях биотехнологии растений, так и производстве оздоровленного посадочного материала, разработке современных технологий выращивания растений в условиях защищенного грунта.
- В настоящее время на Станции “Биотрон” проводятся исследования по разработке методов получения трансгенных растений плодовых, ягодных и декоративных культур с хозяйственно-ценными признаками, по совершенствованию методов культивирования "in vitro" и разработке промышленных технологий производства оздоровленного посадочного материала различных с/х культур. На установке возможны также **исследования по клеточной инженерии, синтезу вторичных метаболитов в суспензионных и каллусных культурах.**



- *Микроклональное размножение растений in vitro*
- На станции “Биотрон” разработаны системы массового микроклонального размножения большого числа плодовых и декоративных культур. Созданы высокопроизводительные технологии получения массового безвирусного посадочного материала актинидии, ежевики, земляники, сирени, рододендронов, орхидей, лилий, гвоздики, узамбарской фиалки, розы, герберы, и др. плодово-ягодных и многолетних декоративных культур.
- Произведены опытные партии посадочного материала в десятки тысяч штук. Совместно с рядом организаций проводится работа по внедрению современных технологий элитного семеноводства картофеля в России.





- **Генетическая инженерия растений**
- **Разработаны методики генетической трансформации промышленных сортов плодовых культур: яблони, груши, вишни; ягодных культур: земляники, актинидии; овощных культур: моркови; цветочных культур: хризантемы, гвоздики. На станции функционирует установка для баллистической трансформации, необходимая при работе с злаковыми и другими труднотрансформируемыми культурами. С ее помощью разработана эффективная методика трансформации технической культуры - подсолнечника.**
- **Фундаментальные исследования молекулярной биологии растений. Изучаются молекулярно-биологические механизмы гормональной регуляции роста растений путем переноса генов регулирующих синтез и метаболизм фитогормонов (rolC). Получены модифицированные формы земляники, актинидии, хризантем. Проводятся исследования регуляции экспрессии растительного генома путем использования антисмысловых РНК. Показано эффективное подавление окраски цветов хризантем путем встраивания гена халконсинтазы львиного зева в антисмысловую ориентации имеющего 80% гомологию с нативным геном.**

## ***Устойчивость к фитопатогенам.***

**Для повышения устойчивости к насекомым в растения переносится ген эндотоксина *B.thuringiensis*. Трансгенные растения хризантем с этим геном показали устойчивость ряду вредителей в том числе впервые достигнута устойчивость к паутиному клещу (паукообразные). Трансгенные растения прошли тестирование в центре CPRL0 (Голландия)**

**Создаются конструкции для повышения и достижения тканеспецифичной экспрессии гена эндотоксина и переноса в другие культуры (яблоня, груша, гвоздика).**

**Для повышения устойчивости к бактериальной и грибной инфекции в растения яблони, груши и моркови перенесены гены растительных дефензинов из редьки. Эти антибиотико подобные белки в природе защищают семена в период прорастания и были клонированы в Институте сельскохозяйственной биотехнологии РАСХН.**

## ***Устойчивость к гербицидам.***

**Для получения устойчивых к гербициду "Basta" растений используется ген *bar* клонированный в Центре "Биоинженерия" РАН. Получены трансгенные растения клоновых подвоев яблони, груши и моркови, устойчивые к высоким концентрациям гербицида.**



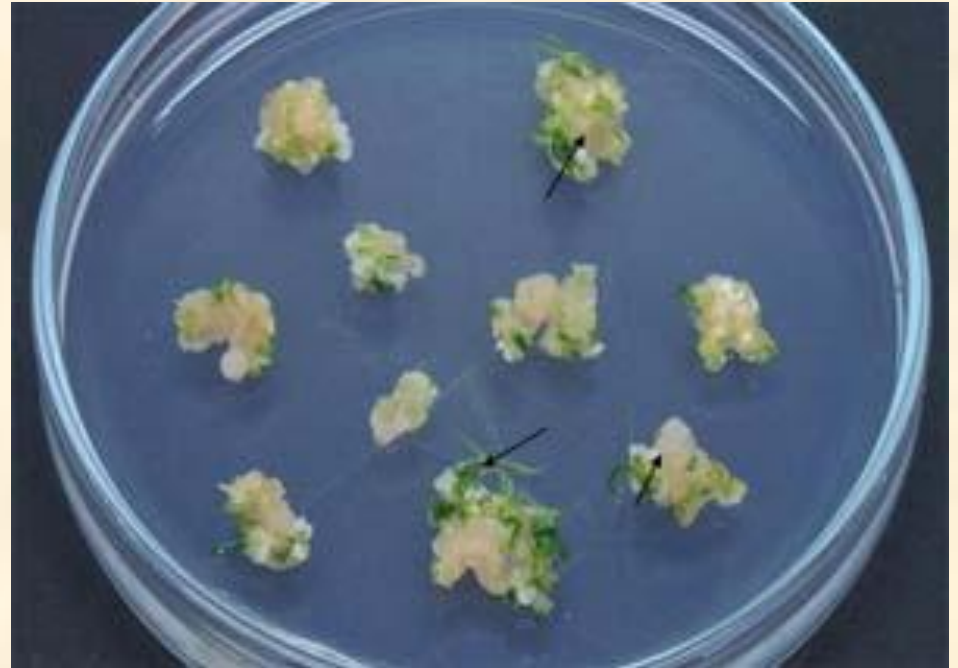


- ***Устойчивость к заморозкам.***
- В целях повышения морозостойкости растений созданы векторные системы для переноса гена антифризного белка полярных рыб в растения. Получены трансгенные растения земляники и вишни с этим геном. Однако по причине разной частоты использования кодонов и необходимостью достижения высокого содержания белка фенотипические проявления пока отсутствуют.
- ***Улучшение вкусовых качеств плодов.***
- Для улучшения вкуса плодов в растения яблони, земляники и моркови перенесен ген суперсладкого (в 6000 раз слаще сахара) белка тауматина II из тропического растения *Thaumatococcus danielli*. В листьях отдельных клонов яблони и груши, а также корнеплодах моркови и земляники уже наблюдается изменение вкуса в результате экспрессии перенесенного гена.
- ***Изменение архитектуры растений.***
- Путем переноса гена *rolC* из *A. rhizogenes* в хризантему получены клоны с компактной формой соцветий и измененными цветами.
- ***Изменение окраски цветов.***
- Путем переноса обратной последовательности гена халкон-синтазы львиного зева получены трансгенные растения хризантемы с измененной окраской цветов.
- 
- В настоящий момент трансгенные растения хризантемы, груши, яблони и земляники с различными генами проходят полевые испытания.

# Генетическая трансформация растений семьи злаков



**Колос *xTriticosecale* на 14 день после цветения для выделения незрелых зародышей**



**Образование и пролиферация эмбриогенного каллуса из незрелых зародышей на среде МС с 2 мг/л 2, 4-Д. (Стрелками показано спонтанное прорастание соматических эмбрионов)**

- Создание растений с заданными свойствами позволяют повысить их производительность, качество растительной продукции, повысить стойкость к болезням, вредителям, абиотическим и стрессовым факторам. Злаки это наиболее хозяйственно важное и в тот же время очень сложное семейство для применения биотехнологий. Несмотря на достигнутые успехи, перспективы реального улучшения злаков средствами генетической инженерии пока ограничены из-за сложности функционирования и недостаточной изученности их геномов, равно как и других клеточных процессов.
- Нами в данное время разрабатываются методы генетической трансформации растений семьи злаков. В экспериментах используются следующие виды семьи: *Triticum aestivum* (25 отечественных и 7 зарубежных генотипов), *Triticum durum* (1 сорт), *xTriticosecale* (5 сортов), *Secale cereale* (4 генотипа), *Hordeum vulgare* (8 отечественных и 3 зарубежных генотипа), *Avena sativa* (5 сортов), *Zea mays* (7 линий), *Oryza sativa* (5 отечественных и 1 зарубежный сорт), *Aegilops spp.* (5 видов), *Dactylis glomerata* (эмбриогенный генотип Р), *Tripsacum dactyloides*, *Echinochloa frumentacea*, *Agropyron repens*. Уже получены трансгенные растения отечественных сортов тритикале, пшеницы и овса.
- Ниже приведенная схема получения нами трансгенных растений *xTriticosecale* (сорта АДМ-6 и АДМ-12) с использованием плазмиды рАНС 25, что содержит *uid* репортерный ген, кодирующий б-глюкуронидазу (GUS) и селективный маркер, *bar* ген, кодирующий ЭНЗИМРАТ.



**Самодельная пушка для высокоскоростного обстрела тканей частичками с преципитированной на них ДНК**



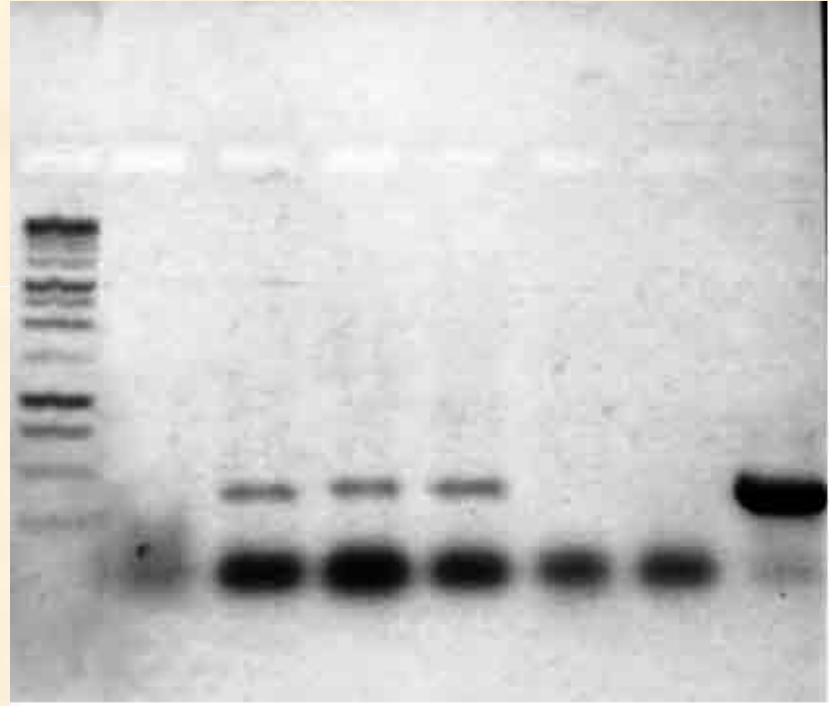
**Транзиентная GUS экспрессия через два дня после обстрела каллуса тритикале плазмидой pANC25**



**Образование побегов через 15 дней после начала регенерации на среде с 3 мг/л фосфинотрицина**



**Укоренившееся трансгенное растение тритикале на среде с 1мг/л фосфинотрицина, готовое к высаживанию в грунт.**



**ПЦР анализ на bar ген тритикале, регенерированного из каллуса после обстрела рАНС 25**





# **Методы сохранения генофонда**

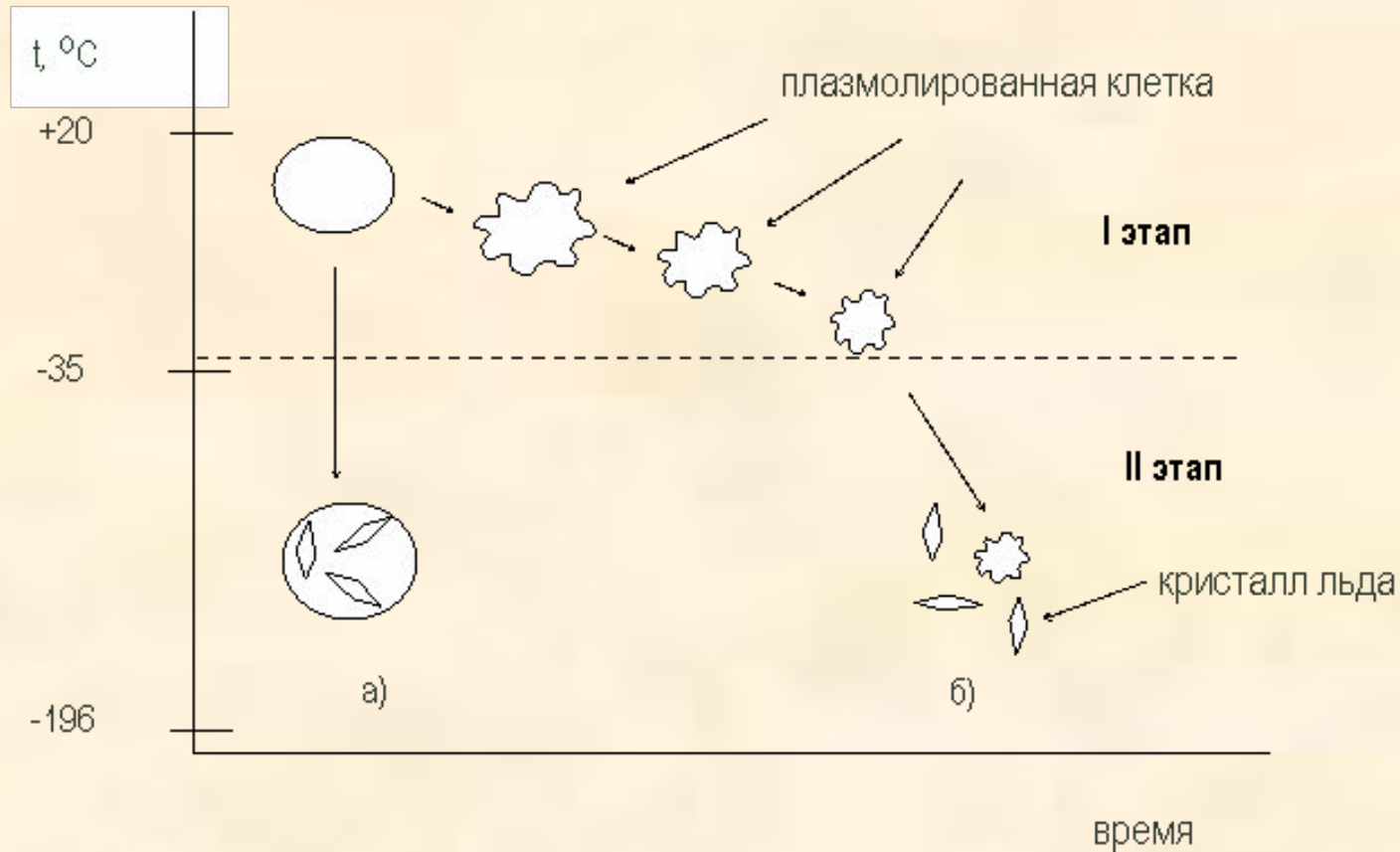
- **Существует разные подходы к сохранению культур:**
- **- криосохранение,**
- **- замедление роста,**
- **- сушка (распылительная и лиофильная) – для клеток микроорганизмов**

- *Криосохранение*

- Криосохранение - замораживание при сверхнизких температурах. Обычно его проводят в жидком азоте, при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$ .
- Успех низкотемпературной консервации зависит от ряда факторов:
  - - вид и тип клеток,
  - - их концентрация в суспензии,
  - - состав среды для консервирования,
  - - вид и концентрация криопротектора,
  - - режим охлаждения и отогрева,
  - - способ реабилитации клеток после отогрева.



- **Процесс замораживания растительных клеток от животных отличает, в основном, наличие этапа *предварительного культивирования*.**
- ***Криопротекторы*** - вещества, позволяющие снизить повреждающее действие физико-химических факторов при криоконсервировании. К ним относятся сахароза, декстран, этиленгликоль, поливинилпирролидон, диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин. Для определения токсичности криопротектора клетки выдерживают при комнатной температуре в различных его концентрациях в течение 30 - 50 минут, после чего определяют их жизнеспособность. Дополнительно оценивают его протективные свойства путем пробного замораживания и оттаивания культур. Наиболее часто в качестве криопротекторов используют глицерин и ДМСО. Перед добавлением криопротектора суспензию клеток концентрируют путем центрифугирования, надосадочную жидкость сливают. **Криопротекторы вносят в культуру за час до замораживания**, что приводит к изменению проницаемости мембраны, изменению точки замерзания и оттаивания.



- **Замораживание клеток: а) быстрое, б) медленное, поэтапное**
- **1-й этап: от +20 до -28°C со скоростью 1 градус в минуту (для растительных клеток скорость замораживания 0,5 градуса в минуту до -35°C), выдерживают при этой температуре 15 минут.**
- **2-ой этап: погружение в жидкий азот (мгновенное охлаждение до - 196°C).**

## *Замедление роста*

**Замедления роста можно добиться следующими методами:**

- 1. Хранение под слоем минерального масла (для бактериальных и грибных культур).**
- 2. Изменение газового состава и атмосферного давления внутри культурального сосуда.**
- 3. Изменение светового режима.**
- 4. Охлаждение до температуры прекращения активного роста.**
- 5. Применение гормональных и осмотических ингибиторов. Из гормональных ингибиторов наиболее часто используют хлорхолинхлорид (для растительных клеток), из осмотических - маннит в концентрации 3-6%.**
- 6. Замена  $\text{CaCl}_2$  на  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  в питательных средах.**

**Для картофеля в качестве способа, позволяющего сохранить генофонд, рекомендуется клубнеобразование в пробирках.**

# Бесклеточные системы в биотехнологии

- **Американский ученый М. Кальвин, чьи исследования в области изучения механизма фотосинтеза были отмечены Нобелевской премией, в 1972 году выдвинул идею создания фотоэлемента, в котором в качестве источника электрического тока служили мембраны хлоропластов. Основным компонентом таких мембран – хлорофилл, способный при освещении отдавать и принимать электроны. В качестве проводника, контактирующего с хлорофиллом, Кальвин использовал оксид цинка. Мембраны, содержащие хлорофилл, помещали в раствор ферментов, действующих как катализаторы ЭТЦ. На свету происходит фотолиз воды:  $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + 1/2 \text{O}_2$ . При освещении этой системы в ней также возникал электрический ток плотностью 0,1 мкА на см<sup>2</sup>. Такой фотоэлемент функционировал недолго, поскольку хлорофилл вскоре терял способность отдавать электроны. Для того, чтобы продлить время действия фотоэлемента, был использован дополнительный источник электронов - гидрохинон. В такой системе хлорофилл отдавал не только свои электроны, но и электроны гидрохинона. Полученный таким образом фотоэлемент площадью 10 м<sup>2</sup> может обладать мощностью 1 кВт.**

- **Японский ученый Фудзио Такахаси для получения электроэнергии использовал хлоропласты из листьев салата. Транзисторный приемник, к которому была присоединена такая солнечная батарейка, успешно работал.**
- **Если из системы убрать проводник и индуцировать образование водорода и кислорода, то система может служить также прототипом фотореактора, при помощи которого энергия Солнца запасается в ценном топливе - водороде.**
- **Преимущества системы:**
- **наличие избытка субстрата - воды,**
- **нелимитируемый источник энергии - Солнце,**
- **продукт (водород) можно хранить, не загрязняя атмосферу,**
- **продукт имеет высокую теплотворную способность (29 ккал/г) по сравнению с углеводородами (3,5 ккал/г),**
- **процесс протекает при нормальной температуре без образования промежуточных токсических веществ,**
- **процесс циклический, так как при окислении продукта образуется субстрат - вода.**
- **Мембраны хлоропластов можно иммобилизовать, закрепляя их в геле.**

- ***Получение фотогальванических элементов с использованием бактериальных мембран***
- **Другой механизм превращения энергии существует у галофильных бактерий. *Halobacterium halobium* используют энергию света, поглощаемую пурпурным пигментом бактериородопсином, находящимся в мембране клеток. Этот белок с необычными свойствами был выделен и описан в 1973 году У. Стохениусом и Д. Остерхельтом. С его помощью бактерии улавливают энергию Солнца. Поглощение света вызывает химические и физические превращения в молекуле пигмента, приводящие к переносу протонов с одной стороны мембраны на другую, при этом создаётся электрохимический градиент. Разность потенциалов может быть использована для генерирования электрического тока.**
- **В лаборатории В.П. Скулачева были созданы фотогальванические элементы для генерирования тока силой 800 мкА. В них применялись мембранные фильтры, пропитанные фосфолипидами с бактериородопсином и хлорофиллом. Такие фильтры, соединенные последовательно, могут служить в качестве электрической батареи.**

## *Бесклеточные белок синтезирующие системы (ББСС)*

- **Бесклеточные белок синтезирующие системы используются для изучения матричной активности иРНК и анализа транслируемых с них полипептидов. В их состав входят: рибосомы, матрица (искусственная или природная РНК), белковые факторы трансляции, аминоацил т-РНК, АТФ, одновалентные и двухвалентные катионы (К, Са), буферный раствор для поддержания гомеостаза, аминокислоты. В генной инженерии бесклеточные белок синтезирующие системы используются для исследования кодирующего потенциала и механизмов экспрессии клонированных генов *in vitro*, и на промежуточных этапах конструирования рекомбинантных генов для идентификации мРНК или фрагментов ДНК по кодируемым белкам.**