

**Министерство образования и науки Российской Федерации**

Владимирский государственный университет  
имени Александра Григорьевича и Николая Григорьевича Столетовых  
(ВлГУ)

**И.Е. Князьков, О.Н.Сахно**

# **КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ**

Владимир

АРКАИМ

2016

УДК 557.21  
ББК 28.04  
К54

**Рецензенты:**

*кандидат биологических наук, старший преподаватель  
МГУ им. М.В.Ломоносова **Н.В.Орешиникова**,  
кандидат биологических наук, доцент лаборатории ВНИИЗЖ  
**О.П. Бьядовская***

**Князьков И.Е.** Клеточная инженерия растений: учебное пособие/  
И.Е. Князьков, О.Н. Сахно; Мин-во образ. и науки РФ; Владимирский  
гос. Университет, - Владимир, «Аркаим», 2016, - 84 с.: табл., ил.

ISBN 978-5-93767-186-8

Пособие предназначено для магистров направления подготовки **06.04.01 «Биология»**, бакалавров направления 06.03.01 «Биология» при выполнении ими выпускных квалификационных работ по данной тематике. Также может представлять интерес для учащихся старших классов лицеев, колледжей и общеобразовательных классов, обучающихся по программе «Биоквантум».

Учебное пособие содержит краткие сведения о материалах и методах клеточной инженерии растений. Рассматриваются преимущества и возможные экологические риски. Пособие способствует активизации и результативности изучения курса и может быть использовано студентами для подготовки к занятиям, контрольным работам и экзамену. Рассмотренные методы и подходы биотехнологии растений могут быть реализованы при подготовке магистерской диссертации.

Таб.4, Библиогр.14

*Учебное пособие подготовлено в рамках государственного задания  
ВлГУ №2014/13*

УДК 557.21  
ББК 28.04

ISBN 978-5-93767-186-8

© ФГБОУ ВО «Владимирский  
государственный университет», 2016  
© Князьков И.Е., Сахно О.Н., 2016

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>Введение</b>	<b>4</b>
<b>Раздел 1. Цели и задачи клеточной инженерии растений</b>	<b>4</b>
<b>Раздел 2. Особенности клеток растений <i>in vitro</i></b>	<b>12</b>
2.1. Онтогенез клеток <i>in vitro</i>	13
2.2. Соматональная вариабельность	19
2.3. Факторы культивирования, их влияние на генотип	22
2.4. Криосохранение	24
<b>Раздел 3. Методы клеточной инженерии растений</b>	<b>25</b>
3.1. Особенность культуры <i>in vitro</i>	26
3.2. Основы селекции <i>in vitro</i> . Значение селективного фактора	27
3.3. Отбор исходного материала	29
3.4. Введение в культуру <i>in vitro</i>	32
3.5. Оздоровление посадочного материала	37
3.6. Идентификация и клонирование генов растений	39
3.7. Искусственный мутагенез	39
3.8. Гибридизация <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	42
3.9. Получение гаплоидов <i>in vitro</i>	46
3.10. Манипуляции с соматическими клетками. Пассирование	47
3.11. Культура изолированных протопластов	48
3.12. Генетические векторы	53
3.13. Методы трансформации растительных клеток	59
3.14. Значение маркёров в селекции	63
3.15. Микрочлональное размножение	67
3.16. Соматический эмбриогенез	71
3.17. Регенерация растений <i>in vitro</i>	72
<b>Раздел 4. Методы последующей селекции <i>in vivo</i></b>	<b>73</b>
4.1. Адаптация растений к нестерильным условиям	73
4.2. Селекция <i>in vivo</i> . Виды искусственного отбора	74
4.3. Организация государственного сортоиспытания	76
4.4. Растения со сложным генотипом. Химеры	77
<b>Раздел 5. Лабораторные работы по клеточной инженерии растений</b>	<b>79</b>
<b>Использованные термины</b>	<b>81</b>
<b>Библиографический список</b>	<b>82</b>

## **Введение**

Биотехнология как наука базируется на использовании биологических процессов в сельском хозяйстве и промышленном производстве. В свете современных представлений биотехнология растений – это соединение методов культуры клеток и тканей растений с методами молекулярной биологии и техники рекомбинантных ДНК. Созданная система – клетки и ткани высших растений, выращиваемые вне организма на искусственных питательных средах в строго контролируемых условиях, позволяет изучать рост, клеточную дифференцировку и развитие растительного организма, разрабатывать новые клеточные технологии для промышленности и сельского хозяйства. Вся сфера научной деятельности по реорганизации геномов обычно называется биотехнологией, хотя этот термин включает в себя более широкий круг понятий, чем культура изолированных тканей, генную и хромосомную инженерии. Роль биотехнологии и, в частности, культуры изолированных тканей, состоит в решении таких глобальных проблем, как обеспечение населения продовольствием, более эффективная медицина, оптимальная экология. Несомненно, что в настоящее время эти направления весьма перспективны.

### **Раздел 1. Цели и задачи клеточной инженерии растений**

Клеточная инженерия – это создание клеток нового типа на основе их гибридизации, реконструкции и культивирования. Основной задачей клеточной инженерии является конструирование новых форм растений с желаемыми признаками. Клеточная инженерия используется для решения теоретических проблем в биотехнологии и является одним из её основных методов для создания новых форм растений. Метод основан на реконструкции жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов с разным генотипом, либо существенном преобразовании исходного генотипа. Перспективен метод получения дальнеродственных гибридов на основе парасексуальной гибридизации путем слияния протопластов.

Реконструкция клетки является бурно развивающимся направлением клеточной инженерии. Речь идет о сборке совершенно новой клетки за счет объединения (слияния) изолированных клеточных фрагментов друг с другом или с целыми клетками. В результате такой реконструкции можно создать клетку, ранее в природе не существовавшую. Однако многие проблемы, стоящие на пути исследований в данном направлении, связаны с ограниченным числом подходящих методик фрагментации и выделения гомогенных популяций интактных клеточных фрагментов.

Существует ряд методик по введению чужеродных хлоропластов в изолированные протопласты. Одна из методик предусматривает последовательное центрифугирование протопластов и пластид в 0,03% растворе лизоцима, который обладает модифицирующим действием на мембрану. Частота проникновения чужеродных органелл в протопласты составляет 0,5%. Другой метод заключается в том, что изолированные одиночные клетки инкубируют с ферментом целлюлазой. После появления

первых протопластов клетки переносят в суспензию хлоропластов в 2% растворе целлюлазы и 0,2 М NaNO<sub>3</sub> при pH 5,4. С помощью этого метода проведено успешное включение в протопласты функционально активных хлоропластов с дальнейшей регенерацией целых растений. Осуществлена пересадка пластид чёрного паслёна, несущих гены, контролирующие устойчивость к атразину, культурному картофелю. Анализ хлоропластной ДНК устойчивых к атразину растений-регенерантов картофеля показал, что хлоропласты этих линий произошли от паслёна.

Перенос высокоэффективных хлоропластов может способствовать активации фотосинтеза и повышению продуктивности растений. Среди большого разнообразия генетически измененных форм растений, образовавшихся из слившихся протопластов, встречаются формы, содержащие пластиды одного родителя, а митохондрии другого, и наоборот.

Самыми распространенными ГМ-растениями в мире являются: соя, кукуруза, масличный рапс и хлопок. В некоторых странах для выращивания одобрены трансгенные томаты, рис, кабачки. Эксперименты проводятся на подсолнечнике, сахарной свекле, табаке, винограде, деревьях и т. д. В тех странах, где пока нет разрешения на выращивание трансгенов, проводятся полевые испытания.

Чаще всего культурные растения наделяют устойчивостью к физическим факторам: холодостойкость, засухоустойчивость, солестойкость (Таблица 1); к химическому стрессу от гербицидов, тяжёлых металлов, токсинам патогенных бактерий и грибов (Таблица 2). Создают растения устойчивые к насекомым и вирусам.

**Таблица 1. Солевыносливые клеточные линии и растения-регенеранты, полученные при селекции *in vitro* (по В.С. Шевелуха, 2008)**

Исходный материал для селекции (плоидность)	Концентрация NaCl,(М)	Результат клеточной селекции
Medicago sativa (2n)	0,17	каллус
Medicago sativa (2n=2x2n)	0,08-0,17	растения
Citrus sinensis (2n)	0,08-0,17	каллус
Nicotiana tabacum(2n)	0,17	Суспензия, растения
Datura innoxia (2n)	0,17-0,34	Каллус, растения
Pennisetum americanum (2n)	0,19	Эмбриогенная суспензия
Ipomea batatas (2n)	0,17	Суспензия
Crepis capillaris (2n)	0,12	Суспензия
Oriza sativa (2n)	0,17	Эмбриогенный каллус, растения

Устойчивость к гербицидам позволяет «избранному» растению быть невосприимчивым к смертельным для других дозам химикатов. В результате

поле очищается от всех лишних растений, то есть сорняков, а культуры, устойчивые или толерантные (терпимые) к гербицидам, выживают.

**Таблица 2. Результаты клеточной селекции на устойчивость к токсинам патогенных грибов (по В.А. Сидорову, 1990)**

Патоген	Хозяин	Устойчивый материал
<i>Leptosphaeria maculans</i>	<i>Brassica napus</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Alternaria solani</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Клеточные линии
<i>Drechslera sativum</i>	<i>Triticum aestivum</i>	Клеточные линии
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolica</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Клеточные линии, регенеранты
<i>Helminthosporium sacchari</i>	<i>Saccharum officinarum</i>	Клеточные линии, регенеранты, потомство
<i>Fusarium coeruleum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	Клеточные линии, регенеранты
<i>Helminthosporium maydis</i>	<i>Zea mais</i>	Клеточные линии

Как правило, компания, продающая семена подобных растений, предлагает в наборе и соответствующие гербициды. Устойчивая к насекомым флора становится поистине бесстрашной: например, непобедимый колорадский жук, съедая листик картофеля, погибает. Почти все такие растения содержат встроенный ген природного токсина бактерии *Bacillus thuringiensis*. Устойчивость к вирусу растение приобретает благодаря встроенному гену, взятому из этого же самого вируса.

Новым направлением клеточной инженерии растений является создание необычных биологических систем путем введения микроорганизмов в популяцию культивируемых клеток. Создание таких ассоциаций представляет интерес для решения следующих задач: 1) экспериментальной проверки теории эндосимбиотического происхождения эукариотической клетки в процессе эволюции; 2) моделирования природных симбиотических отношений растений и микроорганизмов; 3) повышения продуктивности культивируемых растительных клеток; 4) получения растений с новыми свойствами; 5) изучения различных аспектов взаимодействия растения-хозяина и патогена.

Получение искусственных ассоциаций межклеточного и внутриклеточного типа на основе культивируемых клеток или изолированных протопластов с микроорганизмами является одним из новых способов модификации растительной клетки. Довольно перспективным является получение ассоциаций

культур клеток растений с микроорганизмами, способными к фиксации молекулярного азота атмосферы. Способность к формированию азотфиксирующих симбиотических систем приобрели определенные группы высших растений и микроорганизмов. В связи с этим вопрос о повышении способности к вступлению в такие симбиотические ассоциации для большинства растений имеет важное экономическое значение и может быть решен методами клеточной инженерии.

Реконструированные клетки, происходящие из ядра и цитоплазмы от разных организмов, являются удобными экспериментальными моделями для решения таких важных биологических проблем, как дифференцировка, старение клеток, цитоплазматическая наследственность. Гибриды растений с генетически реконструированной цитоплазмой представляют собой весьма ценный материал для оценки влияния двух цитоплазматических генофондов на практически значимые признаки культурных растений.

Преимущества генной инженерии. По заверениям ученых демографов, в ближайшие двадцать лет население земного шара удвоится. Пользуясь современными агрокультурами и агротехнологиями, прокормить такое количество людей будет просто невозможно. Следовательно, уже сейчас пора подумать о том, как с наименьшими потерями поднять урожайность сельхозугодий. Поскольку для обычной селекции срок в два десятилетия крайне мал, то остается механическая модификация генетического кода растений. Можно, например, добавить ген устойчивости к насекомым-вредителям или сделать растение более плодовитым. Это основной довод трансгенетиков.

С помощью генной инженерии можно увеличить в генетически измененной продукции содержание полезных веществ и витаминов по сравнению с «чистыми» сортами. Например, можно «вставить» витамин «А» в рис, с тем чтобы выращивать его в регионах, где люди испытывают нехватку ретинола.

Можно существенно расширить ареалы посева ранее неустойчивых культур, приспособив их к экстремальным условиям, таким, как засуха и холод.

Путем генетической модификации растений можно существенно уменьшить интенсивность обработки полей пестицидами и гербицидами. Ярким примером здесь является внедрение в геном кукурузы гена *Bacillus thuringiensis*, снабжающего растение собственной защитой, так называемым Вt-токсином.

Генетически изменённым продуктам могут быть приданы лечебные свойства. Ученым уже удалось создать банан с содержанием анальгина и салат, вырабатывающий вакцину против гепатита «В».

Еда из генетически измененных растений может быть дешевле и вкуснее.

Модифицированные виды помогут решить и некоторые экологические проблемы. Конструируются растения, эффективно поглощающие цинк, кобальт, кадмий, никель и прочие металлы из загрязненных промышленными отходами почв. Разумеется, использовать их продукцию для потребления или кормления животных недопустимо.

Генная инженерия позволит улучшить качество жизни, очень вероятно – существенно продлить её; так как есть надежда найти гены, ответственные за старение организма и реконструировать их. Возможность воздействовать на гены позволяет устранять причины наследственных болезней, изменять свойства организмов в нужном направлении, пересаживать гены из одного организма в другой и привносить в него новые признаки. Например, уже создаются новые организмы, сочетающие в себе свойства животных и растений. Однако довольно сложно определить долговременные последствия генных манипуляций.

В принципе, ничего нового в идее получения модифицированных продуктов нет. Сама природа в процессе эволюции создавала новые организмы и снабжала созданные ранее новыми свойствами. Правда, на это уходили тысячелетия. Человек решил ускорить этот процесс и создал науку о выведении новых сортов растений и пород животных – селекцию. Ученые скрещивали организмы с необходимыми свойствами, из полученного потомства отбирали удавшиеся образцы и вновь скрещивали их между собой, добиваясь полной генетической чистоты. Требовались десятилетия на достижение конечной цели. Ученые нашли более быстрый способ получения организмов с определенным набором генов за счёт жесткого радиационного воздействия, вызывая случайные мутации в клетках. Хотя нежелательных мутаций при этом было больше, чем при обычном скрещивании, сроки получения нового сорта сократились до 10-15 лет. По сравнению с радиационными методами технология пересадки фрагмента ДНК, применяемая генной инженерией, кажется верхом деликатности. По крайней мере, она практически исключает риск получения не желательных результатов.

Соображения против генной инженерии. Яблоком раздора явилось оригинальное генетическое творение – «помидор с жабрами», которому для морозостойкости вживили ген североамериканской камбалы. Экологи обеспокоены, чем станут питаться колорадские жуки, если в мире не останется не модифицированного картофеля.

В настоящее время генная инженерия технически несовершенна, так как она не в состоянии управлять процессом встраивания нового гена. Поэтому невозможно предвидеть место встраивания и эффекты добавленного гена. Даже в том случае, если местоположение гена окажется возможным установить, имеющиеся данные о поведении ДНК недостаточны, чтобы предсказать результаты.

В середине 1998 года английский ученый Арпад Пустаи на основании проведенных опытов впервые заявил о том, что употребление подопытными крысами генетически модифицированного картофеля привело к серьезным повреждениям их внутренних органов и иммунной системы. У животных возник целый набор серьезных изменений желудочно-кишечного тракта, печени, селезенки, а также уменьшился объём мозга.

Это заявление вызвало противоречивую реакцию научной общественности. С одной стороны, институт, в котором работал Пустаи, заявил, что результаты его исследований являются необъективными. Однако

независимая комиссия, созданная из 20 ученых из разных стран, признала, что выводы Пустаи правильны, а безвредность генетически модифицированных продуктов действительно подлежит существенной переоценке.

Дополнительным подтверждением того, что воздействие генетически измененных продуктов на организм человека и окружающую среду является мало изучено, стало заявление Джона Лузи. В мае 1999 года он сообщил о том, что пыльца генетически модифицированной пшеницы, изначально содержащая небольшую долю пестицидов, способна убивать личинок бабочки-данаиды. В то же время некоторые ученые опять высказали мнение о том, что лабораторные исследования не могут смоделировать условия живой природы, поэтому на них нельзя полностью полагаться. В ноябре 1999 года для обсуждения результатов исследований Пустаи и Лузи была организована специальная научная конференция, однако её участникам не удалось выработать общего подхода к этому вопросу. При этом само существование подобных противоречий свидетельствует, что выведение генетически модифицированных видов растений и животных представляет определенную опасность, обусловленную непредсказуемостью их развития и поведения в естественной среде.

Риски, связанные с применением геной инженерии к продуктам питания, можно разделить на три категории: экологические, медицинские и социально-экономические.

#### ***Экологический риск:***

В ряде случаев трансгенные продукты не опаснее и даже лучше обычных. Ученые пришли к выводу, что трансгенная соя более экологична и безопасна, чем обычная. Для борьбы с сорняками и вредителями, поражающими эту культуру, традиционно применяли пестициды, гербициды и инсектициды, а трансгенная соя сама справляется со всеми патогенами.

В Соединенных Штатах Америки разрешается использовать генномодифицированные продукты без каких-либо ограничений (и даже без указания на это). В странах Евросоюза продажу модифицированных продуктов разрешили с условием снабжать их специальной этикеткой. В нашей стране каждый продукт с измененным геном должен получить государственное регистрационное удостоверение, подтверждающее его безопасность.

Появление супервредителей. В сущности, такие уже появились. На Вт-кукурузе и хлопке живет коробочный (хлопковый) червь, которому токсины *Bacillus thuringensis* (Bt) не приносят вреда. Вредители способны достаточно быстро приспосабливаться. Как известно, в экстремальных условиях скорость мутаций растет, и неизвестно, сколько понадобится насекомым времени для того, чтобы приспособиться к новым препаратам.

Нарушение природного баланса. Уже доказано, что многие ГМ-растения, такие, как ГМ-табак или технический рис, применяемый для производства пластика и лекарственных веществ, смертельно опасны для живущих на поле или рядом с ним грызунов. Пока эти растения произрастают лишь на опытных полях, а что произойдет после полного вымирания грызунов в районах их массовых засевов не берется предсказать никто. Регуляторные механизмы

поддержания гомеостаза биосистем не были созданы для подобных воздействий. Результат может быть плачевным, как при акклиматизации новых видов. В 60-х годы прошлого века в озеро Виктория запустили нильского окуня. Попав в благоприятную среду и обладая несомненным преимуществом в силе, выносливости и плодовитости, он быстро сократил в несколько десятков раз численность конкурирующих видов, а более двухсот видов уничтожил полностью. А спустя десятилетие после этого переселения в прибрежной зоне исчезли леса, берега были размывы, а эрозия почвы достигла невиданных доселе размеров.

Выход трансгенов из-под контроля. На каждую упаковку с семенами генетически модифицированного Вt-хлопка фирмы «Monsanto» нанесена надпись: «Во Флориде не сажать к югу от Тампы (60-е шоссе); не для коммерческого использования или продажи на Гавайях». Что заставило руководство этого биотехнологического гиганта так ограничить площади посевов своих культур? Оказывается, на Гавайях весьма распространён дикий родственник хлопка *Gossypium tomentosum*, а в Южной Флориде – *Gossypium hirsutum*. Оба считаются в хлопководстве сорняками. Если генетически модифицированный хлопок опылит своего родственника-сорняка, то в результате получится устойчивый к действию пестицидов и гербицидов, не боящийся ни жары, ни холода, не повреждаемый жуками и паразитами, весьма плодовитый суперсорняк. Примерно тоже может случиться со многими другими видами культурных растений, таких, как масличный рапс, картофель, томаты или бобы. У всех есть широко распространённые дикие сородичи, являющиеся главными (в силу сходства условий жизни) сорняками.

Даже культурный рапс зачастую является сорняком для других культур, но в силу его изнеженности не представляет угрозы. Генетически модифицированный рапс изнеженным назвать нельзя, поэтому пшеничные поля быстро могут превратиться в технические рапсовые. Были зафиксированы случаи, когда ГМ-рапс наделял устойчивостью к гербицидам дикую горчицу.

**Медицинский риск.** Медиков настораживает: как скажутся модифицированные продукты на организме человека? Не воспримет ли он клетки того же картофеля с внедренным в них фрагментом ДНК капусты как аллергены? И вообще насколько хорошо усвоится такая пища, даст ли она в полном объеме необходимые организму вещества?

Повышенная аллергеноопасность. В марте 1996 года в Университете штата Небраска, обнаружили, что при попытке повысить содержание белка в ГМ-сое в неё вместе с геном бразильского ореха был перенесен аллерген. Причем тестирование животных не выявило опасности. По поводу аллергической опасности ГМ-продуктов доктор Мэй Ван Хо, писал: «Нет никаких известных способов предсказать аллергию на ГМ-пищу. Аллергическая реакция обычно возникает спустя некоторое время после появления и развития чувствительности к аллергену».

Возможная токсичность и опасность для здоровья. Британский ученый Арпад Пуштай, назвавший ГМ-продукты «пищей для зомби», считает, что они наносят колоссальный вред здоровью. В 1989 году одна из крупнейших

японских химических компаний «Showa Denko» поставила на американский рынок новый ГМ-вариант известной пищевой добавки L-tryptophan. В результате 37 человек погибли, а более 5000 стали инвалидами с потенциально смертельным диагнозом – синдромом эозинофильной миалгии (EMS) (неизлечимое и чрезвычайно болезненное заболевание крови). Кроме того, хорошо известно, что токсическое действие белка порой проявляются спустя тридцать и более лет (например, «коровье бешенство», вызванное белком-прионом). Белки, из которых состоят ГМ-продукты, принципиально новые, так как являются гибридами белков растительного и бактериального происхождения. Директор Института сельскохозяйственной биологии В. Патыка, учёные ВИСХМ (Санкт-Петербург) и чешские микробиологи после двадцатилетних исследований пришли к выводу, что «при определенных условиях белок-токсин, если его ввести в ГМ-картофель, может выступить весьма сильным канцерогенным фактором».

Устойчивость к действию антибиотиков. Для того чтобы понять, вошёл ли нужный ген в цепочку ДНК, специалисты-генетики снабжают его специальным маркером, которым чаще всего выступает ген устойчивости к антибиотикам. Проблема состоит в том, что, единожды внедрив этот ген в ДНК, вывести его уже нельзя. В результате возникает двойная опасность. Во-первых, употребление в пищу устойчивых к антибиотикам продуктов неизбежно нейтрализует действие антибиотиков, принимаемых в качестве лекарства. А во-вторых, появление большого количества антибиотикоустойчивых растений может повлечь за собой появление антибиотикоустойчивых бактерий. Нечто подобное уже наблюдалось несколько лет назад в Дании, когда тысячи людей оказались жертвами эпидемии сальмонеллеза, вызванной новым, устойчивым к антибиотикам, штаммом сальмонеллы.

Потенциальная вероятность возникновения новых вирусов. Экспериментально показано, что встроенные в геном гены вирусов могут соединяться с генами инфекционных вирусов. Такие новые вирусы могут быть более агрессивными, чем исходные. Они могут стать также менее видоспецифичными. Например, вирусы растений могут стать вредными для полезных насекомых, животных, а даже людей. Совершенно недопустимо подвергать трансформации растения, кантаминированные вирусами и микоплазмами.

### ***Социально-экономический риск:***

Большинство социальных и экономических угроз, которые несёт развитие генной инженерии, подпадают под широкое определение продовольственной безопасности, то есть способности людей обеспечить свои потребности в здоровых, разнообразных и доступных по цене продуктах питания. При этом сторонники генной инженерии заявляют, что создаваемые с её помощью продукты могут решить проблему мирового голода. Однако их оппоненты подчёркивают высокую потенциальную опасность сосредоточения генетических технологий в руках частных компаний через патентование определённых жизненных форм, которые могут вытеснить традиционные сельскохозяйственные культуры.

Тем не менее, всеобъемлющее изучение экономического эффекта от использования генных технологий (в частности, уровня урожайности и количества используемых химических удобрений) были проведены лишь в прошлом году. Результаты довольно противоречивы. Так, в некоторых случаях урожайность генетически модифицированных культур была заметно ниже, чем у традиционных сортов. Как и у обычных растений, эффективность новых культур зависит от многих факторов, в том числе распространения сорняков и насекомых-паразитов, погодных условий и типа почвы. Можно было бы подчеркнуть преимущество ГМ-растений в их сбалансированном биохимическом составе, но лишь незначительная часть продуктов питания из генетически модифицированных культур имеют лучшие питательные свойства.

Одно из самых опасных свойств модифицированных семян – это их "конечная технология". Ученые добились того, что растения, идущие на продажу, стали бесплодными, не способными производить семена. Это означает, что фермеры не могут собрать семена на следующий год, и должны покупать их снова. (А ведь в настоящее время 80% урожаев в развивающихся странах получают из выращенных фермерами семян) Понятно, что основная цель "конечной технологии" – повысить доходы компании, производящей семена.

Некоторые особенности новых технологий 21 века могут привести к большим опасностям. Прежде всего, это способность к саморепликации. Разрушающий и лавинно самовоспроизводящийся объект, специально созданный или случайно оказавшийся вне контроля, может стать средством массового поражения всех или избранных. Конечно, выше описаны вероятные, но не гарантированные варианты развития генной инженерии. Успех в этой отрасли науки сможет радикально поднять производительность труда и способствовать решению многих существующих проблем, прежде всего, подъему уровня жизни каждого человека, но, в то же время, и создать новые разрушительные средства.

#### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. В чем состоят фундаментальные и практические задачи клеточной инженерии растений?*
- 2. Какие направления генетической инженерии значимы для современного растениеводства?*
- 3. Какие существуют пока нерешённые проблемы генетической инженерии?*
- 4. В чём проявляется экологический риск использования методов генетической инженерии?*
- 5. В чём состоит негативное социально-экологическое воздействие этой технологии?*

#### **Раздел 2. Особенности клеток растений in vitro**

Выпадая из систем организменной регуляции культивируемые в идеальных условиях клетки растений изменяются как морфологически, так и физиологически. Большинство веществ вторичного метаболизма в

неорганизованно растущей ткани не синтезируются. В достаточной степени редуцирована проводящая система, практически не функционирует система донорно-акцепторных взаимодействий, типичная для интактного растения. В культуре *in vitro* нет доноров – лишь акцепторы поставляемых в изобилии питательной средой веществ.

### **2.1. Онтогенез клеток *in vitro***

Онтогенез – происхождение, формирование клетки от момента образования до естественной гибели, может происходить либо от деления до её смерти, либо от деления до деления. Вторым вариантом онтогенеза характерен для клеток меристем, а также для каллусных клеток *in vivo* и *in vitro*. Такие клетки называют пролиферирующими или постоянно делящимися. В этом случае клетка последовательно проходит клеточный (митотический) цикл, т. е. период от митоза до митоза. Онтогенез большинства растительных клеток проходит по первому варианту – от митоза до естественной смерти. В этом случае он складывается из нескольких этапов: деление клетки, рост растяжением, дифференцировка, активное функционирование, старение и смерть. Хотя введение в культуру *in vitro* может перевести первый тип онтогенеза во второй, есть примеры и интактной дедифференцировки (например, при пролиферации верхушки соплодия ананаса или прорастания язычковых цветков сложноцветных в новые соцветия). В процессе дифференцировки формируются различия между клетками, т.е. происходит их специализация. Особенностью растительных клеток является возможность её дедифференцирования, т. е. перехода специализированных клеток обратно к пролиферации. Это происходит *in vivo* при образовании каллуса (травматической ткани двудольных), а также *in vitro* при получении культур клеток. Культивируемые *in vitro* клетки можно получить из любой ткани любого органа растения, так как к дедифференциации способна практически любая соматическая клетка растения. Ограничения, тем не менее, есть и связаны со старением (от реликтовых деревьев получить регенерацию практически невозможно). Дедифференцированные пролиферирующие клетки *in vitro* при определенных условиях могут вновь дифференцироваться и привести к формированию тканей, органов и целых растений. Таким образом, растительная клетка реально тотипотентна, т. е. не только содержит полную информацию о целом организме, но может задействовать эту информацию при регенерации. Получаемые таким образом растения соответственно называются регенерантами. Получение растений-регенерантов из отдельной дедифференцированной клетки и даже из отдельного протопласта в настоящее время является основой многих биотехнологий и генно-инженерных работ. У животных подобные свойства сохраняют лишь немногие стволовые клетки.

Каллусная культура – это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток, которые в дальнейшем специализируются как каллусные, т.е. становятся особым образом дифференцированными. Каллус («мозоль») может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) *in vitro*, так и на растениях при

поранении (чаще на нижнем конце побега при черенковании и размножении отводками).

Оторванная от коллектива себе подобных, клетка в пробирке сохраняет «память» – генетическую информацию. Но специализацию она утрачивает и образует при делении нечто аморфное, напоминающее по форме желе. Помимо утраты узкой специализации клетка порой начинает активно делиться подобно раковым клеткам. Изменяется и метаболизм, особенно вторичный. Например, активные гены вдруг «застопориваются», но начинают интенсивно работать ранее неактивные. Клетка *in vitro* может резко изменить соотношение ферментных и структурных белков. В ней увеличивается число молекул РНК, синтезирующих во множестве новые белки. Регенерации полноценных растений из каллуса добиваются за счёт индукции дифференциации побегов и корней посредством изменения соотношения гормонов цитокинин/ауксин или при образовании эмбриоидов. Этот соматический (асексуальный) эмбриогенез впервые был прослежен в 1959 г. у моркови; со временем его стали применять при производстве жизнеспособных растений у разных видов.

Каллусная ткань *in vitro* в основном бывает белого или желтоватого, реже светло-зеленого цвета. Очень редко она может иметь интенсивно зеленую окраску и в основном при световой культуре. Темно-коричневая окраска возникает чаще при старении каллусных клеток и связана с накоплением в них фенолов, которые затем окисляются в хиноны. Для избавления от них в питательные среды вносят антиоксиданты или сорбенты.

Каллусная ткань аморфна и не имеет конкретной анатомической структуры, но в зависимости от происхождения и условий выращивания она может быть разной консистенции:

- рыхлой – состоящей из сильно оводнённых клеток, легко распадающейся на отдельные мелкие агрегаты;
- средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами;
- плотной, в которой дифференцированы элементы камбия, а иногда и некоторые структуры проводящей системы.

Основные этапы формирования каллусной ткани. Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения её в каллусную является присутствие двух групп фитогормонов: ауксинов, вызывающих процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий её к делению и цитокининов, вызывающих пролиферацию дедифференцированных клеток. Если в питательную среду, не содержащую этих гормонов, поместить растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдёт и каллус не будет образован. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению.

Каждая клетка проходит 3 фазы роста: деление; растяжение; дифференцировку. Характерной чертой заключительной фазы роста является утолщение вторичной клеточной оболочки и потеря клеткой способности к

делению. Для того чтобы дифференцированные клетки вновь приобрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т.е. клетки как бы возвратились в меристематическое состояние. Размножение дедифференцированных клеток приводит к анархическому (неорганизованному) росту, в результате чего и образуется каллус. Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она потеряла в процессе дифференцировки. Существует предположение, что такую индукцию вызывают не ауксины и цитокинины, а полисахариды. Не стоит забывать, что первые успешные опыты введения в культуру растений были как раз на средах, содержащих растительные экстракты, богатые полисахаридами.

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям обусловлен изменением активности клеточных генов: активирование одних генов и репрессирование других приводит к изменению белкового состава клеток, т.е. в каллусных клетках проявляются специфические белки и одновременно исчезают или уменьшаются в количестве белки, характерные для фотосинтезирующих клеток. Последнее соответственно связано с условиями культивирования: на свету или в темноте. Но и световая культура недополучает как качественно (стекло пробирок не пропускает ультрафиолет), так и количественно – стекло отражает значительную часть энергии ламп. В итоге «страдает» физиология, первичный и вторичный метаболизм – большинство алкалоидов в культуре клеток не образуются вовсе.

При переходе дедифференцированной клетки к неорганизованному росту и размножению в клетках происходят не только биохимические, но и цитологические изменения.

Необходимо отметить, что каллусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки: деление, растяжение и дедифференцировку, после чего наступает старение и отмирание клетки. Особенно чётко это проявляется при периодической культуре, когда в конце пассажа наступает фаза деградации и гибели клеток популяции.

К общим признакам каллусных и интактных клеток относят: устойчивость к действию высоких температур, осмотически активных веществ, засолению, что широко используют для селекции устойчивых форм на клеточном уровне.

Вместе с тем, каллусные клетки обладают свойствами, отличающими их от нормальных клеток. В них появляются специфические белки, уменьшается количество белков, характерных для фотосинтезирующих клеток или они совсем исчезают. Каллусные ткани отличаются большой генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью. Не стоит забывать важность систем регуляции гомеостаза, ведь кроме клеточного и тканевого уровня, других нет. Поэтому такие клетки менее выносливы и требуют идеальных условий культивирования. Положительная сторона – при выходе из-под контроля организма рост каллусных клеток может происходить потенциально неограниченное время.

Клеточный цикл у каллусных клеток более длительный, чем у растений, произрастающих в открытом грунте. Особенностью каллусных клеток является гетерогенность по возрасту, т.к. в каллусной ткани одновременно присутствуют молодые и старые клетки.

Значительные отличия наблюдаются в энергетическом обмене каллусных клеток: они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными клетками, что вероятно связано с исходной селекцией клеток при выращивании их в закрытых культуральных ёмкостях – колбах, пробирках и чашках Петри.

Обнаружена ещё одна особенность клеток – маленькие экспланты и колонии не могут делиться и размножаться в большом объёме среды. Это связано с эффектом первичного кондиционирования среды клетками в период лаг-фазы. Преодолеть это можно либо за счёт уменьшения объёма питательной среды (с одновременной защитой от её быстрого высыхания), либо при использовании культуры «няньки» – рядом расположенной другой колонии.

Генетические особенности каллусных клеток. Длительное время считали, что каллусные клетки генетически строго однородны, но в 60-х гг. было установлено, что клетки каллусной ткани обладают выраженной генетической гетерогенностью, которая, прежде всего, выражается в различной ploидности (каллусные клетки отличаются по числу хромосом). Генетически стабильными *in vitro* являются меристематические ткани.

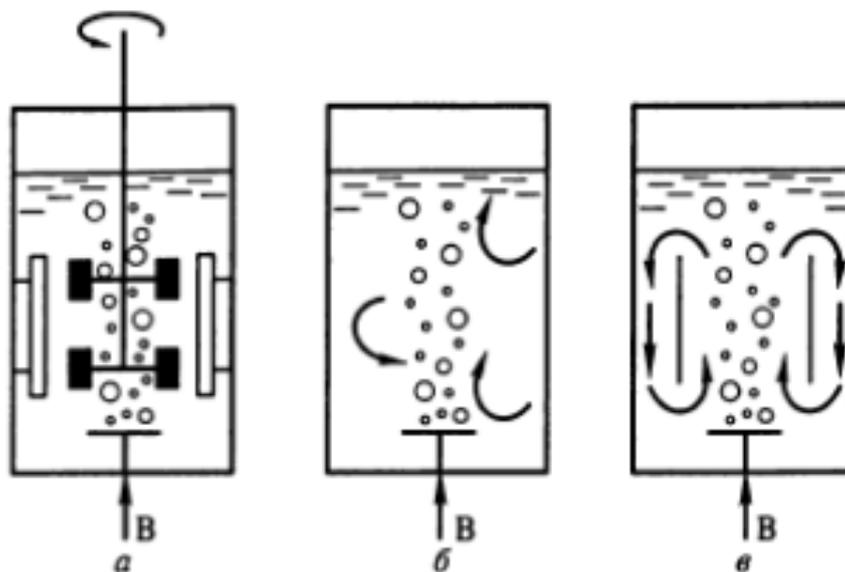
Наряду с полиплоидией в культуре каллусных тканей можно нередко наблюдать анеуплоидию (возрастание или уменьшение хромосомного набора на несколько хромосом). Широко распространены такие мутации как делеции и дупликации.

Чем длительнее культивировать каллусные клетки, тем больше они различаются по ploидности. Изменение ploидности происходит под влиянием условий культивирования; в зависимости от веществ, входящих в состав питательной среды.

Другим вариантом культивирования растительных клеток является суспензионная культура, которую выращивают в жидкой питательной среде, по аналогии с процессом глубинного культивирования в промышленной микробиологии. В этом случае можно использовать не только периодическое выращивание, но и непрерывное культивирование при проточной системе подачи свежей среды.

Суспензия представляет собой одиночные клетки и агрегаты, которые растут в жидкой питательной среде в стерильных условиях. Существуют разные способы культивирования суспензии: в колбах на качалках или ферментерах. Необходимое условие роста суспензии состоит в перемешивании или встряхивании среды, что обеспечивает аэрацию культуры. Обычно суспензию получают из рыхлой каллусной ткани, помещая её в жидкую питательную среду того же состава, что и для каллуса, но без добавления агара. Растительные суспензии характеризуют по следующим показателям: количество жизнеспособных клеток, сегрегированность суспензии и плотность клеток в суспензионной культуре. Суспензионные культуры намного удобнее для биохимических и молекулярно-биологических экспериментов – изучения

индукции ферментов, процессов экспрессии генов, изолирования, клонирования, селекции получаемых мутантов.



**Рис.1. Принципиальные схемы биореакторов для культивирования суспензий растительных клеток (по Р.Г. Бутенко, 1999):**

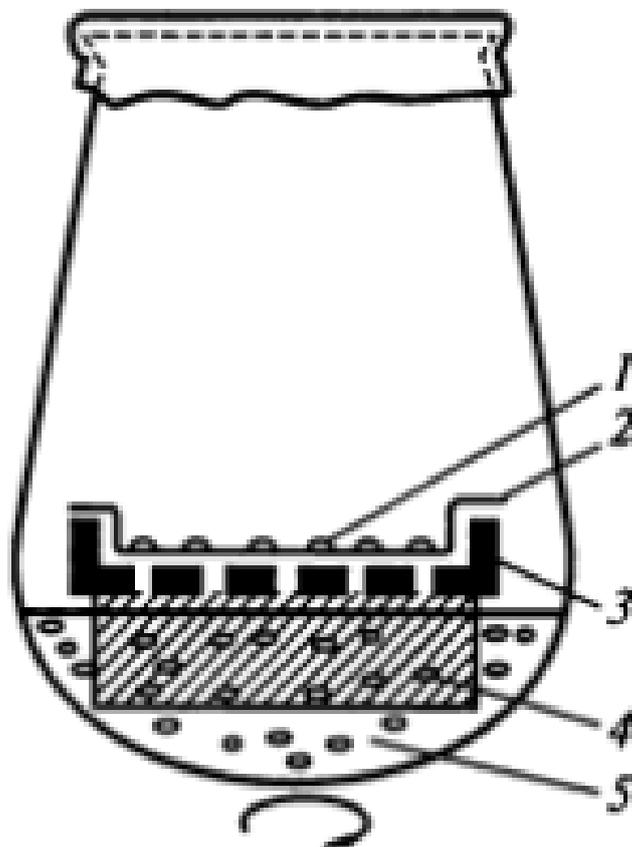
*а) с механической мешалкой; б) барботажный; в) аэролифтный; В – подача воздуха*

Клеточные суспензии образуются как из каллусных тканей, так и непосредственно из экспланта. Для получения суспензионных культур предпочтительнее брать каллусы рыхлого типа. Если для этой цели необходимо использовать плотный каллус, то его можно разрыхлить, исключив из питательной среды соли кальция. Суспензионные культуры клеток можно получать и непосредственно из экспланта по методу Ф. Стюарда. Для этого эксплант помещают в жидкую среду при постоянном автоматическом перемешивании. Дедифференцированные клетки отрываются от экспланта, образуя в питательной среде суспензию, состоящую из клеточных агрегатов различного состава. Правда опасность инфицирования в этом случае во много раз выше, чем при каллусном способе введения. Качество суспензии определяется степенью агрегированности. Агрегаты должны содержать не более 10-12 клеток, хотя, например, у арабидопсиса суспензия представляет собой фрагменты свыше сантиметра в диаметре. Состояние клеточных суспензий характеризуется плотностью клеточной популяции. За 14-16 дней (средняя длительность культивирования) плотность обычно повышается от  $5 \times 10^4$  до  $5 \times 10^6$  кл/мл.

Постоянное встряхивание или перемешивание – необходимое условие культивирования клеточных суспензий (Рис. 1). Суспензионные клетки делятся в присутствии тех же двух групп гормонов (ауксинов и цитокининов), которые индуцируют деление клеток в каллусных тканях.

Клеточные суспензии играют значительную роль в биотехнологии, как более технологичные. Их культивируют в больших количествах для получения

вторичных метаболитов, выявления новых веществ, биотрансформации, для выращивания клеточной биомассы. Однако увеличение клеточной биомассы в результате деления клеток и синтез вторичных метаболитов могут быть разобщены во времени. В таких случаях используют двухфазное выращивание или глушат беззаботный рост клеток элиситорами.



**Рис.2. Использование в качестве «няньки» культуры суспензионных клеток при выращивании изолированных протопластов и одиночных клеток (Бу Дык Куанг, З.Б. Шамина, 1985):**

1) Колонии клеток; 2) Подложка из фильтровальной бумаги; 3) Алюминиевая сетка; 4) Пенополиуретан; 5) Суспензия клеток

Большой интерес представляет культура одиночных клеток. Её применяют в клеточной селекции для отбора гибридных клеток и их клонирования, а также для генетических и физиологических исследований. Однако культивирование одной или нескольких клеток проблематично, так как одиночная клетка не способна делиться в тех условиях, которые разработаны для нормального роста и размножения популяции клеток. Поэтому при культивировании одиночных клеток используют методы, основанные на оптимизации воздействия «кондиционирующего фактора» – совокупности метаболитов, выделяемых в среду делящимися клетками. Когда на питательную среду высаживается одна клетка или небольшой агрегат, они не делятся до тех пор, пока концентрация кондиционирующего фактора не станет оптимальной для индукции деления. Для этого используют следующие методы:

Метод ткани-«няньки» (Рис.2.) – кондиционирующий фактор выделяется находящимися рядом с одиночной клеткой кусочками ткани-«няньки». Клетку изолируют при помощи микроманипулятора из рыхлого каллуса непосредственно на кусочек фильтра размером 8x8 мм, помещенный на верхушку каллусной ткани, из которой была взята клетка. Каллус должен находиться в фазе активного роста. Можно также в качестве «няньки» использовать каллусную ткань другого растения родственного вида. В этом случае клетки начинают расти и делиться. По мере старения каллуса–няньки фильтр с клетками переносится на молодой каллус (соответственно на свежей питательной среде). Когда ткань из клетки достигает размеров 0,5-1 мм, то потребность в «няньке» отпадает и её можно высаживать непосредственно на питательную среду.

Проводились также эксперименты по высаживанию клетки непосредственно на агаризованную среду, но обязательно рядом с фильтром, который в течение нескольких дней контактировал с молодой, интенсивно растущей каллусной тканью. Поскольку эти работы показали, что постоянный контакт клетки через фильтр с каллусной массой не является обязательным для деления клетки, то было предложено использовать старую культуральную среду для стимуляции одиночной клетки к делению.

### ***Вопросы для самоконтроля:***

1. *В чём состоит отличие культивируемых клеток от клеток интактного растения по морфологии, генотипу и физиологии?*
2. *Что такой «кондиционирующий фактор» и как он воздействует на рост клеток?*
3. *Чем отличается суспензионная и каллусная культуры?*
4. *Какие методы аэрации суспензионной культуры Вам известны?*
5. *В чём отличие онтогенеза клеток *in vitro**

**2.2. Соматональная вариабельность.** Начиная с первых работ по культивированию растительных клеток, тканей и органов особый интерес у исследователей вызывал вопрос о том, какие клеточные изменения могут происходить в изолированных клетках, растущих на искусственных питательных средах, каковы причины их вызывающие. С разработкой техники получения растений-регенерантов из каллусной ткани появилась возможность получать новые формы растений, отличающиеся как по фенотипическим, так и по генетическим признакам от исходных растений. Такое разнообразие среди клеточных линий и растений-регенерантов получило название соматоклоны, хотя еще в 70–80-е годы нашего столетия было принято называть растения, регенерировавшие из каллусной ткани, «калликлонами», а из протопластов – «протоклонами». Соматоклоны — регенеранты растений, полученные из соматических клеток и обладающие определёнными отличиями от исходных форм.

Генетическая природа и механизм возникновения соматклональной изменчивости пока мало изучены. Однако чётко можно выделить зависимость возникновения соматклональных вариантов, прежде всего, от генетической гетерогенности соматических клеток исходного экспланта, генетической и эпигенетической изменчивости, индуцируемой условиями культивирования *in vitro*, а также от генотипа исходного экспланта.

Дифференцированные клетки в нормальном растении могут иметь разную степень ploидности, но для отдельных видов характерно наличие только диплоидных клеток. Однако в процессе онтогенеза могут возникать клетки с разной ploидностью. Например, экспериментально доказано, что в меристемных тканях, наряду с постоянным для вида числом хромосом, почти у 80% покрытосеменных растений в процессе дифференцировки в соматических клетках происходит эндоредупликация хромосом и формирование тканей различного уровня ploидности. Для вегетативно размножаемых и апомиктических растений характерно образование анеуплоидных клеток. Усиление хромосомных перестроек, приводящих к появлению химерности и миксоploидии у растений, наблюдается при изменении условий произрастания, особенно при их резком ухудшении: засоление почв, повышенные или пониженные температуры, применение гербицидов или пестицидов, минеральных удобрений в повышенных дозах и др. Эти и другие часто встречающиеся в практике факторы могут приводить к физиологическим нарушениям, связанным, в первую очередь, с появлением аномальных митозов и формированием клеток с числом хромосом, отличающимся от такового в материнской ткани. Таким образом, физиологическое воздействие среды может напрямую воздействовать на генотип.

Цитологические исследования показали, что вариабельность, индуцируемая условиями культивирования *in vitro*, связана с генетическими изменениями. Прежде всего, одним из основных источников появления фенотипических вариантов являются различные кариологические изменения и перестройки. Однако выявить, какие из них будут иметь фенотипический эффект и наследоваться как стабильная мутация генов довольно сложно. Как грубые, так и тонкие хромосомные изменения – мелкие деления, дубликации, транслокации, инверсии – могут вызвать существенные фенотипические изменения в растениях-регенерантах и в последующем потомстве. Хромосомные изменения часто наблюдаются при мейозе. Анализ мейоза в клетках регенерантов показал такие перестройки хромосом, как транслокации, инверсии, субхроматидный обмен, частичную утрату хромосом. Это является доказательством того, что большая часть фенотипических изменений обусловлена генетическими механизмами.

Соматклональную изменчивость можно проследить на молекулярном уровне, оценивая тонкие перестройки ядерной ДНК.

Кроме соматклональной вариабельности, связанной с наследуемыми перестройками генома, отмечены фенотипические изменения («эпигенетические»), которые могут стабильно передаваться дочерним клеткам, но не проявляться в растениях-регенерантах или их половом потомстве.

Высокая степень разнообразия соматклонов зависит от исходного генотипа, природы и стадии развития экспланта. С другой стороны это вовсе неплохо, так как позволяет успешно проводить поиск искомым вариантов при селекции.

Тип исходного экспланта также влияет на появление соматклональных вариантов, отличающихся количественными и качественными признаками. Для картофеля, например, аномальные растения получены в 12% случаев при использовании в качестве первичного экспланта мезофильных тканей листа, а в случае использования лепестков или оси соцветий частота формирования растений с фенотипическими отклонениями от нормы составила 50%.

Условия культивирования и, в частности, нарушение гормонального баланса питательной среды – одна из причин возникновения генетического разнообразия культивируемых клеток вследствие нарушения клеточного цикла, в частности митоза. От соотношения фитогормонов, входящих в состав питательных сред, во многом зависит цитогенетическая структура клеточных популяций. Однако морфологическая и цитогенетическая разнокачественность клеточных популяций может возникнуть и вследствие влияния таких компонентов питательной среды как: некоторые минеральные соли, сахара или другой источник углеродного питания, витамины, растительные экстракты, а также от режима выращивания. Важна и специфика добавления их в среду – при ударных дозах – лавинообразном увеличении фитогормонов (при инкубации с ними в среде), воздействие их на клетку резко возрастает и способно изменить геном. Длительное культивирование клеток *in vitro* также способствует повышению генетического разнообразия соматклонов. Причем для некоторых видов показано, что, несмотря на присутствие в культуре клеток разной ploидности, регенерировавшие растения были преимущественно диплоидными. Это явление было объяснено тем, что в процессе культивирования отбирались растения-регенеранты с более или менее нормальной морфологией, которые регенерировали, как правило, в первую очередь.

Различные типы морфогенеза – соматический эмбриогенез или органогенез – также могут по-разному сказываться на генетических изменениях и, соответственно, на фенотипе растений. Экспериментально установлено, что при соматическом эмбриогенезе время прохождения цикла клетка–растение значительно короче, чем при органогенезе, поэтому степень сходства получаемого материала и исходного родительского генотипа может быть значительно выше.

Соматклональные варианты имеют, несомненно, практическое применение в сельскохозяйственной практике, в силу появления форм, отличающихся от родительских по различным биохимическим качественным и количественным признакам, а также цитогенетическим характеристикам. Например, получены соматклоны картофеля сорта «Зарево», отличающиеся высокой урожайностью, повышенной устойчивостью к заболеваниям, более высоким содержанием в клубнях протеина и крахмала. У табака получены соматклоны через каллусную культуру, устойчивые к вирусу табачной мозаики, а для сахарного тростника выведен новый сорт, характеризующийся высокой урожайностью и

повышенной устойчивостью к заболеваниям. В настоящее время метод культуры тканей начал широко использоваться в селекции не только кормовых и технических культур, но и декоративных и лекарственных растений. Примером тому может служить новый сорт пеларгонии «Velvet Rose», полученный из каллусной культуры.

Соматический (митотический) кроссинговер. В соматических клетках иногда происходит обмен между хроматидами гомологичных хромосом, в результате которого наблюдается комбинативная изменчивость, подобная той, которая регулярно генерируется мейозом. Доказательство митотического кроссинговера также было получено на дрозофиле при анализе изменчивости признаков, определяемых генами «y» (yellow – желтое тело) и «sn» (singed – опалённые щетинки), которые находятся в X-хромосоме.

### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. В чём отличие проявления соматической изменчивости интактных и культивируемых клеток?*
- 2. От чего зависит соматическая изменчивость?*
- 3. Как влияет соматическая изменчивость на последующую регенерацию растений?*
- 4. Как влияет стресс на данный показатель и почему это важно для эволюции?*

### **2.3. Факторы культивирования, их влияние на генотип**

Фитогормоны – физиологически активные вещества, образующиеся в растениях (главным образом в активно растущих тканях, на верхушках стеблей и корней – Рис.3.) и регулирующие их рост и развитие. Примером фитогормонов являются ауксины, гиббереллины и цитокинины. Фитогормоны менее специфичны, чем гормоны животных. Как известно, фитогормоны – это соединения, участвующие в регуляции ростовых процессов у целого растения. Они обладают тремя общими основными свойствами. Во-первых, гормоны синтезируются в одном из органов растения (молодые листья, почки, верхушки корней и побегов) и транспортируются в другие места, где активируют процессы органогенеза и роста. Во-вторых, гормоны синтезируются и функционируют в растениях в микроколичествах. В-третьих, гормоны в отличие от других метаболитов (и в том числе от витаминов) способны вызывать в растении формативный эффект, например гиббереллины индуцируют рост стебля, ауксины – рост корня, цитокинины – процессы клеточного деления.



**Рис. 3. Биосинтез фитогормонов (Г.С. Муромцев и др., 1987, дополненная)**

Значительную роль цитокинин играет и в регуляции органогенеза. Преобладающая концентрация этих гормонов задерживает образование корней и ускоряет закладку стеблевых почек. При нанесении цитокининов на пазушные почки цветоноса последние могут развиваться в новые растения или цветоносы. Они также способны индуцировать зацветание некоторых видов растений в условиях неблагоприятного фотопериода. Важную роль играют ауксины. Они усиливают или поддерживают рост каллуса. Хотя гормоны и вызывают мутации, каллусные ткани большинства растений образуются только при одновременном присутствии в питательной среде ауксинов и цитокинов. Однако, при длительном культивировании практически у всех тканей может возникнуть специфическое свойство гормоннезависимости, то есть автономности по отношению к ауксинам или/и цитокининам. Эти ткани могут расти на среде без гормонов, что делает их похожими на раковые клетки и резко отличает от нормальных каллусных тканей. Такие ткани могут быть получены также при трансформации растения агробактериями.

Клетки, которые в процессе культивирования приобрели свойство автономности от гормонов, называют «привыкшими». Ткани, образованные такими «привыкшими» клетками, называют «химическими опухолями», в отличие от растительных или генетических опухолей. Генетические опухоли возникают на межвидовых гибридах растений, растительные опухоли имеют бактериальное или вирусное происхождение, чаще всего вызываются у растений агробактериями.

Важную роль для метаболизма играют и макроэлементы. Показано существенное влияние разного соотношения аммиачной и нитратной формы азота на рост клеток; важна концентрация (осмотический потенциал среды), уровень pH, который доводят с учётом последующего изменения показателя при автоклавировании и кондиционировании среды клетками.

### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. Что такое химические опухоли? Как они возникают?*
- 2. Как формируются генетические опухоли растений?*
- 3. Какие фитогормоны способствуют росту клеток стерильной культуры?*

**2.4. Криосохранение.** При получении клеточных линий с полезными признаками встаёт проблема сохранения этих признаков из-за роста генетической гетерогенности клеток при длительном пассировании. Растения могут хранить генетическую информацию в семенах, однако этот источник не вполне надежен, так как со временем всхожесть семян падает. Кроме того, некоторые растения размножаются только вегетативно (многие сортовые формы, самоклоны и гибриды F-1. Поэтому необходимо сохранять часть материала *in vitro*. С другой стороны, в некоторых случаях удается получить новые клеточные линии, синтезирующие большее количество вторичных метаболитов, то есть более продуктивные, которые тоже нуждаются в стабилизации генома.

Для исследования физиологических и биохимических процессов, протекающих в тканях, требуются стандартные исходные культуры. Все это делает проблему сохранения генофонда весьма актуальной.

Как уже отмечалось, при пассировании клеточных культур возникает опасность соматической изменчивости, накопления мутаций, контаминаций (заражения чужеродным генетическим материалом). Это требует определенных финансовых и трудовых затрат (необходимость частых пересадок, расходы, связанные со средой и т.д.).

Решить все эти проблемы способно криосохранение. Криосохранение (от греческого «криос» - мороз) буквально означает хранение в замороженном состоянии. На практике это хранение при очень низких температурах: при температуре сухого льда ( $-79^{\circ}\text{C}$ ), в морозильниках с ультранизкой температурой ( $-80^{\circ}\text{C}$  и ниже), в парах ( $-140^{\circ}\text{C}$ ) или непосредственно в жидком азоте ( $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Наиболее проста техника криосохранения пыльцы. Для этого подсушенную пыльцу помещают в запечатанные пластмассовые ампулы и переносят в жидкий азот. Криобанк пыльцы делает возможным скрещивание сортов растений, различающихся по времени цветения или же имеющих пыльцу с коротким периодом фертильности.

Безусловно, хранение семян растений путем глубинного замораживания – наиболее простой и дешёвый способ сохранения генетических ресурсов. Технология также проста, как и для пыльцы, ведь клетки семян низко оводнены и образования кристаллов внутриклеточного льда в них не происходит. Для растений, размножающихся только вегетативным путем (черенками, отводками, клубнями) этот способ не пригоден. На сегодняшний день для вегетативно размножающихся растений наилучшим способом сохранения их генофонда является криоконсервирование верхушечных меристем побегов. Это объясняется тем, что меристемы после криосохранения сразу развиваются в

целое растение, т.е. в данном случае нет необходимости проводить дополнительные процедуры, связанные с регенерацией. Клетки меристемных растений всегда однородны по плоидности, и регенерируемые из них растения соответствуют исходному генотипу, что обеспечивает большую генетическую стабильность. Кроме того, меристемные клетки растений очень мелкие, почти не вакуолизованы, а связи с этим они намного легче переносят глубокое замораживание и оттаивание. Подвергая криоконсервированию меристемы, можно не только сохранить данный генотип, но и получить впоследствии путём микрклонального размножения необходимое количество растений.

### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. Почему нельзя одинаково замораживать вегетирующие части растений и семена?*
- 2. Какие задачи решает криосохранение меристем?*
- 3. Почему штаммы-суперпродуценты необходимо частично замораживать и хранить в жидком азоте?*

### **Раздел 3. Методы клеточной инженерии растений**

Примитивная селекция растений возникла одновременно с земледелием. Начав возделывать растения, человек стал отбирать, сохранять и размножать лучшие из них. Многие культурные растения возделывались примерно за 10 тысяч лет до нашей эры. Селекционеры древности создали прекрасные сорта плодовых растений, винограда, многие сорта пшеницы, бахчевых культур. Но значительное влияние на развитие селекции растений оказала работа западно-европейских селекционеров-практиков 18 века, например, английских ученых Галлета, Ширефа, немецкого ученого Римпау. Они создали несколько сортов пшеницы, разработали способы выведения новых сортов. В 1774 году под Парижем основана селекционная фирма «Вильморен», селекционеры которой первыми стали оценивать отбираемые растения по потомству. Им удалось вывести сорта сахарной свёклы, которые содержали почти в 3 раза больше сахара, чем исходные. Эта работа доказала огромное влияние селекции на изменение природы растений в нужную человеку сторону. С развитием капитализма в конце 18 – начале 19 веков в Европе и Северной Америке возникают промышленные семеноводческие фирмы и крупные селекционные предприятия; зарождается промышленная селекция растений, на развитие которой большое влияние оказали достижения ботаники, цитологии и других биологических наук.

В России И.В. Мичурин работал по селекции плодовых культур. Успешно применив ряд новых оригинальных методов, он создал много сортов плодовых и ягодных культур. Большое значение для теории и практики селекции растений имели его работы по гибридизации географически отдаленных форм. В это же время в США Л. Бёрбанк путем тщательного проведения скрещиваний и совершенного отбора создал множество новых сортов различных

сельскохозяйственных культур. Некоторые из них относились к формам, ранее не встречавшимся в природе (бескосточковая слива, неколючие сорта ежевики).

В селекции растений особое значение имеют развитие научных основ отбора и гибридизации, методы изменения исходного материала – полиплоидия, экспериментальный мутагенез, гаплоидия, клеточная селекция, хромосомная и геновая инженерия, гибридизация протопластов. Всё более сложные задачи селекции решаются применением культуры зародышевых и соматических клеток растений; изучением генетических и физиолого-биохимических основ иммунитета, закономерностей наследования количественных и качественных признаков (белка и его аминокислотного состава, жиров, крахмала, сахаров). В современной селекции растений в качестве исходного материала используют естественные и гибридные популяции, инбредные линии, искусственно полученные мутанты и полиплоидные формы. Большинство сортов сельскохозяйственных растений создано методом отбора и внутривидовой гибридизации. Получены мутантные и полиплоидные сорта зерновых, технических и кормовых культур. Успех гибридизации в значительной степени определяется правильным подбором для скрещивания исходных родительских пар, особенно по эколого-географическому принципу. При необходимости объединить в гибридном потомстве признаки нескольких родительских форм используют ступенчатую гибридизацию. Этот метод широко применяется во всем мире. Для усиления в гибридном потомстве желаемых свойств одного из родителей применяют возвратные скрещивания. Для сочетания в одном сорте признаков и свойств разных видов или родов растений применяют отдаленную гибридизацию.

### **3.1. Особенность культуры *in vitro***

Методы культивирования изолированных фрагментов растений основаны на использовании важного свойства растительной клетки – тотипотентности. Тотипотентность (лат. totus – весь, potentia – сила) – это свойство клетки реализовывать генетическую информацию, обеспечивающую её дифференцировку и развитие до целого организма. Тотипотентностью обладают оплодотворённые яйцеклетки растений и яйца животных. Что касается дифференцированных клеток, то у животных тотипотентность присуща только некоторым клеткам кишечнорастворимых. Так, соматические клетки гидры дают начало новому организму. У высших животных с ранних этапов эмбриогенеза, с началом специализации клеток, тотипотентность не реализуется. Однако клетки, изолированные из эмбрионов млекопитающих, в условиях культивирования могут сохранять плюрипотентность – способность дифференцироваться во все типы клеток как собственно зародыша, так и экстраэмбриональных тканей. Такие клетки получили название эмбриональных стволовых клеток. У растений в природных условиях (*in vivo*) тотипотентность могут проявлять и специализированные клетки. Пример – вегетативное размножение. Тотипотентность у растений реализуется и при заживлении ран. В этом случае на раневой поверхности растений в результате неорганизованной пролиферации клеток происходит развитие каллуса (лат. callus – мозоль).

Образование каллуса можно наблюдать при прививках в местах срастания привоя и подвоя. Каллус способствует заживлению ран и первоначально состоит из недифференцированных клеток, которые образуются из клеток тканей, способных к дедифференциации (камбия, флоэмы, молодых клеток ксилемы). Впоследствии в каллусе может иметь место вторичная дифференциация с образованием специализированных тканей и органов. Однако в природных условиях растения ряда систематических групп тотипотентность не проявляют. Ввиду высокой специализации клеток многие однодольные растения утратили способность к раневой реакции и вегетативному размножению. Возможность реализации супрессированной *in vivo* и активной тотипотентности предоставляется в условиях *in vitro* при выращивании фрагментов тканей, органов или клеток на искусственных питательных средах. Этот переход специализированных клеток к эмбриональному развитию, делению с образованием недифференцированных клеток, а затем и к повторной дифференциации осуществляется под действием экзогенных фитогормонов.

### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. В чём отличие развития растительных и животных клеток?*
- 2. Для каких растений тотипотентность интактных клеток элиминирована?*
- 3. Что происходит при развитии раневой меристемы?*
- 4. На каком свойстве растительных клеток основано вегетативное размножение?*

### **3.2. Основы селекции *in vitro*. Значение селективного фактора**

При селекции, так или иначе, происходит направленный отбор лучших вариантов. Значительный интерес представляет использование клеточной селекции на основе получения соматоклональных вариантов или индуцированных мутаций с последующим отбором в селективных условиях клеток с искомыми признаками. Для этого 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 линии отбирают визуально или с использованием биохимических методов (тонкослойная или

жидкостная хроматография, радиоиммунный анализ, микроспектрофотометрия и др.).

Из перечисленных выше приемов клеточной селекции прямая селекция является наиболее распространённым методом и используется для выделения растений-регенерантов, устойчивых к гербицидам, антибиотикам, токсинам, тяжелым металлам, солям и другим антиметаболитам. Для проведения работ по клеточной селекции растений в условиях *in vitro* в качестве объекта исследования могут быть использованы каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты. Выбор объекта зависит от наличия разработанных технологий применительно к различным видам растений, а также от конечных целей исследования. Каллусная ткань представляет собой легко доступный материал, который наиболее часто используют. Однако для каллуса характерен медленный рост, неравноценное для всех клеток действие токсических веществ, которые применяются в качестве селективного фактора, а также возможная потеря регенерационной способности в процессе культивирования. Целесообразнее проводить селекцию на уровне одиночных клеток (суспензионная культура, протопласты), но для многих видов способы культивирования одиночных клеток пока не разработаны. Поэтому использование каллуса остается единственно возможным способом селекции. Сначала определяют рабочую концентрацию селективного фактора (строят дозовую кривую и определяют сублетальный уровень). Чтобы исключить возникновение физиологической адаптации без генетической устойчивости, стабильность устойчивости полученных клонов проверяют в течение последующих 4–6 субкультивирований на селективной среде. Затем их переносят на среду без селективного фактора, культивируют 2–3 пассажа, а потом повторно возвращают в селективные условия. Работы по получению растений, устойчивых к повышенным солям, токсинам патогенных грибов, показали, что устойчивость клетки и растения-регенеранта к исследуемому селективному фактору может и не совпадать. Прямая корреляция между устойчивостью растений и клеток *in vitro* отмечена для низких температур, устойчивости к гербицидам, высоким концентрациям алюминия и некоторым другим факторам. Таким образом, использование каллусной культуры в селекционных целях открывает большие возможности для создания новых форм растений с ценными признаками. В качестве исходного материала для селекции могут быть использованы также культуры соматических или андрогенных эмбриоидов, органогенные экспланты или меристематические и стеблевые части растений, изолированные зародыши. Например, на культуре зародышей ячменя *in vitro* получены растения, устойчивые к аналогам аминокислот, с лучшим качественным и количественным составом белка. Таким образом, проведение селекции на клеточном уровне позволяет создавать новые формы растений в 2–4 раза быстрее по сравнению с традиционными способами селекции.

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. Какие виды селекции существуют?
2. В чём смысл использования селективного фактора?
3. Какие селективные факторы чаще всего используют?
4. Какой метод селекции наименее трудоёмкий?

### **3.3. Отбор исходного материала.**

На качество растительной продукции, прежде всего, влияет её биохимический состав, определяемый активностью и спецификой первичного и вторичного метаболизма клеток. Под *метаболизмом*, или обменом веществ, понимают совокупность химических реакций в организме, обеспечивающих его веществами для построения тела и энергией для поддержания жизнедеятельности. Часть реакций оказывается сходной для всех живых организмов (образование и расщепление нуклеиновых кислот, белков и пептидов, а также большинства углеводов, некоторых карбоновых кислот и т.д.) и получила название *первичного метаболизма*, или *первичного обмена*.

Помимо реакций первичного обмена существует значительное число метаболических путей, приводящих к образованию соединений, свойственных лишь определённым, иногда очень немногим, группам организмов. Эти реакции, согласно И. Чапеку (1921) и К. Пэху (1940), объединяются термином *вторичный метаболизм*, или *вторичный обмен*, а продукты называются *продуктами вторичного метаболизма*, или *вторичными соединениями* (иногда, что не совсем верно, вторичными метаболитами). Следует, однако, подчеркнуть, что различия между первичным и вторичным метаболизмом не очень резки.

Вторичные соединения образуются по преимуществу у вегетативно малоподвижных групп живых организмов – растений и грибов, а также многих прокариот. У животных продукты вторичного обмена сравнительно редки и часто поступают извне вместе с растительной пищей. Роль продуктов вторичного метаболизма и причины их появления в той или иной группе различны. В самой общей форме им приписывается адаптивная роль и в широком смысле защитные свойства.

Стремительное развитие химии природных соединений за последние четыре десятилетия связано с созданием высокоразрешающих аналитических инструментов. Это привело к тому, что мир «вторичных соединений» значительно расширился. Например, число известных алкалоидов около 5 000 (по некоторым данным – 10 000), фенольных соединений – 10 000.

Любое растительное сырьё всегда содержит сложный набор первичных и вторичных соединений, которые определяют множественный характер действия лекарственных растений. Однако роль тех и других в современной фитотерапии пока различна. Известно относительно немного растительных объектов, использование которых в медицине определяется, прежде всего, наличием в них первичных соединений. Однако не исключено повышение их

роли в медицине в будущем для использования в качестве новых иммуномодулирующих средств.

Продукты вторичного обмена применяются в современной медицине значительно чаще и шире. Это связано с ощутимым и нередко очень ярким фармакологическим эффектом. Образуюсь на основе первичных соединений, они могут накапливаться либо в чистом виде, либо в ходе реакций обмена подвергаются гликозилированию, т.е. оказываются присоединенными к молекуле какого-либо сахара. В результате гликозилирования возникают молекулы – *гетерозиды*, которые отличаются от негликозилированных вторичных соединений, как правило, лучшей растворимостью, что облегчает их участие в реакциях обмена и имеет в этом смысле важнейшее биологическое значение. Гликозилированные формы любых вторичных соединений принято называть *гликозидами*.

Однако необходимо не только знать, какой биохимический состав имеют родительские формы, но и как они передают эти особенности своему потомству. Задача селекции в конечном случае – создание и отбор нового перспективного и устойчивого материала. Привлекательность новых сортов определяется их выносливостью, урожайностью, вкусовыми качествами продукции (у овощных и плодовых культур), концентрацией искомых продуктов (у технических культур), наличием привлекательной окраски (у декоративных растений). И, конечно, растения должны противостоять патогенам лучше, чем старые сорта. Поскольку искомых свойств набирается в итоге достаточно много, для наиболее плодотворной работы, как минимум, необходимо знание особенностей проявления и наследования у растений этих признаков.

Наследование – передача генетической информации (генетических признаков) от одного поколения организмов к другому.

Независимое наследование – наследование определенного гена (признака) без влияния иных генетических факторов (др. определенного гена, пола); как правило, говорит о генах, входящих в разные группы сцепления. (закон Г. Менделя: при дигибридном скрещивании у гибридов второго поколения каждая пара контрастных признаков наследуется независимо от других и дает расщепление 3:1, образуя при этом четыре фенотипические группы в соотношении 9:3:3:1)

Сцепленное наследование – наследование признаков, гены которых локализованы в одной хромосоме. Сила сцепления между генами зависит от расстояния между ними: чем дальше гены располагаются друг от друга, тем выше частота кроссинговера и наоборот. Полное сцепление – разновидность сцепленного наследования, при которой гены анализируемых признаков располагаются так близко друг к другу, что кроссинговер между ними становится невозможным. Неполное сцепление – разновидность сцепленного наследования, при которой гены анализируемых признаков располагаются на некотором расстоянии друг от друга, что делает возможным кроссинговер между ними.

Моногенным называется такой тип наследования, когда наследственный признак контролируется одним геном. (Аутосомное наследование и сцепленное с полом наследование). Аутосомное наследование – независимое от пола (не сцепленное с полом) наследование какого-либо признака. Характерные черты аутосомного наследования признаков обусловлены тем, что соответствующие гены, расположенные в аутосомах, представлены у всех особей вида в двойном наборе. Это означает, что любой организм получает такие гены от обоих родителей. В соответствии с законом чистоты гамет в ходе гаметогенеза все половые клетки получают по одному гену из каждой аллельной пары. Обоснованием этого закона является расхождение гомологичных хромосом, в которых располагаются аллельные гены, к разным полюсам клетки в анафазе I мейоза.

Наследование, сцепленное с полом – наследование какого-либо гена, находящегося в половых хромосомах. X-сцепленное наследование. X-хромосома присутствует в кариотипе каждой особи, поэтому признаки, определяемые генами этой хромосомы, формируются у представителей как женского, так и мужского пола. Особи гомогаметного пола получают эти гены от обоих родителей и через свои гаметы передают их всем потомкам. Представители гетерогаметного пола получают единственную X-хромосому от гомогаметного родителя и передают её своему гомогаметному потомству.

Голандрическое наследование. Активно функционирующие гены Y-хромосомы, не имеющие аллелей в X-хромосоме, присутствуют в генотипе только гетерогаметного пола. Поэтому они проявляются фенотипически и передаются из поколения в поколение лишь у представителей гетерогаметного пола.

Полигенное наследование – тип наследования признаков, обусловленных действием многих генов, каждый из которых оказывает лишь слабое действие. Фенотипически проявление полигенно обусловленного признака зависит от условий внешней среды. У потомков наблюдается непрерывный ряд вариаций количественного проявления подобного признака, а не появление четко различающихся по фенотипу классов. Так чаще всего наследуется комплексная устойчивость к патогенам. В ряде случаев при блокировании отдельного гена признак не проявляется вообще, несмотря на его полигенную обусловленность. Это свидетельствует о пороговом проявлении признака.

Другое важное качество генома, так или иначе влияющее на урожайность и жизнеспособность растений – это генетический груз и его наполненность специфическими рецессивными мутациями. Этот параметр необходимо принимать во внимание на всех этапах селекции. Генетический груз – накопленная в геноме изменчивость, точнее разнообразие как форма существования генетической информации, особенно выраженная у примитивных видов и сортов (первый тип популяций по Гранту), из-за чего «плата за отбор» оказывается недостижимо высокой и форма оказывается в ловушке состояния примитивности. Экологическая специализация связана с уменьшением ареала и практически всегда приводит к инбридингу вплоть до самооплодотворения. При накоплении генетического груза это невозможно, так

как вызывает его проявление и элиминирование малочисленной популяции, что в итоге имеет значение для эволюции. С другой стороны, форма генетического груза позволяет сосуществовать в геноме не только огромному количеству рецессивных мутантных генов под покровом гетерозиготности, но также и повторяющимся эгоистическим последовательностям, обеспечивающим перетасовки генов для поиска эволюционного смысла их комбинаций. Имеется в виду так называемый мобилизационный резерв вида в определении С.М.Гершензона.

Генетический груз не поддается параметрической оценке, однако количественные показатели, определяющие размах изменчивости, теоретически должны уменьшаться в процессе согласованной эволюции. У близких видов они реально уменьшаются от примитивных к специализированным формам. Теоретически генетический груз рецессивных мутаций можно снизить с помощью инбридинга. Действительно, некоторые формы проявляют инбредную депрессию в течение шести-семи поколений близкородственных скрещиваний, однако эффект скачкообразный и в итоге приспособленность может превысить исходную величину, что связано с особенностями генетической конституции объекта. Внешняя форма выражения генетического груза может быть различна в зависимости от сорта и его предыстории.

#### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. По какому механизму наследуется множественная устойчивость к болезням?*
- 2. Какие виды наследования известны? Каким образом их можно классифицировать?*
- 3. Что такое генетический груз и каково его значение для стабильности популяции?*
- 4. Для какой хозяйственной группы культивируемых растений вторичный метаболизм особенно важен?*

#### **3.4. Введение в культуру in vitro**

Все работы с культурой клеток и тканей in vitro в биотехнологической лаборатории проводят в стерильных (асептических) условиях в стерильном боксе или ламинар-боксе стерильными инструментами в стерильной посуде на стерильных питательных средах. Чаще всего для стерилизации помещений (боксов для пересадки тканей, культуральных комнат) используют ультрафиолетовое облучение в течение 0,5–2 часов (в зависимости от площади помещения). Облучение ультрафиолетовыми лучами (260 нм) – наиболее часто используется в лабораториях для стерилизации помещений и настольных боксов. При длительном воздействии эти лучи вызывают гибель всех бактерий. Живые бактерии погибают очень быстро, а покоящиеся формы и споры грибов значительно медленнее. Поэтому в боксах устанавливают бактерицидные лампы БУФ-15 или БУФ-30, которые включаются на 30 минут за 1 час до работы. Кроме того, рекомендуется проводить профилактическое облучение

боксов раз в сутки. Работы в облученном помещении начинают через 15–20 минут после отключения бактерицидных ламп, так как под действием ультрафиолетового излучения образуются озон и диоксид азота – газы токсичные для человека. Для достижения максимальной стерильности исходно все поверхности перед обработкой УФ тщательно отмывают моющими средствами, водой и растворами хлорсодержащих веществ, а непосредственно перед работой в ламинар-боксе поверхности обрабатывают 70 % спиртом. Только эта концентрация является стерилизующей.

Подготовительная стадия. Исходным материалом для введения в культуру обычно служат отобранные растения, типичные для данного сорта, без признаков инфекции.

Диагностика инфицирования. Вирусные болезни – причина потери от 10 до 50% урожая сельскохозяйственных культур, размножающихся вегетативным способом. Разумеется, что для введения в стерильную культуру нецелесообразно использовать заражённые растения. Во многих случаях вывод о зараженности растений вирусами можно сделать уже по внешним симптомам – нарушению роста, хлорозу, некрозу, мозаике листьев, а также структурным изменениям стеблей, цветков, плодов, семян и клубней растения.

Метод визуальной диагностики прост, не требует специальных приборов, но предполагает определенный опыт и квалификацию сотрудника. Основные недостатки метода – низкая специфичность положительных и неудовлетворительная достоверность отрицательных маркерных признаков, так как, обусловленные различными вирусами, симптомы чрезвычайно сходны между собой. Аналогичные изменения вызывают нарушения условий культивирования, недостаток или избыток отдельных элементов питания, неправильное внесение гербицидов, другие патогенные организмы и факторы.

В семеноводческой работе визуальная диагностика применяется как метод предварительной оценки зараженности материала, результаты которой нуждаются в проверке и уточнении другими способами.

Индикаторная диагностика. Сущность метода заключается в перенесении предполагаемой вирусной инфекции на тестовые растения-индикаторы, которые реагируют на диагностируемый возбудитель строго определёнными симптомами. Заражение растений осуществляется натиранием листьев соком исследуемого образца; в тех случаях, когда вирусы не передаются контактным путем, трансплантируют живую ткань исследуемого образца на растение-индикатор.

Эффективность индикаторной диагностики зависит от правильного выбора растения-индикатора, условий выращивания до и после заражения, выбора момента заражения. Необходимо исключить и самостоятельное неконтролируемое заражение тестового растения, поэтому его выращивают в изолированной от инфекции среде. Метод довольно трудоемок и требует специальных площадей (чаще теплиц) для выращивания растений-индикаторов в искусственных условиях.

Для подготовки к введению в культуру *in vitro* целесообразно уменьшить инфицированность интактных растений путем выращивания в теплицах в

полустерильных условиях. В теплицах поддерживается высокая температура (25°C) и сравнительно низкая влажность (70%). Для уменьшения инфицирования растения поливают непосредственно под корень, исключая попадание воды и подкормки на листья. Минимальная длительность подготовки зависит от вида растений. Например, для фикуса и драцены достаточно 3-х месяцев. На этом этапе может проводиться термотерапия для борьбы с вирусами.

Также важно изменить физиологическое состояние растения, обеспечив реовенилизацию растений, повысить способность тканей экспланта к пролиферации. Для этой цели регулируют физические условия (свет, температуру), а также используют регуляторы роста (в основном вещества группы цитокининов и гиббереллинов). Регуляторы роста вводят путем инъекции в стебель, опрыскивания или выдерживания эксплантов в специальных растворах. Целесообразно поддержание оптимального фотопериода.

Для некоторых растений необходима холодовая обработка при температуре 4-5°C с целью выведения из состояния глубокого физиологического покоя (древесные растения холодной зоны). Длительность такой обработки зависит от вида растений. Некоторые растения требуют наоборот тепловой стратификации (масличная пальма), а жень-шень поэтапной тепло-холодной стратификации.

Перед введением в культуру *in vitro* также могут проводить изучение наследования ценных признаков у отдельных семей (потомстве одного растения), если речь идёт о получении культуры растения определённого сорта.

Материалом для введения в культуру *in vitro* как правило служит верхушечный побег растения, так как это позволяет получать безвирусный посадочный материал. Стерилизацию поверхности проводят с помощью 70% алкоголя, 3-5% хлорной извести, хлорамина, препаратов с содержанием ртути (сулема и диацид), перекиси водорода. Для размножения используют верхушечный побег 0,3-0,8 мм, для смеси чаще всего используют работы Мурасига и Скуга, с добавлением цитокининов ВАР (бензиламинопурина), как стимулятора роста для образования новых адвентивных побегов. Каллусные культуры получают при совместном использовании ауксинов с цитокининами. На первом этапе растения размножаются, затем добиваются полной регенерации и укоренения.

Собственно введение в культуру *in vitro*. Целью этапа является инициация роста тканей экспланта *in vitro*. Эксплантом (эксплант — группа клеток, отделенная от материнского организма) для микроразмножения обычно служат апикальные или боковые почки. Для некоторых растений используют части листа или цветка. Для получения свободных от вирусов растений используют апикальные меристемы (апикальная меристема — группа меристематических клеток, организованных в ростовой центр, занимающая терминальное положение в стебле и обеспечивающая образование всех органов и первичных тканей побега). При выборе экспланта необходимо учитывать, что: а) эксплянты из надземной части растения менее инфицированы, чем из

подземной; б) внутренние части растения менее инфицированы, чем внешние; в) чем меньше эксплант, тем меньше риск инфицирования; г) регенерационная способность экспланта обычно обратно пропорциональна возрасту экспланта и возрасту исходного растения; д) эксплант, взятый из верхушечной почки, часто находится в более молодом возрасте и регенерационная способность его выше; е) на эффективность пролиферации влияет время взятия экспланта. Части растений взятые в состоянии активно роста (весна – начало лета), приживаются лучше.

**Таблица 3. Стерилизация исходного растительного материала (Р.Г. Бутенко, 1990)**

Объект	Время стерилизации, мин			
	Диацид 0,1%	Сулема 0,1%	Гипохлориты (Ca, Na) 5-9%	Пероксид водорода 10-12%
Семена:				
сухие	15-20	10-15	15-20	12-15
набухшие	6-10	6-8	10-15	6-8
Ткани:				
мясисто-го корня, клубня	20-30	15-25	15-20	-
одревесневшие стебли	20-40	20-25	20-25	-
Листья	1-3	1-3	3-6	3-5
Апексы	1-10	1-7	3-15	2-7

Стерилизация эксплантов. Работающий должен вымыть руки с мылом и протереть их спиртом, надеть стерильный халат, завязать волосы стерильной косынкой. Перед стерилизацией объекта его тщательно моют теплой водой с мылом, промывают дистиллированной водой, очищают от лишних тканей, промывают дистиллированной водой и помещают на несколько секунд в 70% спирт (семена на 1-2 минуты). После этого сегменты растений переносят в стерилизующий раствор. Вид стерилизующего агента, его концентрация и время действия, зависит от особенностей тканей исходных растений, обработку подбирают так, чтобы, убивая микроорганизмы, не повредить сам эксплант. Для поверхностной стерилизации растительных объектов применяют: сулему (двуххлористая ртуть) (0.1%), хлорамин (2-10%), гипохлорит кальция (7-10%) или натрия, перекись водорода (13-18%), «Белизну». Свежие растворы отбеливателей при стерилизации нежных эксплантов, таких как молодые листочки, нужно разводить в 2 или даже 3 раза. Продолжительность стерилизации меристем сулемой – 5 минут, семян – 15-20 минут, пергидролем соответственно 15 и 30 минут (Таблица 3).

После стерилизации материал переносят в стерильную дистиллированную воду, выдерживают 10-15 минут, затем меняют воду ещё два раза, выдерживая в каждой порции по 15-20 минут. В стерильных чашках Петри или на стерильных листах бумаги стерильным скальпелем обрезают концы сегментов исходного материала, где клетки могут быть повреждены, и из средних зон

нарезают кусочки тканей, которые высаживают на среду для инициации образования каллусов. Часто поверхность эксплантов дополнительно травмируют лезвием для активизации раневого роста.

**Состав питательной среды.** В качестве питательной среды чаще всего используют среду Мурасиге-Скуга, Шенка-Хильдебранта, Уайта, Гамборга В-5 или их модификации (Таблица 4). Учитывая видовую и сортовую специфику, оптимизируют состав микро- и микроэлементов, витаминов, углеводов и регуляторов роста для каждого вида растения на каждом этапе микроразмножения. Важно также соотношение аммиачной и нитратной формы азота в составе среды. Обычно используют следующие регуляторы роста: цитокинины 6-БАП, кинетин, зеатин в концентрации 1-10 мг/л; ауксины – 2,4-Д, индолилуксусная, индолилмасляная или нафтилуксусная кислоты в концентрации 0,1-1,0 мг/л. Для апикальных меристем наряду с цитокининами и ауксинами возможно использование гибберелловой кислоты (0-1 мг/л). Физические условия в климокамере: температура 18-28°C, длина дня - 16 часов. Важной на этом этапе, в особенности для древесных растений и некоторых луковичных, является проблема образования и выброса полифенолов. При механической изоляции экспланта возникает стрессовая ситуация, в которой синтез полифенолов усиливается. В культуре *in vitro* полифенолы окисляются полифенолоксидазами при механическом повреждении, когда субстрат и фермент реакции, исходно локализованные в разных частях клетки, объединяются. Продукты окисления ингибируют активность ферментов, вызывают потемнение ткани и среды, что может привести к гибели экспланта. Для борьбы с этим явлением используют антиоксиданты, добавляя их в состав питательной среды или инкубируя экспланты перед помещением на агаризованную среду. В качестве антиоксидантов используют PVP (поливинилпирролидон), аскорбиновую кислоту, дитиотриэтол. Возможно добавление в состав среды активированного угля для сорбции вредных веществ. Не исключены и другие подходы к решению проблемы полифенолов: культивирование эксплантов в начальный период в темноте или при пониженной освещенности, снижение температуры, частая пересадка эксплантов на свежую питательную среду, культивирование на жидких средах с использованием подложки. Длительность первого этапа колеблется от 1 до 2 месяцев.

**Таблица 4. Состав питательных сред для культивирования клеток растений *in vitro*.**

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л			
	Мурасига-Скуга	Гамборга	Шенка-Хильдебрандта	Гресскофф-Доу
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	1650	2500	-
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	300	-
$\text{KNO}_3$	1900	-	-	1000
$\text{CaCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$	440	150	200	150
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	400	250

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	130	-	200
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-	-	-
$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	37,3	37,3	20,0	37,3
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,95	27,85	15,0	27,8
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	-	150	-	90
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,2	3,0	5,0	3,0
$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	10,0	10,0	10,0
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	1,0	3,0
КI	0,83	0,75	1,00	0,75
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	0,10	0,25
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,2	0,25
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,1	0,25
Глицин	2,0	-	-	2,0
Мезоинозит	100	100	1000	10
Никотиновая кислота	0,5	1,0	5,0	1,0
Пиридоксин-НСI	0,5	1,0	0,5	0,1
Тиамин- НСI	1,0	10,0	5,0	0,1
Глутамин	-	-	-	2,0
2,4-Д	-	0,1-1,0	-	-
Кинетин	-	0,1	0,1	-
Сахароза	30 000	30 000	30 000	20 000

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. Каким образом поддерживается стерильность выращивания клеток растений?
2. Какие соновые стерилизующие растворы используют для активно растущих частей растения?
3. В чём отличие среды Гамборга от Среды Мурасиге-Скуга?
4. Как решают проблему накопления полифенолов в среде культивирования?
5. Как готовят интактные маточные растения к введению в культуру?

### **3.5. Оздоровление посадочного материала**

Оздоровление посадочного материала начинается с момента стерилизации экспланта в асептических условиях бокса. Может быть применена обработка антибиотиками. Однако таким образом можно освободиться лишь от бактерий, нематод и грибных инфекций. Вирусы, вироиды и микоплазмы сохраняются в тканях. При вирусном заражении урожай растений снижается на 10-50%. Повреждаются не только растения, размножающиеся вегетативно, соя может передавать вирусы даже при семенном размножении.

В 1949 г. было выяснено, что клетки меристематических тканей растений не содержат вирусов. В 1952 г. Дж. Морель и Г. Мартин предложили, используя

культивирование меристем, получать безвирусные растения, которые демонстрировали высокие ростовые показатели и продуктивность. Метод заключается в отделении верхушки побега, состоящей из конуса нарастания и 2—3 листовых зачатков. При выращивании на питательной среде образуются сферические образования – протокормы, которые можно делить, и каждую часть культивировать до образования корней и листовых примордиев, получая в большом количестве генетически однородные растения, лишённые вирусов. В настоящий момент культивирование меристем побега – наиболее эффективный способ оздоровления растений от вирусов, виридов и микоплазм. Однако не кантаминирован лишь самый верх побега. Как уже говорилось, чем меньше размер меристематического экспланта, тем труднее вызвать в нём морфогенез. Чем больше размер экспланта, тем легче идёт морфогенез, в результате которого получается целое растение, но тем больше вероятность присутствия вирусов в экспланте. У многих видов и сортов-растений зона свободная от вирусных частиц различна. Так, при клонировании апикальной меристемы картофеля размером 0,2 мм (конус нарастания с одним листовым зачатком), 70% полученных растений были свободны от Y-вируса картофеля, но только 10% от X-вируса. В некоторых случаях не удастся найти оптимальное соотношение между размером меристематического экспланта и морфогенезом в нём, и при этом избавиться от вирусной инфекции. Приходится дополнять метод культуры меристем термо- или(и) химиотерапией. Так, предварительная термотерапия исходных растений позволяет получать свободные от вирусов растения-регенеранты из меристем размером от 0,3 мм до 0,8 мм. Вместе с тем этот прием может вызвать отставание растений в росте, деформацию органов, увеличение латентных (скрытых) инфекций.

Хорошие результаты даёт совместное применение метода культуры тканей и химиотерапии. При внесении в питательную среду препарата «Вирозол» (1-рибофуранозил-1,2,4-триазолкарбоксамид) количество безвирусных растений увеличивается до 80—100 %.

В настоящее время для диагностики вирусных растений используют иммуноферментную технику, моноклональные антитела, метод молекулярной гибридизации меченых фрагментов РНК- и ДНК-виридов и вирусов с вирусами тестируемого объекта.

После оздоровления с помощью вышеперечисленных технологий нормальные растения-регенеранты размножают обычными методами микрклонального размножения. Для некоторых растений, например цитрусовых, получить морфогенез из меристем малого размера не удастся, поэтому требуется разработка оригинальных методов. Лимоны и апельсины оздоравливают и размножают, используя прививки меристем размером 0,14-0,18 мм на пробирочные подвои, полученные из семян. Достоинство такого подхода состоит и в том, что развивающиеся из меристем побеги быстрее вступают в цветение и плодоношение.

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. *Насколько сильно кантаминация вирусами снижает продуктивность растений?*
2. *В чём заключаются методы химического, физического и меристематического освобождения растений от вирусной инфекции?*
3. *Какой размер меристемы наиболее хорош для введения в культуру *in vitro*?*
4. *Как и для чего используют «Вирозол»?*

### **3.6. Идентификация и клонирование генов растений**

Разработан ряд эффективно работающих методов идентификации генов растений. Генетические методы делят на 2 основные группы в зависимости от стратегии идентификации. Если исследователь идёт от признака, исследуя его проявление у растения дикого типа и мутантов, изучая функцию гена на уровне организма, к изучению молекулярной функции гена и его структуры, то эту стратегию принято называть «прямой» генетикой. В случае «обратной» генетики вектор исследований меняется на противоположный. Исследователь, зная нуклеотидную последовательность гена (а чаще всего и его молекулярную функцию), экспериментально вызывает её направленное изменение и изучает влияние этого привнесённого изменения на фенотип, что позволяет определить функцию гена на уровне организма.

Клонирование гена – тиражирование копии гена в составе векторной молекулы в клетках клона. При этом каждая клетка клона будет содержать одинаковые фрагменты чужеродной ДНК. Уровень экспрессии трансгена может значительно варьировать у разных трансгенных растений, полученных в одном эксперименте, при этом он часто не коррелирует с копийностью, а зависит от положения фрагмента в растительном геноме (близость или удаленность от сильных промоторов, усилителей или глушителей транскрипции). Обнаружили и эффект сайленсинга трансгена (от англ. silencing – замолкание) в последующих поколениях, т. е. у ряда трансгенных растений может происходить снижение уровня или полное прекращение синтеза целевого белка, кодируемого встроенным геном. Механизмы замолкания гена могут быть разными. Для обеспечения полноценной экспрессии чужеродных генов следует использовать растительные промоторы.

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. *Что такое «прямая генетика»?*
2. *Что такое «обратная генетика»?*
3. *Что такое эффект сайленсинга трансгена?*

### **3.7. Искусственный мутагенез**

Искусственно полученные мутантные формы являются ценным материалом для селекции, поскольку в контролируемых условиях можно

получать мутации, встречающиеся в природе очень редко или вообще не обнаруживаемые. Мутагенез широко применяется в селекции микроорганизмов и растений.

Для получения индуцированных мутаций у растений используют самые различные мутагены. Дозу этих мутагенов подбирают таким образом, чтобы погибало не более 30-50% обработанных объектов. Например, при использовании ионизирующего излучения такая критическая доза составляет от 1-3 до 10-15 и даже 50-100 кило рентген. При использовании химических мутагенов применяют их водные растворы с концентрацией 0,01-0,2%; время обработки – от 6 до 24 часов и более. Воздействие можно подбирать эмпирически, комбинируя в разном соотношении дозу (концентрацию) и экспозицию (время воздействия).

Обработке подвергают пыльцу, семена, проростки, почки, черенки, луковицы, клубни и другие части растений. Растения, выращенные из обработанных семян (почек, черенков и т.д.) обозначаются символом  $M_1$  (первое мутантное поколение). В  $M_1$  отбор вести трудно, поскольку большая часть мутаций рецессивна и не проявляется в фенотипе. Кроме того, наряду с мутациями часто встречаются и ненаследуемые изменения: фенкопии, тераты, морфозы. Поэтому выделение мутаций начинают в  $M_2$  (втором мутантном поколении), когда проявляется хотя бы часть рецессивных мутаций, а вероятность сохранения ненаследственных изменений снижается. Обычно отбор продолжается в течение 2-3 поколений, хотя в некоторых случаях для выбраковки ненаследуемых изменений требуется до 5-7 поколений (такие ненаследственные изменения, сохраняющиеся на протяжении нескольких поколений, называют длительными модификациями). Насколько же тяжело выводить сорта некоторых кустарников и деревьев, которые зацветают не ранее 15-20 летнего возраста!

Полученные мутантные формы или непосредственно дают начало новому сорту (например, карликовые томаты с жёлтыми или оранжевыми плодами) или используются в дальнейшей селекционной работе.

Однако применение индуцированных мутаций в селекции все же ограничено, поскольку мутации приводят к разрушению исторически сложившихся генетических комплексов. У животных мутации практически всегда приводят к снижению жизнеспособности или бесплодию. Поэтому в селекции стараются использовать уже известные мутации, которые прошли испытание естественным отбором.

Спонтанный мутагенез определяется природными факторами окружающей среды: светом, радиацией, химическими реагентами, которые постоянно присутствуют в разной концентрации в окружающей среде. У кукурузы выделены и классифицированы 6 типов спонтанных естественных мутаций, которые имеют рецессивный характер проявления:

- мутации генов структуры эндосперма и зародыша;
- хлорофильные мутации;
- мутации  $bt$  коричневой жилки листа;
- мутации структуры листа, стебля, корня;

- мутации дихотомического разветвления стебля;
- мутации половых признаков кукурузы.

Из мутаций генов структуры эндосперма в селекционной практике наиболее широко используют мутации мучнистого и непрозрачного эндосперма (fl1, fl2, opaque endosperm), сахарного (sh – shrunken endosperm), воскообразного (wx – waxy endosperm), амилозного (ae – amylose extender). Известны также мутации, которые вызывают прорастание семян в початках в поле (vp) и другие.

Мутации waxy и amylose extender позволили селекционерам создавать высокоамилозные и амилопектиновые гибриды кукурузы. Первые такие гибриды созданы для промышленного производства крахмала, биоутилизуемого сырья упаковочных материалов.

Мутация гена bm коричневой прожилки листа представляет большой интерес для селекции низколигниновых линий и гибридов. Содержание лигнина в листьях и стеблях кукурузы обратно пропорционально качеству и переваримости силосной массы животными.

Среди спонтанных мутаций половых признаков следует отметить мужскую стерильность кукурузы. По фенотипу мутация мужской стерильности проявляется в отсутствии пыльников. В стерильных растениях пыльца дегенерирует и пыльники часто вообще не выходят из колосовых чешуек. Признак мужской стерильности контролируется рецессивными аллелями ms, а восстановление фертильности осуществляется доминантными аллелями Ms. Стерильность, обусловленная ядерными генами, не используется в селекции из-за неустойчивости проявления стерильности в потомстве.

Химические мутагены – группа биологически активных веществ, которые влияют не только на процессы роста и развития растений, но и вызывают наследственные изменения в организме используются в селекции растений для расширения генетического разнообразия. В культуре клеток для этих целей широко применяется нитрозометилмочевина, раствор которой стерилизуют методом мембранной фильтрации перед добавлением.

В настоящее время разработана достаточно надежная теоретическая база, позволяющая успешно применять химические и другие мутагенные факторы для повышения уровня генетического разнообразия культурных растений. С помощью мутагенов можно разорвать сцепленно наследуемые признаки, преодолеть нескрещиваемость между отдаленными формами и стерильность собственной пыльцы, решить задачи, невыполнимые при использовании других методов селекции. В ряде случаев возникают совершенно новые формы и признаки, не встречающиеся в природе, что позволяет расширить естественное разнообразие форм культурных растений.

В зависимости от дозы мутагена возникают различные виды мутаций: генные (точечные микромутации), хромосомные (структурные) и геномные. Наибольший выход положительных мутаций наблюдается при дозах мутагенов, которые не оказывают угнетающего действия на рост и развитие растений. Более грубые типы нарушений, вызванные высокими дозами мутагенов, как правило, индуцируют отрицательные неадаптивные мутации, которые

отбраковывают последующим отбором. При использовании более низких доз мутагенов индуцируются микромутации, затрагивающие изменение отдельных признаков: продуктивность, изменение качества, раннеспелости, некоторых биохимических показателей продукции организма. Именно генные микромутации служат основным материалом при естественном отборе. Они составляют самую большую долю всех наследственных изменений и являются необходимой предпосылкой ускорения эволюции.

Химические мутагены в малых дозах вызывают различные стимулирующие эффекты, модификации негенетического характера. В последнее время стимулирующее воздействие широко применяется в селекции, так как может повысить урожайность в 2-3 раза.

В отличие от действия ростовых стимуляторов ауксинов, гиббереллинов, цитокининов, действующих на этапах вегетативного роста, стимулирующий эффект химических мутагенов после обработки семян более ранний. Химические мутагены действуют на первые этапы эмбриональной детерминации в развивающихся семенах.

### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. На каких дозах получают мутации, имеющие адаптивное значение?*
- 2. Какой эффект имеют высокие уровни мутагенного воздействия?*
- 3. Как соотносятся между собой доза и время воздействия мутагена?*
- 4. Какие мутации имеют народно-хозяйственное значение?*
- 5. Обоснуйте положительные и отрицательные стороны проявления гена *bt* коричневой прожилки листа кукурузы?*

### **3.8. Гибридизация *in vivo* и *in vitro***

Гибридизация – процесс образования или получения гибридов, в основе которого лежит объединение генетического материала разных клеток в одной.

В науке *in vivo* (лат. – буквально «в (на) живом») обозначает проведение экспериментов на живом интактном организме. Такое использование термина исключает использование части живого организма (так, как это делается при тестах *in vitro*) или использование мёртвого организма.

*In vitro* (лат. «в стекле») — это технология выполнения экспериментов, когда опыты проводятся в пробирке, либо, в более общем смысле, вне живого организма. В определённой степени этот термин противопоставляется термину *in vivo*. Многие эксперименты, имеющие отношение к молекулярной биологии, биохимии, фармакологии, медицине, генетике и др., проводятся вне организма и живых клеток, хотя при этом полученные данные не могут быть однозначно достоверными.

Одним из известных селекционеров прошлого века был И.В. Мичурин. Его вклад в отечественное сортопроизводство феноменален, хотя некоторые его подходы сейчас активно критикуют. Мичуриным были созданы сотни новых сортов растений. Ряд сортов яблонь и ягодных культур продвинуты далеко на север. Они обладают высокими вкусовыми качествами и в то же время

прекрасно приспособлены к местным условиям. Сорт «Антоновка Шестисотграммовая» даёт урожай с одного дерева до 350 кг. Мичуринский виноград выдерживал зиму без присыпки лоз, что делают даже в Крыму, и вместе с тем имел высокие товарные показатели. Какие методы применял этот селекционер:

Метод предварительного вегетативного сближения. Однолетний черенок гибридного сеянца рябины (привой) прививается в крону растения другого вида или рода, например к груше (подвой). После 5-6-летнего питания за счет веществ, вырабатываемых подвоем, происходит некоторое изменение, сближение физиологических и биохимических свойств привоя. Во время цветения рябины её цветки опыляют пылью подвоя. При этом осуществляется скрещивание. Метод довольно странный по генетическим понятиям, но ведь в культуре клеток аналогично используют метод «няньки», используя её кондиционирующие среду метаболиты.

Метод посредника применялся Мичуриным при осуществлении гибридизации культурного персика с диким монгольским миндалем бобовником (в целях продвижения персика на север). Поскольку прямое скрещивание указанных форм не удавалось, Мичурин скрестил бобовник с полукультурным персиком Давида. Их гибрид скрещивался с культурным персиком, за что и был назван посредником. Этот метод безоговорочно принят современными селекционерами.

Опыление смесью пыльцы. И. В. Мичурин применял различные варианты смеси пыльцы. Смешивалось небольшое количество пыльцы материнского растения с пылью отцовского. В этом случае своя пыльца тестировалась рыльцем пестика, которое становилось способным воспринять и чужеродную пыльцу. При опылении цветков яблони пылью груши к последней добавляли немного пыльцы яблони. Часть семязпочек оплодотворялась своей пылью, другая часть – грушевой.

Преодолевалась нескрещиваемость в некоторых случаях и при опылении цветков материнского растения смесью пыльцы разных видов без добавления пыльцы своего сорта. Эфирные масла и другие секреты, выделяемые чужой пылью, активно раздражали рыльце материнского растения и способствовали её восприятию. В настоящее время метод широко используется.

И. В. Мичурин показал важность последующего за скрещиванием «воспитания» гибридов. При воспитании развивающегося гибрида Мичурин обращал внимание на состав почвы, метод хранения гибридных семян, частую пересадку, характер и степень питания сеянцев и другие факторы. Влияние на генотип через фенотип – спорный вопрос, но создание необходимых условий для проявления и отбора адаптационных признаков – основа экологического пресса при естественном отборе.

Кроме того, Мичурин широко применял разработанный им метод ментора. Для воспитания в гибридном сеянце желательных качеств сеянец прививается к растению, обладающему этими качествами. Дальнейшее развитие гибрида идет под влиянием веществ, вырабатываемых растением-воспитателем (ментором); у гибрида усиливаются искомые качества. В данном случае в процессе развития

гибридов, как полагал автор, происходит изменение свойств доминантности (очень странно, что работало). Ментором может быть как подвой, так и привой. Таким способом Мичурин вывел два сорта – «Кандиль-китайку» и «Бельфлёр-китайку».

В селекционной работе Мичурин придавал существенное значение отбору, который производился многократно и весьма жёстко. Гибридные семена отбирались по их крупности и округлости, гибриды по конфигурации и толщине листовой пластинки и черешка, форме побега, расположению боковых почек, по зимостойкости и сопротивляемости к грибковым заболеваниям, вредителям и многим другим признакам и, наконец, по качеству плодов.

В настоящее время требования к новым сортам многократно увеличились. необходимо ускорять и сам селекционный процесс и сокращать сроки создания новых сортов. Это правда привело к сужению генотипической изменчивости и прогрессирующему процессу объединения генофонда. Стандартизация сортов, распространение их небольшого числа на больших площадях, ограничение генетического потенциала при внутривидовых скрещиваниях на устойчивость к болезням и вредителям, а также отсутствие в исходном материале резерва полезных генов по ряду хозяйственно ценных признаков в будущем может явиться одним из основных лимитирующих факторов в селекции.

В связи с этим возникает необходимость поисков новых методов расширения генетической изменчивости и создания новых доноров полезных свойств засухоустойчивости, холодостойкости, солевыносливости, устойчивости к болезням и вредителям и т. д.

Эти методы связаны с отдаленной гибридизацией. Однако при отдаленной гибридизации возникают определенные трудности, связанные с нескрещиваемостью исходных видов, нежизнеспособностью гибридных семян, наконец, стерильностью получившихся гибридов. В решении этих проблем большое место отводится методам сельскохозяйственной биотехнологии.

Преодоление прогамной несовместимости. Физиологическая несовместимость партнеров при отдалённом скрещивании, проявляющаяся на этапе до оплодотворения, может зависеть от следующих причин:

1) отсутствия биохимического узнавания пыльцы отцовского растения рыльцем пестика материнского (секрети веществ, стимулирующих прорастание пыльцы, не происходит). Можно использовать подход Мичурина;

2) различий партнеров по длине столбика пестика и пыльцевой трубки (гетеростилия);

3) блокирования роста трубки на разных этапах её развития от рыльца пестика до пыльцевхода семязпочки вследствие тканевой несовместимости партнеров.

Способом преодоления несовместимости на этапе до оплодотворения (прогамной несовместимости) является оплодотворение *in vitro* или плацентарное оплодотворение.

Существуют два варианта метода:

1) столбик пестика материнского растения, кастрированного за 2-3 дня до цветения, в стерильных условиях укорачивают или срезают полностью, а завязь помещают на питательную среду;

2) завязи вскрывают и на питательную среду переносят кусочки плаценты с семязпочками готовыми к оплодотворению. В день цветения бутоны отцовского растения поверхностно стерилизуют, пыльники асептически извлекают, переносят в бюкс или чашку Петри, подсушивают для получения сыпучей пыльцы. Готовую пыльцу по первому варианту в стерильных условиях наносят на срез завязи, в другом случае переносят на питательную среду вблизи плаценты с семязпочками или прямо на ткани плаценты. Оплодотворённые семязпочки в отличие от неоплодотворённых быстро увеличиваются в размерах. Часто при плацентарном оплодотворении зародыш не переходит в состояние покоя и проростки появляются здесь же *in vitro*, что ускоряет процесс получения гибридов.

#### Преодоление постгамной несовместимости. Эмбриокультура.

Несовместимость таксономически отдалённых партнеров проявляется и на других этапах получения гибридов на физиологическом или генетическом уровне. Несовместимость партнеров в этом случае наблюдается уже после оплодотворения, поэтому такая несовместимость называется постгамной. Остановки в развитии и росте гибридных зародышей часто имеют физиологические причины и связаны либо с несоответствием в темпах развития зародыша и эндосперма, либо с непригодностью (токсичностью) метаболитов тканей материнского растения для питания зародыша. В таких случаях культура изолированных семязпочек и зародышей на искусственных средах может преодолеть препятствие. Во втором случае широко используют сорбенты и антиоксиданты в среде культивирования.

Культура изолированных зародышей широко используется при гибридизации плодовых растений, в межвидовой гибридизации хлопчатника, лука, томатов, при межвидовых скрещиваниях ячменя с рожью и пшеницей. В некоторых случаях метод модифицируется введением промежуточного этапа получения гибридного каллуса и растений-регенерантов на его основе. Этот подход впервые в мире был использован в работе Терновского и др. (1972) для получения гибридных растений табака при межвидовом скрещивании. В результате этого скрещивания удалось получить гибридные семена, но проростки гибли на стадии семядолей из-за отмирания первичного корня и остановки роста. Индукция образования каллусной ткани из семядолей и гипокотилей гибридных проростков, а затем органогенез позволили получить амфигаплоидные растения. Дальнейшая обработка колхицином восстановило фертильность, от амфидиплоидов получили второе поколение, которое затем скрещивали с сортами культурного табака.

Гибридная каллусная ткань в настоящее время успешно используется не только для клонирования амфигаплоидных зародышей, но и для получения вариантных форм. Так, из одного исходного гибридного зародыша, возникшего при скрещивании ячменя и пшеницы, было получено более 100 регенерантов. У половины из них отмечены различия по морфологии и окраске колоса, длине

остей и другим признакам, что свидетельствует об их соматклональной изменчивости.

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. В чём отличие прогамной и постгамной несовместимости?
2. Каким образом можно преодолеть прогамную несовместимость?
3. Какие методы Мичурина имеют значение для современного этапа развития селекции?
4. Зачем получают амфигаплоидные растения?
5. Как проводят искусственное оплодотворение *in vitro*?

### **3.9. Получение гаплоидов *in vitro***

Культуры изолированных зародышей представляют большой интерес для селекционеров, поскольку возможно:

- 1) получение гибридных зародышей, которые в условиях целостного организма не смогли бы выжить вследствие элиминирующего действия материнского растения;
- 2) выведение зародыша из состояния покоя;
- 3) использование метода для определения жизнеспособности семян;
- 4) исследование потребностей развивающегося зародыша на питательных средах (модельные условия).

Однако при изолировании зародыша в ранние фазы развития, трудно подобрать питательную среду, которая бы заменила комплекс веществ, поступающий к нему из эндосперма и тканей завязи. Так, зрелые или почти зрелые зародыши способны к росту на минеральных питательных средах с добавлением сахарозы. Более молодые нуждаются, кроме того, в аминокислотах, витаминах и фитогормонах, причем состав и соотношение этих физиологически активных веществ для разных этапов эмбриогенеза различен. Наиболее сложный комплекс веществ необходим при изолировании ещё недифференцированных зародышей вскоре после оплодотворения. Их удастся культивировать *in vitro*, как правило, только при введении в состав питательной среды кокосового молока, жидкого эндосперма каштана или грецкого ореха. Эти трудности также удастся обойти путем культивирования семяпочек с кусочком ткани, к которой они прикреплены. Иногда на питательную среду помещают целиком кусочек завязи с семяпочками; в таких случаях удаётся довести до созревания двухклеточный предзародыш или даже зиготу.

Культура изолированных семяпочек является полезным методом сохранения важного для селекции материала при повреждении растений патогенами или экстремальными погодными условиями. Такое применение было описано для риса, подсолнечника и картофеля. Вместе с тем эмбриокультура может быть использована для ускорения прохождения жизненного цикла растений, что может сократить длительность селекционного процесса. Так, обнаружено, что время генерации озимой пшеницы можно сократить примерно на 40 дней, если 16-20-дневные изолированные зародыши

яровизировать *in vitro*. Кроме того, для ускорения селекционного процесса могут быть использованы индукция цветения в культурах верхушек побегов, прямое формирование цветочных почек на эксплантах.

Культура завязи нередко позволяет достичь желаемого результата даже в тех случаях, когда попытки культивирования зародышей и семязпочек оказались безуспешными. Благоприятное действие на культивируемые ткани оказывают, по-видимому, плацента и стенка завязи. Росту завязи *in vitro* способствует также сохранение чашечки. Предполагают, что определенные части цветка – чешуи, околоцветник, чашелистики – оказывают стимулирующее воздействие на культуру, переводя неорганические нитраты в аммоний, т. е. легко усваиваемую форму азота.

Потребности изолированной завязи в питательных веществах изменяются в зависимости от того, в какой момент времени она была перенесена в условия *in vitro*. Завязи, изолированные через несколько дней после опыления, достаточно хорошо растут на простой питательной среде, содержащей сахарозу и минеральные соли. Неопыленные завязи в культуре обычно не развиваются, хотя иногда удается достичь образования партенокарпических плодов. Судьба опыленных завязей в культуре определяется временем, когда была проведена инокуляция.

#### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. Из каких органов получают гаплоидные культуры растений?*
- 2. Какой возраст для введения в культуру *in vitro* в этом методе является оптимальным?*
- 3. Как поддерживают рост гаплоидных культур от молодых эксплантов?*
- 4. Какие цели преследуют, изучая гаплоидные культуры?*

#### **3.10. Манипуляции с соматическими клетками. Пассирование.**

Цель этапа – поддержание коллекции культур, а также получение максимального количества биомассы за один пассаж (размножение).

Пассирование каллуса. Для того чтобы не происходило старение, утрата способности к делению и отмирание каллусных клеток, первичный каллус, возникающий на эксплантах, через 4-6 недель (в зависимости от активности роста и накопления полифенолов) переносят на свежую питательную среду. Эта операция получила название «пассирование». При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение десятков лет. Каждый пассаж нумеруют начиная с «нулевого» этапа введения в культуру эксплантов.

Пассирование суспензий. Длительность первого цикла выращивания суспензии зависит от вида растения, состава питательной среды, условий выращивания, но обычно не превышает четырех недель. При пассировании срок культивирования уменьшается до двух недель. За это время часть клеток отмирает, происходит интенсивное деление живых клеток. Чаще всего сигналом для очередной пересадки является появление на поверхности колбы ободка из живых клеток. Длительность каждого пассажа составляет 14-16 дней.

Основными критериями роста суспензионной культуры является: увеличение (прирост) числа клеток, а также их сухой и сырой массы. Степень агрегатности клеток: агрегаты должны содержать не более 10-12 клеток (в идеале для промышленных биотехнологий). Для того чтобы избавиться от крупных агрегатов, суспензии фильтруют через марлевые, нейлоновые или металлические фильтры, что позволяет, кроме того, освободиться от остатков экспланта или плотных кусков исходной каллусной ткани.

Влияние продолжительности пассирования на тотипотентность. К сожалению, способность клеток к обратимому переходу дифференциация/дифференциация уменьшается при пассировании. Причин генетической нестабильности культивируемых клеток несколько. Прежде всего это генетическая неоднородность исходного материала (гетерогенность экспланта). У многих растений дифференцированные ткани характеризуются наличием клеток разной ploидности и, лишь активно пролиферирующие в течение онтогенеза ткани, такие как верхушечные меристемы, камбий и другие остаются всегда диплоидными. Второй причиной может быть накопление при длительном пассировании культур генетических изменений, в том числе приводящих к неравномерному изменению ploидности. Нарушение коррелятивных связей при изолировании участков тканей растений и помещении их на питательную среду также приводит к генетической нестабильности клеток. Подобные результаты могут быть связаны и с влиянием на генетический аппарат клетки входящих в состав питательных сред фитогормонов, из-за чего использование некоторых гормонов нежелательно (2,4-Д – наиболее активный мутаген). В качестве гормонов в питательные среды для каллусообразования обязательно входят ауксины и цитокинины. Цитокинины, в частности кинетин, способствуют полиплоидизации клеток.

#### ***Вопросы для самоконтроля:***

1. *Что такое продолжительность пассажа in vitro?*
2. *Сколько дней продолжается 1 пассаж для суспензионной культуры?*
3. *Как продолжительность пассирования влияет на физиологию и генетику клеток?*
4. *На чём основан исходный уровень гетерогенности каллусной культуры?*

### **3.11. Культура изолированных протопластов**

Изолированный протопласт – часть клетки, которая остается после удаления клеточной стенки (как правило, ферментативным способом), для чего используют препараты целлюлаз и пектиназ. Источником ферментов служат грибы: *Myrothecium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* и вещества пищеварительного сока улитки *Helix pomatia*. В зависимости от происхождения растения и взятой для изоляции протопластов ткани подбирается состав ферментной смеси. Желательно предварительно проводить подбор концентрации осмотика в среде методом плазмолиза. Для выделения протопластов используют разные ткани растения, а также каллусные и суспензионные культуры. С целью получения

большого числа протопластов двудольных используют мезофилл молодых листьев. Общий принцип изоляции и культивирования протопластов заключается в следующем (Рис.4). Листья молодых растений стерилизуют в течение 1 мин. в 70° спирте, а затем в течение 20 мин. в 2% растворе гипохлорида натрия. После промывания стерильной водой удаляют нижний эпидермис и нарезают на мелкие части. Нарезанные фрагменты листьев помещают в чашки Петри в смесь ферментов. Например, для табака используют смесь 0,5 % пектиназы, 2% целлюлазы, 13% сорбита с рН 5,4. Инкубируют в темноте или при рассеянном свете до 15-18 часов при 25° С. После этого протопласты отфильтровывают от непереваренных частей листа через капроновую ткань и отмывают от ферментов при трёхкратном осаждении при центрифугировании (170 g – 2 мин).

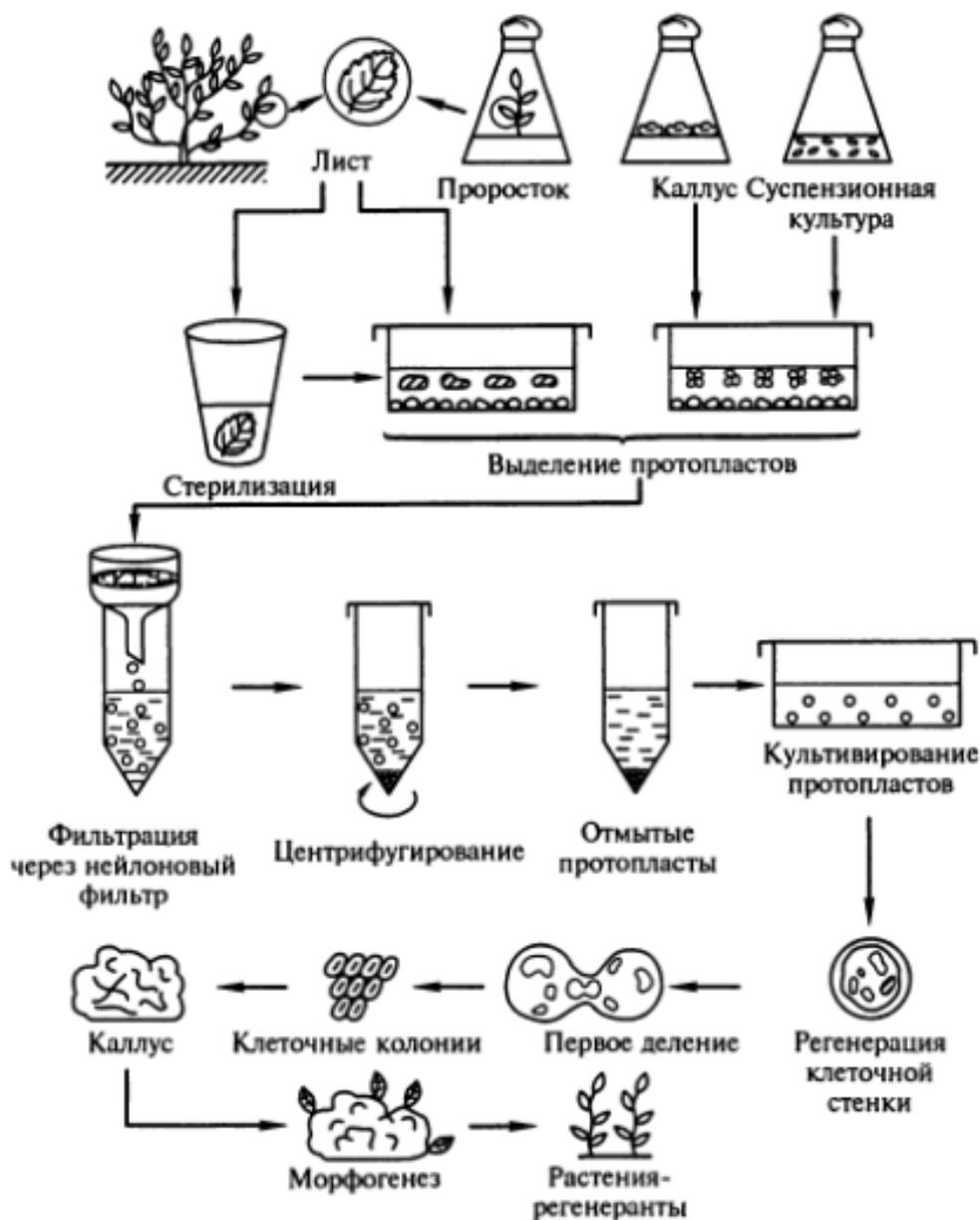


Рис. 4. Схема получения и культивирования протопластов растений (по В.С. Шевелуха, 2008)

Отмытые протопласты ресуспензируют в культуральной среде, содержащей 13% маннита примерно до концентрации  $4 \times 10^5$  протопластов в миллилитре. Плотность протопластов должна быть оптимальной для каждой культуры. Суспензию протопластов переносят в чашки Петри с жидкой или агаризованной средой. Для поддержания стабильности протопластов необходимо обеспечить в среде соответствующий уровень осмотического давления. В качестве осмотиков используют сахара: глюкозу, маннит, сорбит, ксилозу, сахарозу или их сочетания. Культивирование проводят при 26-28°C в темноте или при рассеянном свете. Образовавшиеся клеточные колонии переносят на поверхность агаризованной среды и культивируют на свету. Для культивирования протопластов могут быть использованы модификации сред Мурасиге-Скуга или Гамборга «В-5» с добавлением комплекса витаминов и фитогормонов. После регенерации клеточной стенки и развития клеточных колоний осмотики из среды исключают. Другой важный фактор успешного культивирования протопластов – плотность их посева, которая может составлять  $10^4$ - $10^5$  протопластов в 1 мл среды.

Использование культуры протопластов. Отсутствие клеточной стенки у протопластов отличает их от целых клеток, протопласты способны поглощать макромолекулы и органеллы. Их используют в качестве реципиентов при трансформации, а также в экспериментах по клеточной селекции и мутагенезу. Изолированные протопласты служат источником для выделения неповрежденных и функционально активных субклеточных и цитоплазматических структур и органелл (хлоропластов, ядер, хромосом). Способность протопластов сливаться друг с другом нашла применение для получения соматических гибридов. Слияние протопластов – метод гибридизации, так называемой парасексуальной или соматической гибридизации. В отличие от обычной, где сливаются половые клетки (гаметы), в качестве родительских при парасексуальной гибридизации используются диплоидные клетки растений. Слияние бывает спонтанным (чаще у протопластов из молодых тканей или суспензионных культур) и индуцированным. Для стимуляции слияния протопластов предложен ряд методов как физических, так и химических.

При физическом способе слияния, разработанном Г. Циммерманом с сотрудниками в 1981 году, протопласты помещают в камеру с неоднородным электрополем. На электродах образуются агрегаты из 2-3 протопластов, либо цепочки из 5-6 штук между электродами. Дополнительный единичный импульс постоянного тока приводит к образованию пор в мембранах, перетеканию цитоплазмы, а так как переменный ток удерживает протопласты вместе некоторое время, протопласты в итоге сливаются. После отключения поля протопласты восстанавливают сферическую форму.

Также для индукции слияния служит метод с использованием высоких концентраций полиэтиленгликоля и кальция в среде (рН 9-11, концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  100-300 мМоль/л), который обеспечивает до 50% слияния. В присутствии полиэтиленгликоля наблюдается сильная адгезия протопластов, а после удаления полиэтиленгликоля и добавления кальция их слияние. Предполагают,

что рН и ионы кальция увеличивают текучесть мембран, что связано с их жидкостно-мозаичной структурой.

Плазмогамия – слияние клеток и объединение двух протопластов, которые приносят два различных ядра в одну клетку. При этом ядра тут же сливаются (кариогамия), но чаще сохраняют самостоятельность в течение определенного времени. Возникшая в результате копуляции клетка имеет два ядра (ди- или гетерокарион).

Гетерокарионы – клетки, содержащие ядра обоих родительских типов. Образовавшиеся гетерокарионы при последующем делении дают начало двум одноядерным клеткам с гибридной цитоплазмой. В 1965 английский ученый Г. Харрис впервые получил гетерокарионы, образованные клетками мыши и человека.

Кариогамия – слияние ядер в одно ядро зиготы. Получившееся при этом ядро содержит двойной (диплоидный) набор хромосом, объединяющий хромосомы родительских ядер.

Регенерация растений из протопластов. При выделении и размножении протопластов применяют среды с добавлением основных макроэлементов, микроэлементов, аминокислот, витаминов, фитогормонов и регуляторов осмотического давления. Содержание веществ подбирают так, чтобы обеспечить оптимальный рост на каждом этапе регенерации.

При инкубации протопластов на твердой среде происходит регенерация клеточных стенок и деление клеток, в результате чего образуются микрокалусы. После пересадки на свежую среду индуцируется образование побегов (морфогенез). На заключительной стадии калусы с побегами длиной около 1 мм переносят на среды для укоренения. Полноценные растения пересаживают в небольшие горшочки с вермикулитом или перлитом.

Культура растительных протопластов имеет не только практическое значение по получению гибридных форм, но и фундаментальное, так как является интересной модельной системой. Исследования по соматической гибридизации растений проводят по трем основным направлениям:

1. изучение и реконструкция плазмагенов (генетический материал, локализованный вне ядра);
2. исследования по гибридизации клеток филогенетически отдаленных видов растений;
3. получение с помощью слияния протопластов соматических гибридов, представляющих практический интерес для селекции.

Основные различия соматической гибридизации от полового скрещивания заключаются в следующем: 1) с помощью половой гибридизации могут скрещиваться только растительные формы с нормальным морфогенезом и гаметогенезом. Презиготическую несовместимость можно преодолеть с помощью метода слияния протопластов. 2) половой процесс ассиметричен, так как женская гамета кроме равного набора ядерного генетического материала привносит в зиготу цитоплазматическую наследственность. Продукты же слияния протопластов являются симметричными гибридами, содержащими в равных долях хромосомный набор и гены цитоплазматических

структур от обоих родителей. 3) половая гибридизация возможна только между филогенетически близкими видами растений. При соматической гибридизации возможно получение гибридов филогенетически отдаленных форм, которые обычным путем получить невозможно. Однако не всегда в таких случаях кариогамия следует за плазмогамией. Могут образовываться гетерокарионы, распадающиеся на одноядерные клетки с гибридной цитоплазмой.

Слияние протопластов начинается с установления контакта (адгезии) между протопластами соседних протопластов. Одновременно происходит изменение свойств мембран, приводящие к их слиянию. Расширение локальных цитоплазматических мостиков приводит к объединению цитоплазм с образованием гибридных клеток – гибридов.

Для формирования из гибридных протопластов растений, протопласты культивируют, чтобы они восстановили клеточную стенку, прогрессивно делились с образованием каллуса, из которого впоследствии может регенерировать целое растение. Количество видов, для которых удалось провести весь цикл «Растение – Протопласты – Каллус – Растение» постоянно растёт.

Одним из важнейших моментов при проведении соматической гибридизации является отделение образовавшихся гибридных клеток от родительских. Селекция парасексуальных гибридов может проводиться либо на клеточном уровне, либо на стадии регенерации растений. Селекция на стадии регенерации растений имеет определённые сложности: 1) нет уверенности, что все гибридные растения не являются потомками единственной гибридной клетки; 2) необходимо длительное время для селекции регенерантов; 3) большая трудоёмкость метода. В связи с этим, разрабатываются способы отбора соматических гибридов на клеточном уровне. Наиболее распространёнными являются методы: 1) механической изоляции; 2) генетической комплементации; 3) физиологической комплементации; 4) физического обогащения.

В популяции растительных клеток *in vitro* после их слияния могут иметь место различные нежелательные генетические изменения (полиплоидия, хромосомные перестройки, различные мутации), приводящие к появлению форм, фенотипически сходных с гибридными. Кроме того, агрегация исходных родительских клеток может привести к образованию химерных тканей. В связи с этим, отобранные формы соматических гибридов должны подвергаться дополнительному анализу для подтверждения их гибридности. Гибридологический анализ позволяет проводить оценку потомства F<sub>1</sub> после самоопыления. Цитогенетический анализ основан на изучении числа и морфологии хромосом гибридных и родительских клеток. Более информативен метод дифференциального окрашивания хромосом. Цитогенетический анализ наиболее доказателен для дальнеродственных комбинаций – межсемейственных и межтрибных.

Фенотипическая изменчивость, наблюдаемая у соматических гибридов, является отражением тех генетических явлений, которые происходят до регенерации и указывают на следующие 4 источника изменчивости:

- 1) ядерная несовместимость;
- 2) межгеномная митотическая рекомбинация;
- 3) соматическая изменчивость;
- 4) органоидное расщепление.

Существуют следующие ограничения, мешающие полному успеху метода соматической гибридизации: 1) применение этого метода требует эффективной регенерации растений из протопластов; 2) соматические гибриды порой не поддаются половому размножению и являются стерильными; 3) для того, чтобы перенести полезные гены из диких видов в культурные, необходимо осуществить межгеномную рекомбинацию или хромосомные замещения между двумя видами; 4) при слиянии протопластов получаются растения с суммированным числом хромосом. Однако быстрый прогресс в совершенствовании методов клеточной инженерии позволяет надеяться, что соматическая гибридизация как новая биотехнология станет основной в селекции для получения жизнеспособных гибридов нескрещивающихся видов растений.

### ***Вопросы для самоконтроля:***

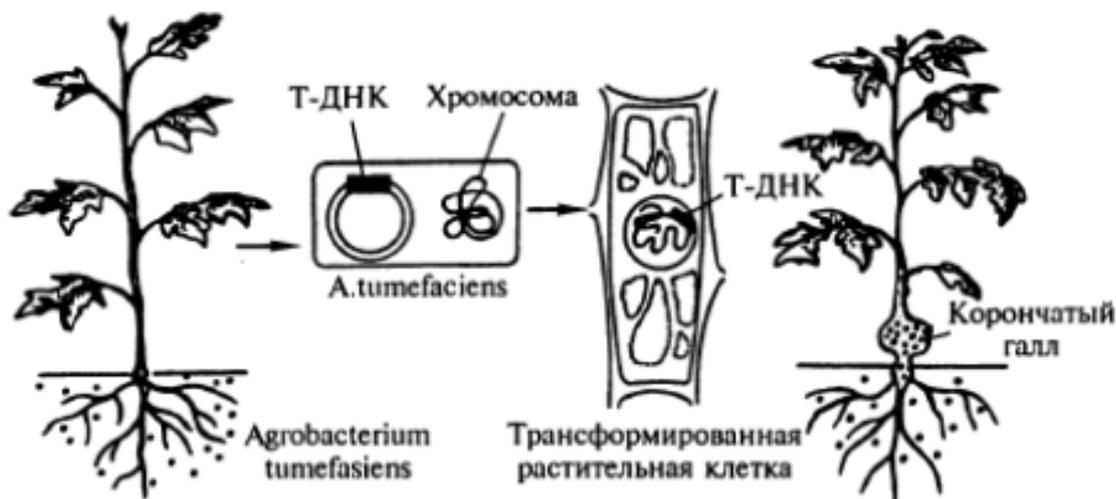
1. *В чём отличие гетерокарионов от настоящих гибридов?*
2. *Какие методы индуцированного слияния протопластов существуют?*
3. *На чём основано применение электропорации?*
4. *Как действует полиэтиленгликоль на протопласты растений?*
5. *В каких условиях проходит выделение протопластов?*
6. *Какие компоненты среды для выделения протопластов наиболее важны и почему?*

### **3.12. Генетические векторы**

Вектор – молекула ДНК или РНК, состоящая из двух компонентов: векторной части (носителя) и клонируемого чужеродного гена. Функция вектора – перенести выбранную последовательность в клетку-реципиент, встроить её в геном, обеспечить стабильную экспрессию введенного гена. Репортёрный фрагмент позволяет идентифицировать трансформированные клетки. Существуют ограничения по размеру вводимого фрагмента. Таким образом, он должен быть небольшим, способным к репликации в клетке-хозяине, многократному копированию (амплификации), экспрессии соответствующего гена (содержать соответствующие регуляторные последовательности). Переносимый фрагмент также должен иметь маркерный ген, позволяющий идентифицировать гибридные клетки для их эффективной селекции на ранних этапах, но первоочередная задача – способность внедряться в клетку соответствующего организма.

Плазмиды – внехромосомный генетический материал. Представляет собой кольцевую, двунитевую молекулу ДНК, гены которой кодируют дополнительные свойства, придавая селективные преимущества клеткам. Ti-плазмиды – это естественные векторы для генов, обладающие всеми

функциями, необходимыми для переноса, стабильного включения и экспрессии генетической информации в растениях (Рис.5.). Они имеют широкий круг хозяев. В бактериальных клетках Тi-плазмиды реплицируются автономно. Эти плазмиды различаются по типу кодируемых опинов — специфических аминокислот, которые используются бактериями в качестве источников азота и углерода. Обычно встречаются плазмиды, кодирующие два типа опинов – либо октопин (октопиновая плазида), либо нопалин (нопалиновая плазида).



**Рис.5. Интеграция Т-ДНК в хромосому растений и образование корончатой опухоли (по Э.С. Пирузян, 1988)**

После заражения часть Тi-плазмиды встраивается в хромосому растительной клетки. *A. tumefaciens* заставляет клетку-хозяина таким способом изменять метаболизм, синтезируя вещества, необходимые для бактерий. Это свойство определило создание на основе Тi-плазмиды векторов, доставляющих необходимые гены в клетку. Участок Тi-плазмиды, встраиваемый в хромосому, называется Т-областью в бактерии и Т-ДНК в клетке растения (Рис. 6 и 7.). Т-область ограничена прямыми повторами, и любая ДНК, вставленная между ними, будет принята за Т-область и перенесена в растительную клетку. Т-область включает примерно 10% Тi-плазмиды и содержит гены, отвечающие за индукцию опухоли, синтез опинов и подавление дифференцировки (гормоннезависимый рост клеток). Важно отметить, что все гены, ответственные за перенос и интеграцию генов Т-области, находятся не в ней самой, а рядом в *vir*-области.

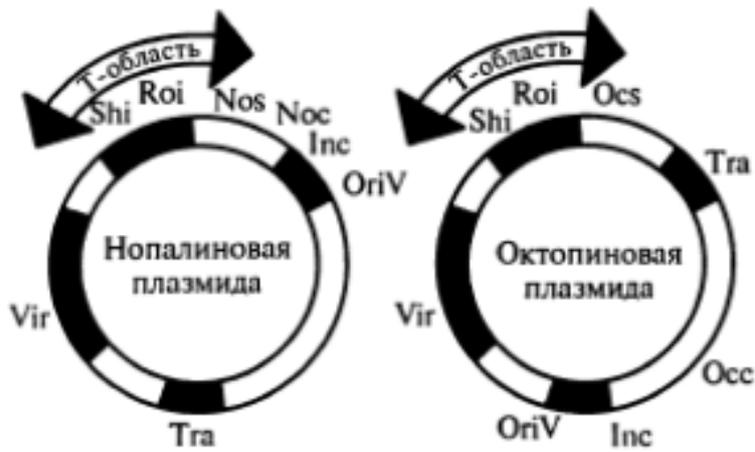


Рис.6. Структура *Ti*-плазмиды

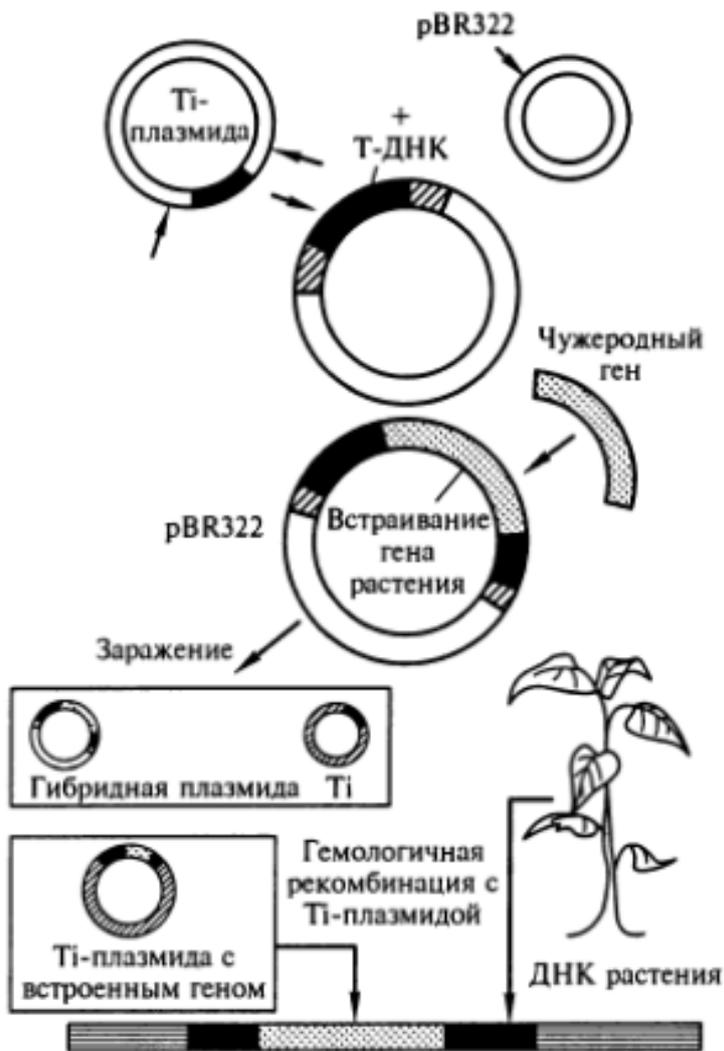


Рис.7. Использование *Ti*-плазмиды в качестве вектора для переноса генов в клетки растений (по Э.С. Пирузян, 1988)

Разработаны два метода для введения Тi-плазмид с нужными генами в растения.

Первый метод – метод «промежуточных векторов» – основан на использовании плазмиды кишечной палочки pBR 322. Т-ДНК вырезают из Тi-плазмиды с помощью рестриктаз и встраивают в плазмиду pBR 322 для клонирования в *E. coli* (Рис.8.). Бактерии, содержащие плазмиду с Т-ДНК, размножают, после чего эту плазмиду выделяют. Затем в клонированную Т-ДНК с использованием рестриктаз встраивают нужный ген. Эту рекомбинантную молекулу, содержащую Т-ДНК со встроенным геном, снова клонируют в кишечной палочке. Затем с помощью конъюгации вводят в клетки агробактерии. В результате этого Т-ДНК со встроенным геном включается в нативную Тi-плазмиду, замещая нормальную ДНК. Получаются клетки *A. tumefaciens*, несущие изменённые Тi-плазмиды с нужными генами. Их перенос в клетки растения осуществляется обычным способом, характерным для агробактерий.

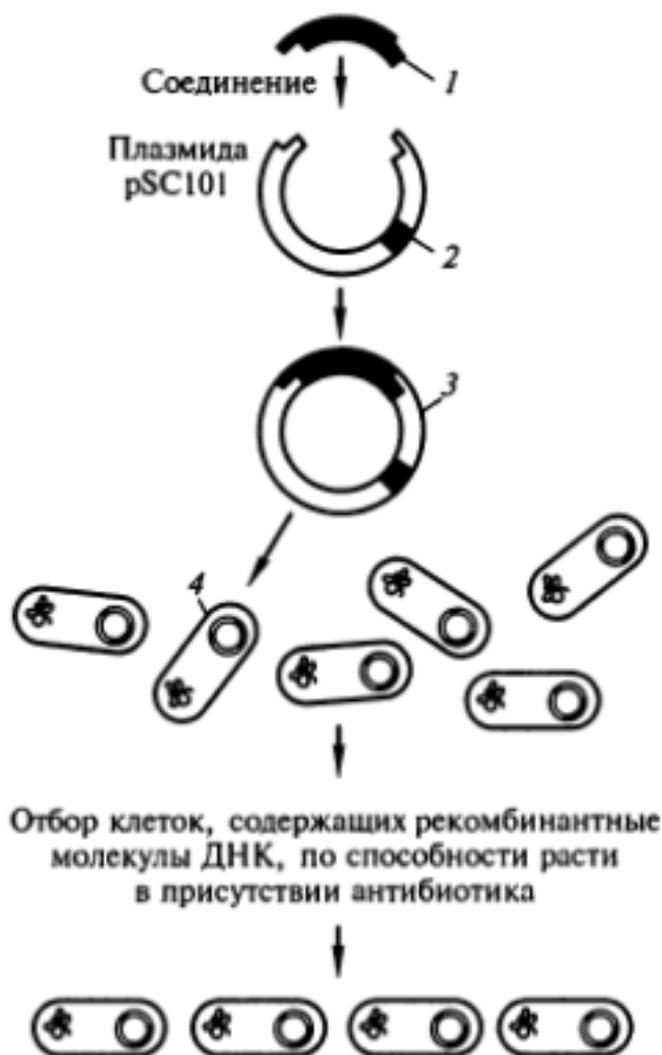
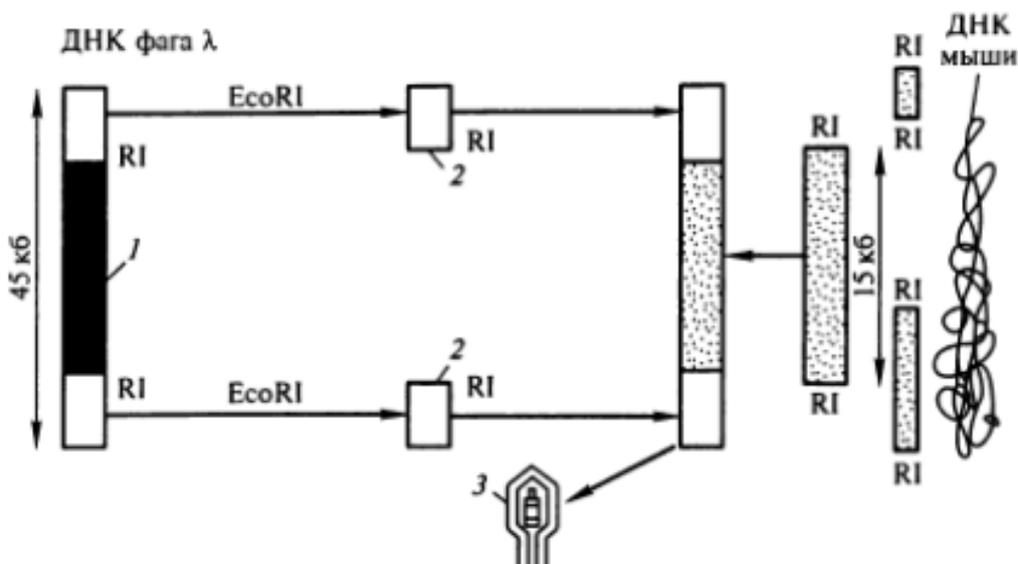


Рис. 8 Клонирование фрагментов ДНК с помощью плазмид (по В.С. Шевелуха, 2008):

1. Встраиваемая гетерогенная ДНК;
- 2) Маркёр устойчивости к антибиотику;
- 3) Рекомбинантная молекула ДНК;
- 4) Введение в бактериальные клетки

Второй метод основан на создании системы бинарных (двойных) векторов. Коинтегративная векторная система – двухплазмидная система, используемая для переноса клонированных генов в растительные клетки. Т-ДНК вырезают из Ti-плазмиды с помощью рестриктаз и встраивают в плазмиду pBR 322 для клонирования в *E. coli*. Бактерии, содержащие плазмиду с Т-ДНК, размножают, после чего её выделяют. Затем в клонированную Т-ДНК с использованием рестриктаз встраивают нужный ген. Эту рекомбинантную молекулу, содержащую Т-ДНК со встроенным геном, снова клонируют в *E. coli* и вводят в клетки агробактерии, несущие полную Ti-плазмиду. Между Т-сегментами нативной Ti-плазмиды и промежуточного вектора происходит гомологичная рекомбинация. В результате этого Т-ДНК со встроенным геном включается в нативную Ti-плазмиду, замещая участок нормальной ДНК. Получаются клетки *A. tumefaciens*, несущие Ti-плазмиды со встроенными в Т-сегмент нужными генами. Далее их перенос в клетки растения осуществляется обычным способом, характерным для агробактерий.

Кроме генов ауксина и цитокинина Т-ДНК каждой специфической Ti-плазмиды содержит ген, детерминирующий синтез соединения из класса опинов. Опины – это уникальные продукты конденсации amino- и кетокислот или аминокислот и сахаров. Например, при конденсации аргинина и пировиноградной кислоты образуется октопин. Опины синтезируются в корончатом галле, а затем секретируются. Они могут использоваться как источник углерода (а иногда и как источник азота) *Agrobacterium tumefaciens* или *A. rhizogenes*. Последняя широко используется в биотехнологии культуры «бородатых корней» лекарственных растений. Большинство других исследованных почвенных микроорганизмов не способны использовать опины как источник углерода.



**Рис. 9. Клонирование ДНК в векторе на основе бактериофага  $\lambda$  (по В.С. Шевелуха, 2008):**

1) Фрагмент ДНК фага, не существенный для репликации; 2) Фрагменты ДНК с генами репликации и упаковки фага; 3) Бактериофаг, содержащий чужеродную ДНК

Для работы с более крупными фрагментами ДНК (5-25 тпн) разработаны векторы на основе бактериофагов (Рис. 9.). Трансформирующая активность фагов в 1000 раз выше, чем у плазмид. После проникновения фага в клетку бактерии развитие фага может идти по двум путям. Если реализуется литический цикл, то фаг начинает интенсивно размножаться и примерно через 20 мин клетка разрушается (лизирована) с высвобождением новых фаговых частиц. При другом пути (лизогенном) фаг включается в хромосому бактерии как профаг и реплицируется в клетке вместе с бактериальной хромосомой. При неблагоприятных условиях (недостаток питательных веществ и т.д.) интегрированная фаговая ДНК высвобождается и запускается литический цикл развития. В природе основной приток генов в бактерии за счёт трансдукции обусловлен лизогенными умеренными фагами. В середине молекулы ДНК фага  $\lambda$  (длиной около 50 тпн) расположен участок хромосомы (около 15 тпн), который не является необходимым для литического развития бактериофага. Его можно заменить на любой фрагмент ДНК аналогичного размера и осуществить клонирование фрагментов путём размножения рекомбинантного бактериофага.

Различают простые и сложные фаги. Простые имеют форму шестигранников или нитей. Сложные фаги имеют головку, воротничок и хвостовую часть. В центре головки располагается нуклеиновая кислота, а вокруг неё белковая оболочка – капсид. Хвостовая часть представляет цилиндрический футляр, напоминающий иглу шприца. В нижней части хвостового отростка располагается шестиугольная базальная пластинка с шипами и фибриллами, с помощью которой бактериофаг прикрепляется к бактерии. Здесь же находятся ферменты лизоцим и гиалуронидаза, расщепляющие оболочку бактериальной клетки.

Векторы на основе ДНК-содержащих вирусов растений обладают рядом преимуществ по сравнению с плазмидными векторными системами:

- малый размер генома, что позволяет легко манипулировать вирусной ДНК;
- высокая копияность вирусной ДНК в клетках зараженных растений;
- наличие сильных промоторов, которые могут обеспечить эффективную экспрессию чужеродных генов.

В генетической инженерии растений наиболее перспективным в качестве вектора считается вирус мозаики цветной капусты, поражающий в основном растения семейства крестоцветных. Этот вирус обладает всеми преимуществами векторов для растений. Вводят его в растения путем втирания в листья. Инфицирование небольшого числа клеток приводит к заражению всего растения, так как вирус быстро распространяется. Использование 1-5 мкг

ДНК является достаточным для почти 100% инфицирования одного растения, что значительно выше, чем при агробактериальном заражении.

CaMV – растительный вирус из группы калимовирусов, содержащий двунигчатую кольцевую молекулу ДНК размером около 8 тпн и инфицирующий через насекомых цветную капусту, другие крестоцветные и некоторые растения из семейства Solonaceae. ДНК этого вируса несёт два промотора – 19S и 35S, которые используются при конструировании векторов. Особенно широкое распространение получил сильный 35S CaMV-промотор, обеспечивающий конститутивную экспрессию прилежащих генов.

Однако вирусы, в том числе и вирус мозаики цветной капусты, имеют ряд недостатков:

- не интегрируются с ДНК растения;
- патогенны;
- имеют небольшую ёмкость (0,8-1 тпн) и ограниченный круг хозяев.

Транспозоны – сегменты ДНК, которые контролируют собственную транспозицию (перемещение) из одного сайта ДНК в другой путём вырезания из исходного сайта и внедрения в новый сайт хромосомы или плазмиды. Механизм перемещения фрагментов ДНК по геному до конца не выяснен. ДНК переносится ферментом транспозазой. Фермент кодирует последовательность длиной около 20 нуклеотидов в середине транспозона. Он специфически взаимодействует с концевыми инвертированными повторами мобильного элемента и может вырезать его из хромосомы. Вырезание может происходить точно – с восстановлением исходной структуры участка ДНК, и неточно, то есть с делециями и вставками от одного до нескольких нуклеотидов. Это приводит к появлению стабильных мутаций и является одним из механизмов создания новых последовательностей ДНК. Перенос генов при помощи транспозонов имеет большие преимущества, так как он происходит с высокой частотой и не влечет значительных перестроек интегрируемой ДНК. Кроме того, этим методом можно переносить достаточно большие фрагменты ДНК.

#### ***Вопросы для самоконтроля:***

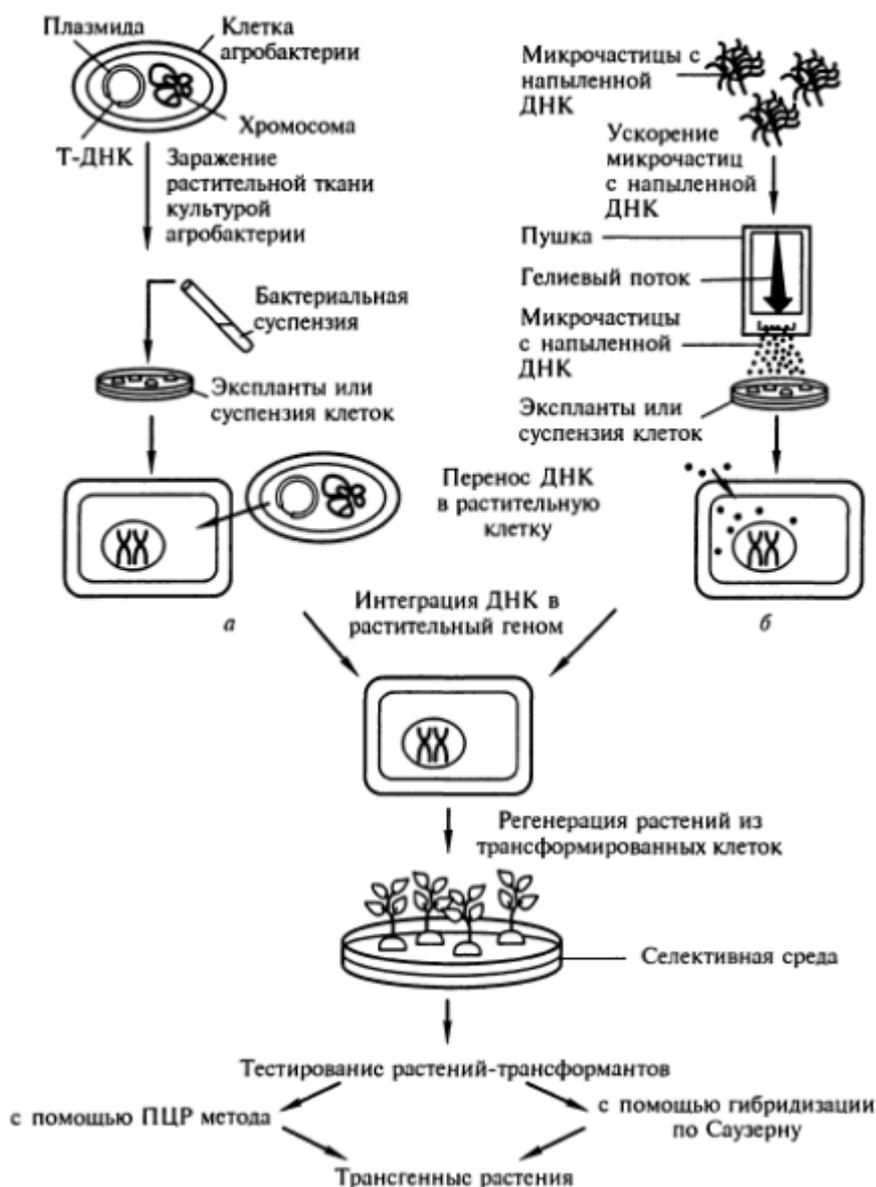
- 1. Какое принципиальное строение имеет генетический вектор?*
- 2. Какого происхождения бывают векторы трансформации растений?*
- 3. Что такое транспозоны, какова их структура?*
- 4. Какие преимущества и недостатки имеют плазмидные и фаговые вектора?*
- 5. Зачем нужны опины трансформированным клеткам растений?*

### **3.13. Методы трансформации растительных клеток**

Метод кокультивации с агробактерией. В зависимости от цели эксперимента и степени изученности объекта возможно несколько способов трансформации растительных клеток агробактериями и последующей

регенерации из них целых растений. Метод переноса чужеродных генов в растения с помощью агробактерий не является универсальным. Основным недостатком является ограничение по кругу хозяев. Метод кокультивации с агробактерией является одним из самых распространённых методов получения трансгенных двудольных растений (Рис. 10). Методика кокультивации может рассматриваться как индукция опухолей в искусственных условиях – вирулентные агробактерии временно культивируют с протопластами. Если агробактерии добавляются к свежесыведенным или однодневным протопластам, не наблюдается ни присоединения бактерий, ни трансформации. Существенным условием для трансформации является наличие вновь образуемых клеточных стенок у 3-дневных протопластов. Когда протопласты только что регенерировали клеточную стенку и начали делиться, культуру заражают агробактериями. После периода кокультивации (более суток), в течение которого наступает агрегация протопластов с бактериями, свободные бактерии удаляют при отмывании питательной средой. Далее растительные клетки культивируются на среде с добавлением гормонов, а через 3-4 недели небольшие колонии высевают на безгормональную среду. На ней выживают только колонии трансформированных клеток.

## ПОЛУЧЕНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ



**Рис. 10. Схема получения трансгенных растений (по В.С. Шевелуха, 2008):**  
а) кокультивация с агробактерией; б) метод биобалистики

Так были получены генетически изменённые растения-регенеранты табака и петунии. Этот метод даёт возможность существенно расширить круг хозяев агробактерий, включая злаковые. Эффективность кокультивирования может быть повышена применением индукторов слияния клеток (ПЭГ, кальций и др.).

Электропорация основана на том, что импульсы высокого напряжения обратимо увеличивают проницаемость биомембран.

Основным условием для широкого применения методов прямой трансформации протопластов является наличие надежных, хорошо разработанных систем регенерации полноценных растений в культуре *in vitro*. При использовании этого метода фрагменты экзогенной ДНК поступают в

протопласты через поры в липидной оболочке, образованные действием короткого электрического импульса. Через среду пропускают высоковольтные импульсы (напряжение 200-350 В, длительность импульса 54 мс), приводящие к образованию пор (электропробой) в цитоплазматической мембране, время существования и размер которых достаточны, чтобы такие макромолекулы как ДНК могли из внешней среды войти в клетку под действием осмоса. При этом объем клетки увеличивается. Образование таких пор обратимо при условии, что сила приложенного электрического поля не превышает некоторого порогового значения. В противном случае, наступает массовая гибель клеток. Электропорация – наиболее простой, эффективный и воспроизводимый метод введения молекул ДНК в клетки.

Использование полиэтиленгликоля (ПЭГ) для трансформации протопластов основано на его способности стимулировать в присутствии двухвалентных катионов преципитацию ДНК на поверхности мембраны с последующим поглощением фрагментов экзогенной ДНК посредством эндоцитоза.

Микроинъекция ДНК стала возможной с появлением прибора для изготовления микропипеток диаметром 0.1-0.5 микрона и микроманипулятора. Метод был разработан в начале 70-х годов Андерсоном и Диакумаком. В принципе, при наличии хорошего оборудования можно за 1 час инъецировать 500-1000 клеток, причём в лучших экспериментах у 50% клеток наблюдается стабильная интеграция и экспрессия введённых генов. Преимущество описываемого метода заключается также в том, что он позволяет вводить любую ДНК в любые клетки, и для сохранения в клетках введенного гена не требуется никакого селективного давления.

Метод биобаллистической (или биолистической) трансформации является одним из самых эффективных на сегодняшний день методов, особенно для однодольных растений (Рис. 10). На мельчайшие частички вольфрама, диаметром 0,6—1,2 мкм, напыляется ДНК. Вольфрамовые частички, несущие ДНК, наносятся на целлофановую подложку и помещаются внутрь баллистической пушки. Каллус или суспензия клеток в чашке Петри с агаризированной средой помещаются под баллистическую пушку на расстоянии 10-15 см. В пушке вакуумным насосом уменьшают давление до 0,1 атм. В момент сбрасывания давления вольфрамовые частички с огромной скоростью выбрасываются из пушки и, разрывая клеточные стенки, входят в цитоплазму и ядра клеток. Обычно клетки, располагающиеся непосредственно по центру (обстрел по прямой наводке), погибают из-за значительных повреждений, в то время как в 0,6-1 см от центра располагается зона наиболее удачного воздействия (поражение «шрапнелью»). Далее клетки осторожно переносят на среду для дальнейшего культивирования и регенерации.

С помощью биолистической пушки были трансформированы однодольные растения, такие как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. При этом получены стабильные растения-трансформанты. Кроме того, биолистическая трансформация применяется для прямого переноса ДНК в эмбрионную пыльцу и дальнейшего получения трансгенных растений. В настоящее время

этим методом была проведена трансформация растений табака и после регенерации гаплоидных растений получены стабильные трансформанты.

Метод вакуумной инфильтрации впервые был использован для трансформации арабидопсиса. Для этого 3-4 недельные растения верхушечной меристемой погружали в концентрированную суспензию агробактерий и помещали в вакуумную камеру на 20 мин. Инфильтрация растительных тканей в вакууме способствовала проникновению агробактерий в межклеточные пространства. Эффективность трансформации зависит от возраста растений (использование очень молодых растений приводит к снижению эффективности трансформации) и от концентрации бактериальных клеток в суспензии. Данный метод трансформации не требует использования культуры клеток и позволяет значительно расширить круг потенциальных объектов трансформации.

Использование липосом в гено-инженерных методах. Липосома – шарообразное образование (около 100 нм в диаметре), состоящее из двойного липидного слоя. Липосомы имеют полость внутри, которая обычно заполнена растворителем, но может использоваться для доставки разнообразных веществ, в том числе ДНК и вакцин. Их гидрофобная оболочка позволяет им сливаться с клеточными мембранами и переносить своё содержимое внутрь клетки. Использование липосом началось в 1965 г., что стало мощным двигателем развития бионанотехнологий. Упаковка в липосомы используется для защиты экзогенного генетического материала от разрушающего действия рестриктаз. Оболочка липосом состоит из фосфолипидов. Получают их путем резкого встряхивания смеси водного раствора и фосфолипидов, либо обработки ультразвуком. Липосомы, состоящие из фосфатидилсерина и холестерина, наиболее пригодны для введения ДНК в клетки растений. Системы переноса с помощью липосом низкотоксичны по отношению к клеткам.

#### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. Как проводят введение ДНК при методе микроинъекций?*
- 2. На чём основан метод биобаллистической трансформации?*
- 3. Какие ограничения имеют разные методы прямого введения ДНК в клетки растений?*
- 4. Какой из методов трансформации растений имеет наилучшие перспективы использования?*
- 5. В чём состоит методика вакуумной инфильтрации?*
- 6. Что представляют собой липосомы? Как их используют для генетической трансформации?*

#### **3.14. Значение маркеров в селекции**

Поскольку эффективность введения рекомбинантной ДНК в клетку никогда не бывает абсолютной, а процент получения стабильных трансгенных клеток вообще очень мал, используются различные методы селекции для отделения трансформированных клеток. В состав рекомбинантных генетических конструкций вводят специальные гены, позволяющие отбирать

искомые варианты. Можно выделить 2 группы маркерных генов, позволяющие отличать трансформированные клетки:

- Репортёрные гены (гены-репортёры, англ. reporter gene) в молекулярной биологии – гены, которые прикрепляются к регуляторным последовательностям других генов для выявления последних при отборе трансформированных клеток. Репортёрные гены, кодируют нейтральные для клеток белки, по наличию которых тестируют геномодифицированные варианты. Обычно это какой-либо легко идентифицируемый флуоресцентный белок.
- Селективные гены определяют устойчивость клеток к антибиотикам (канамицину, тетрациклину, неомицину и др.), гербицидам или другим стрессовым факторам. Это могут быть гены ауксотрофности по какому-либо субстрату и др. Основной принцип работы такого маркера – передача способности трансформированным клеткам к росту на селективной питательной среде, где содержатся вещества, ингибирующие рост и деление нетрансформированных (нормальных) клеток. Селективные гены не просто сигнализируют от наличия искомого признака, но и позволяют отобрать геномодифицированные клетки.

Чаще всего в качестве репортёрных используются гены  $\beta$ -глюкуронидазы (GUS), зелёного флуоресцентного белка (GFP), люциферазы (LUC), хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT). В настоящее время наиболее часто используют гены GUS и GFP, в меньшей степени LUC и CAT. Репортёрный ген GUS представляет собой модифицированную последовательность *Escherichia coli*, кодирующую  $\beta$ -глюкуронидазу с молекулярной массой 68 кД. GUS активен в широком диапазоне условий среды (оптимум при pH 5-8 и 37°C). Он гидролизует множество природных и синтетических глюкуронидов, что позволяет выявлять модифицированные клетки на основе спектрофотометрического или флуориметрического определения активности фермента, а также при гистохимическом окрашивании тканей *in situ*. Фермент довольно стабилен: он устойчив к высокой температуре (время полужизни при 55°C составляет около 2 ч) и к действию детергентов. В процессе замораживания-оттаивания потери активности GUS не происходит. В составе химерных белков, созданных генно-инженерными методами, GUS обычно сохраняет свою функциональную активность. Стабилен и активен GUS-белок также в живых клетках (от нескольких часов до нескольких суток).

Выделение генетически модифицированных организмов и проблема удаления маркерных генов. При низкой эффективности трансфекции целесообразно использовать гены устойчивости к антибиотикам, тяжёлым металлам и другим стрессовым компонентам, дающим только трансформированным клеткам расти на селективной среде. Предварительно проводят изучение исходной популяции клеток к этим соединениям – строят дозовую кривую. Если эффективность трансформации достаточно высока, можно проводить отбор полученных клонов с помощью прямого анализа ДНК

(ПЦР и др.). Хотя в этом случае можно обойтись без селективных генов, репортёрный ген порой необходим даже наряду с селективным геном, так как позволяет проводить отбор трансформантов по уровню экспрессии целевого гена. Уровень экспрессии чужеродного гена у полученных трансгенных организмов может сильно различаться даже в одном эксперименте, вследствие различного встраивания в геном хозяина и различного поведения геномов после переноса.

Тем не менее, для хозяйственных целей целесообразно получение трансгенных организмов без каких-либо селективных или маркерных генов, что необходимо для стабилизации самого трансгенного организма и приобретённого признака, для повышения жизнеспособности трансформанта, так как следует минимизировать воздействие на генетический аппарат клетки-хозяина и убрать дополнительную метаболическую нагрузку клетки на экспрессию маркерного гена. Также необходимо ограничить неконтролируемое распространение в окружающей среде селективных и маркерных генов и, прежде всего, генов устойчивости к антибиотикам. Это особенно актуально для трансгенных микроорганизмов. В случае геномодифицированных высших растений или животных пока нет фактов природной передачи генов от них к микроорганизмам. Противники ограничения использования селективных маркеров утверждают, что в природных популяциях микроорганизмов они и так сейчас широко распространены в результате активного применения антибиотиков в медицинской практике. Поэтому вероятность попадания гена устойчивости к антибиотику в микрофлору человека из природного резервуара несравнимо реальнее, чем, например, при употреблении трансгенных растений.

Проблемы могут возникнуть и при потреблении ГМО в связи с аллергическими реакциями на продукт маркерного гена. В этом случае проблему можно нивелировать за счёт использования в качестве маркеров генов из традиционных пищевых источников.

При последовательном введении нескольких генетических конструкций в один организм важно последующее удаление первого маркерного гена для эффективного отбора новых трансформантов, поскольку количество эффективных селективных генов ограничено.

Безмаркерные эукариотические трансгенные организмы можно получать методом котрансфекции одного организма двумя генетическими конструкциями, где первая – с целевым геном, вторая – с маркерным. В этом случае полученный трансгенный организм содержит целевой ген с вероятностью 30-80 %, а рекомбинантные конструкции интегрированы в различные локусы хромосомной ДНК. Далее маркерный ген удаляют с помощью обычного скрещивания. Другой вариант – использование подвижных генетических элементов для перемещения маркерного гена в другой хромосомный сайт трансгенного организма. Например, при получении трансгенного растения селективный маркер встраивают между мобильными Ds-элементами рядом с геном транспозазы, которая вырезает встроенную между Ds-элементами ДНК и перемещает её в другой локус. В 50% случаев маркерный ген находился далеко от целевого гена в хромосоме растения-

хозяина. Таким образом, селективный маркер может использоваться для отбора трансгенных растений, а потом удаляться скрещиванием.

Разработка высокоэффективных средств доставки ДНК в клетки позволит совсем обойтись без селективных и маркерных генов. В настоящее время это практически невозможно, так как первые этапы сборки генетической конструкции для трансфекции обычно проводятся в клетках *E. coli*.

Определение ферментативной активности и изучение спектра изоферментов позволяет выявить гибридную природу изучаемого материала. При этом в спектрах изоферментов гибрида должны совмещаться зоны, характерные для каждого из родителей. Большое значение имеет физиологическая стабильность различных форм изоферментов в зависимости от дифференцировки используемых для анализа клеток.

Анализ белка «Фракция 1». Этот белок локализован в хлоропластах и представляет собой фермент рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазу с оксигеназной активностью и состоит из большой и малой субъединиц. Полипептидный состав обеих субъединиц различен у разных видов растений, поэтому этот белок является маркером при изучении межвидовых гибридов. Малая субъединица кодируется ядерным геномом и наследуется двуродительски. Большая субъединица наследуется однородительски (по материнской линии) и кодируется пластомом. Анализ белка позволяет получать доказательства гибридности материала и исключать химеризм.

Рестриктивный анализ ДНК органелл. Анализ ДНК органелл с помощью рестриктаз является быстрым и точным методом определения гибридности по цитоплазмону. Рестриктивные спектры, получаемые в результате электрофореза, видоспецифичны и могут быть использованы для характеристики ДНК органелл.

Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот. Применяют как ДНК-ДНК, так и ДНК-РНК-гибридизацию. Степень молекулярной гибридизуемости используется для характеристики систематического и филогенетического родства видов. Метод молекулярной гибридизации перспективен при изучении природы парасексуальных гибридов, особенно гибридов филогенетически отдаленных видов. В случае, когда хромосомный анализ не в состоянии выявить наличие в клетках гибридов хромосомного материала одного из родителей, наиболее подходящим методом для анализа гибридов является именно метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот.

### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. Какое значение имеют маркерные гены в селекции?*
- 2. Чем отличаются друг от друга селективные и репортёрные гены?*
- 3. Какие есть подходы безмаркерной трансформации и селекции?*
- 4. Почему наличие маркерных генов нежелательно в геноме растения?*

### 3.15. Микрклональное размножение

Клональным микроразмножением (или микрклональным размножением) называют неполовое размножение растений с помощью метода культуры тканей, позволяющее получать растения идентичные исходному. В основе получения таких растений лежит способность соматических клеток растений полностью реализовывать свой потенциал. Свое название эта технология размножения получила от термина «клон» (от греч. *clon* – отпрыск), который предложил Веббер в 1903 г. Клональное микроразмножение имеет существенные преимущества перед традиционными способами размножения:

1. Высокий коэффициент размножения. Одно растение герберы за год при микрклональном размножении даёт до 1 млн новых растений, тогда как при обычных способах размножения только 50-100 растений. Большинство культивируемых в настоящее время сортов лилий размножается только вегетативно. Луковички возникают на материнских луковицах или на побеге в небольших количествах, также возможно размножение чешуями. Микрклональная технология позволяет получить за 6 месяцев до 105 новых растений.

2. Получение генетически однородного посадочного материала.

3. Возможность оздоровления растений, освобождения их от вирусов благодаря клонированию меристематических тканей.

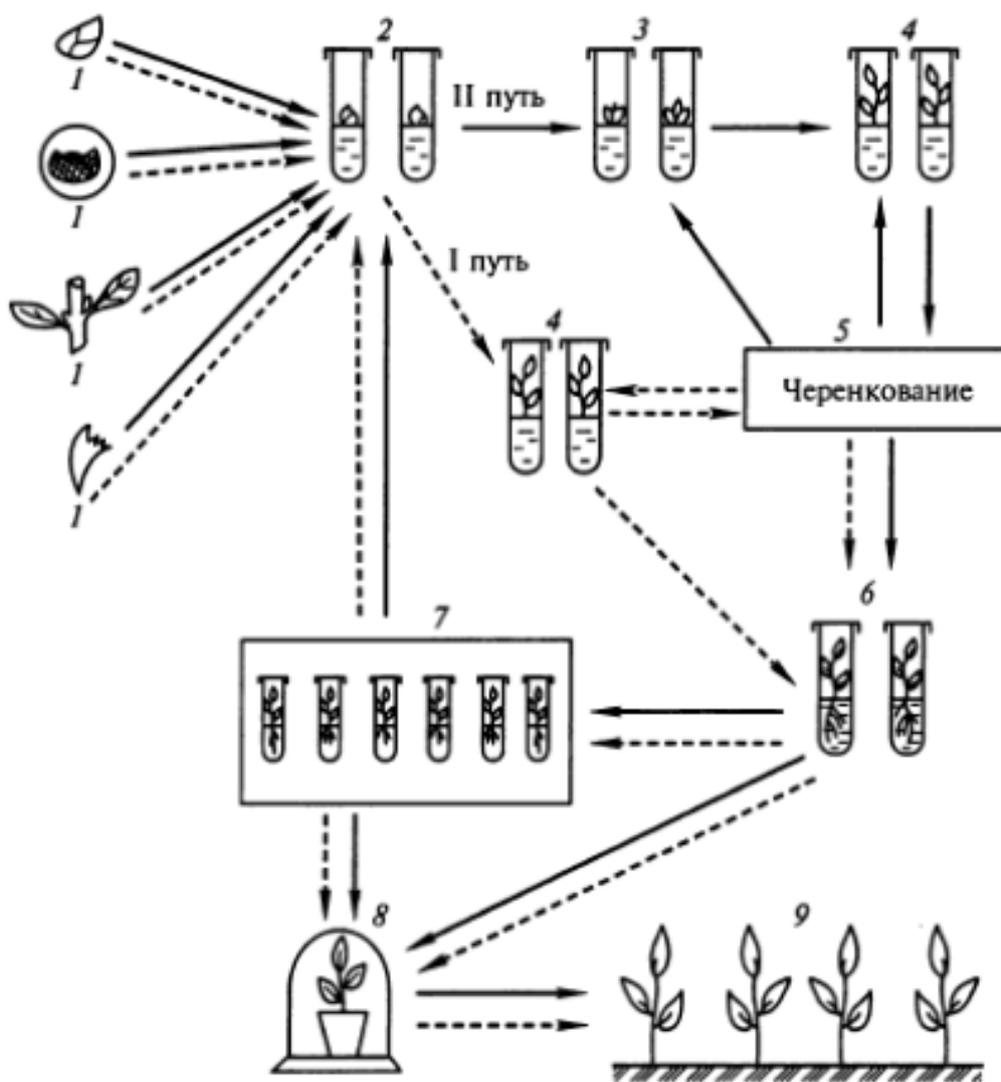
4. Возможность размножения растений, которые в естественных условиях репродуцируются с большим трудом.

5. Воспроизведение посадочного материала круглый год, что значительно экономит площади, занимаемые маточными и размножаемыми растениями.

6. Сокращение продолжительности селекционного периода, ускорение перехода растений от ювенильной фазы развития к репродуктивной.

Обязательное условие клонального микроразмножения – использование объектов, полностью сохраняющих генетическую стабильность на всех этапах процесса (от экспланта до растений в поле). Такому требованию удовлетворяют апексы и пазушные почки органов стеблевого происхождения, т. е. меристематические ткани. Их устойчивость к генетическим изменениям, вероятно, связана с высокой активностью систем репарации ДНК, а также с негативной селекцией изменённых клеток.

Этапы (Рис.11.):



**Рис.11. Микрклональное размножение растений при активации развития существующих меристем (1 путь), за счёт индукции образования адвентивных почек на экспланте (2 путь) (по В.С. Шевелуха, 2008):**

1) Выбор исходного экспланта; 2) Получение стерильной культуры; 3) Образование адвентивных почек на первичном экспланте; 4) Формирование микропобегов; 5) Черенкование *in vitro*; 6) Укоренение микропобегов; 7) Инкубация при пониженной температуре; 8) Пересадка в теплицу; 9) Высадка растений в открытый грунт

1. Получение хорошо растущей стерильной культуры. На этом этапе необходимо правильно выбрать растение-донор, получить свободную от инфекции культуру, добиться её выживания и быстрого роста на питательной среде.
2. Собственно размножение, осуществляемое несколькими способами:
  - активизация пазушных меристем;
  - индукция образования адвентивных почек тканями без первоначального образования каллусной ткани;
  - микрочеренкование побега, сохраняющего апикальное доминирование;
  - стимуляция образования микроклубней и микролуковичек;

- индукция соматического эмбриогенеза.

Главным условием образования побегов является высокое соотношение цитокининов и ауксинов. Потребность в экзогенных гормонах зависит от концентрации эндогенных цитокининов и ауксинов в экспланте. Среди экзогенных цитокининов часто используют 6-БАП, в отдельных случаях – зеитин-рибозид, кинетин и аденин, который при автоклавировании превращается в кинетин. Обычно 1-2 мг/л цитокинина достаточно для пролиферации побегов. Более высокие концентрации усиливают образование адвентивных почек, что не всегда желательно в связи с повышением вероятности образования мутаций. Также могут быть использованы ауксины и гиббереллины для повышения активности роста побегов. Чаще используют нафтилуксусную и индолилмасляную кислоты в концентрации 0,1-1мл/л, реже – индолилуксусную кислоту из-за её нестабильности в среде, поэтому её правильнее добавлять в готовую среду в виде раствора, простерилизованного через мембрану. Ауксин 2,4-Д в микроклональном размножении обычно не применяется, так как вызывает мутации.

Существуют различные способы микроклонального размножения. Первый и основной способ – активизация пазушных меристем. Он состоит в снятии апикального доминирования и активизации развития меристем, существующих в растении. Широко используется он и при обычном вегетативном размножении. Снятие апикального доминирования достигается или удалением апикальной меристемы побега, или благодаря действию цитокининов, наносимых на пазушные почки. При клонировании цитокинины (6-бензиламинопурин, 6-фурфуриламинопурин, зеитин) добавляют в питательную среду, что приводит к развитию многочисленных пазушных побегов. Обычно из экспланта за 4-8 недель развивается пучок (кластер) побегов. После разделения их и посадки на свежую среду, процесс образования нового пучка побегов повторяется, если состав среды, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов, сохранён. Для полноценного развития побегов их разделяют и переносят на питательную среду с новым составом. Метод широко используют в промышленном размножении овощных, цветочных, плодовых, ягодных культур и декоративных деревьев. С момента введения в культуру до высадки растений в открытый грунт может проходить большое время, но этап мультиразмножения на среде с фитогормонами желательно сокращать для снижения риска возникновения аномалий развития. В наиболее критичных случаях растения теряют способность к укоренению, а иногда погибают. В опытах с размножением земляники было показано, что при микроклональном размножении необходимо чередовать 2-3 цикла получения побегов с их укоренением.

Второй способ – индукция развития адвентивных почек, т. е. почек, возникающих из растительных клеток и тканей, которые их обычно не образуют. Этот метод в значительной мере обусловлен тотипотентностью растительных клеток. Можно добиться образования адвентивных почек почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля,

семядолей, чешуек и донца луковиц, сегментов корней и зачатков соцветий). Процесс образования адвентивных почек вызывают внесением в питательную среду цитокининов и ауксинов с преобладанием первых. Соотношение поддерживают на уровне от 10:1 до 100:1. В качестве ауксина используют ИУК или НУК. Адвентивные почки могут формироваться из предварительно полученной каллусной массы и тогда это выделяют в отдельный вариант технологии (не совсем желательной из-за повышения риска генетических перестроек). Почки возникают в любом месте, кроме апикальной или пазушной меристемы. Такой путь обеспечивает более быстрое размножение, однако повышает вероятность мутаций. Это наиболее распространённый способ микроразмножения высших растений, таких как томат, лук, чеснок; салат, глоксиния, сенполия; гладиолус, тюльпан и деревьев.

Третий способ — микрочеренкование побега, сохраняющего апикальное доминирование. Растения-регенеранты, полученные любым другим способом, можно черенковать в стерильных условиях, высаживать на свежую питательную среду, укоренять, и адаптировать к полевым условиям либо снова подвергать микрочеренкованию для того, чтобы увеличить количество посадочного материала. Таким способом размножается картофель.

Большинство коммерческих систем микроразмножения растений обеспечивает смешанный тип органогенеза, т. е. образование побегов, как из пазушных, так и из адвентивных почек. Для отдельных культур возможно размножение в результате соматического эмбриогенеза.

При многократном пассировании тип органогенеза на той же среде может изменяться (вместо боковых образуются адвентивные почки). Многократное пассирование увеличивает вероятность эпигенетических изменений и мутаций. Возможно и снижение регенерационного потенциала после 7-10-го пассажа. Обычно продолжительность в 10-12 пассажей считают максимальной.

Может возникать витрификация (стекловидность побегов), за счёт их избыточной оводнённости. В таких случаях нарушается образование хлорофилла, протеинов, снижается жизнеспособность и приживаемость при пересадке; большинство растений гибнут. Один из возможных путей уменьшения оводнённости – снижение концентрации цитокининов в среде и снижение температуры культивирования.

После нескольких пассажей, добавляя в питательную среду ауксины, побеги укореняют *in vitro*, а затем переносят в почву, где создают условия, способствующие адаптации растений. В настоящее время этот метод широко используется в производстве посадочного материала сельскохозяйственных культур, технических, овощных, плодовых и ягодных культур, культур промышленного цветоводства (например, гвоздики), тропических и субтропических растений. Для многих культур технология клонального размножения поставлена на промышленную основу.

Четвёртый способ – размножение в биореакторах микроклубнями. Это один из способов ускоренного размножения картофеля и позволяет получать из одной меристемы картофеля более 100000 микроклубней в год – ценного безвирусного посадочного материала. В отделе биологии клетки и

биотехнологии Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН создана эффективная полупромышленная замкнутая система пневмоимпульсного биореактора для получения микроклубней, в которой предусмотрена возможность воздействия на направление и скорость процессов клубнеобразования. Технологии клонального микроразмножения в биореакторах разработаны не только для картофеля, но и для декоративных растений (лилии, гладиолусы, гиацинты, филодендроны и т.д.).

Пятый способ размножения – образование соматических зародышей – основанный на соматическом эмбриогенезе. Впервые это явление было отмечено в середине 50-х годов XX в. в культуре клеток моркови. Формирование эмбриоидов в культуре осуществляется в два этапа. На первом соматические клетки дифференцируются в эмбриональные в присутствии ауксинов, обычно это 2,4-D. На следующей стадии развиваются эмбриоиды. Процесс проходит только при значительном снижении концентрации ауксина или полном отсутствии его в питательной среде. Соматический эмбриогенез может происходить в тканях первичного экспланта, в каллусной или суспензионной культуре. Манипулируя составом среды, можно добиваться формирования придаточных эмбриоидов в ткани первичных соматических зародышей (проводить деление первичных эмбриоидов).

Поскольку соматические зародыши представляют собой полностью сформированные растения, данный метод позволяет сократить затраты, связанные с подбором условий укоренения и адаптации растений-регенерантов. Кроме того, преимущество получения соматических эмбриоидов в том, что при использовании соответствующей техники капсулирования из них можно получать искусственные семена.

Соматический эмбриогенез в настоящее время применяют для размножения пшеницы, ячменя, моркови, редиса, винограда, некоторых древесных растений (дуб, ель, эвкалипт).

#### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. Какие способы клонального микроразмножения существуют?*
- 2. В чём преимущества и недостатки размножения с активацией развития адвентивных почек?*
- 3. Какими способами в культуре *in vitro* снимают апикальное доминирование и зачем?*
- 4. Какой максимальный коэффициент микроклонального размножения может быть получен?*
- 5. Какие нежелательные процессы могут протекать при клональном микроразмножении?*

#### **3.16. Соматический эмбриогенез**

Один из методов, практикуемых при клональном микроразмножении, основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему виду напоминают зиготические зародыши. Этот метод получил название соматического эмбриогенеза. В отличие от развития *in*

*vivo*, соматические зародыши развиваются асексуально вне зародышевого мешка и по своему внешнему виду напоминают биполярные структуры, у которых одновременно наблюдается развитие апикальных меристем стебля и корня. Согласно Стеварду, соматические зародыши проходят 3 стадии развития: глобулярную, сердцевидную, торпедовидную и в конечном итоге имеют тенденцию развития в проросток. Формирование эмбриоидов в культуре тканей осуществляется в несколько этапов. Сначала происходит дифференциация клеток под влиянием ауксинов, добавленных в питательную среду (2,4-Д) и превращение их в эмбриональные. Получить эмбриониды из этих клеток можно уменьшая концентрацию ауксинов или исключая их из питательной среды. Соматические зародыши представляют собой полностью сформированные зародыши, из которых путем соответствующего капсулирования можно получить искусственные семена.

Это весьма перспективная технология на основе культуры ткани. Искусственные семена представляют собой соматические зародыши, инкапсулированные в подходящем материале (например, альгинате натрия) и покрытые оболочкой для защиты от высыхания. Пока система искусственного семеноводства только разрабатывается, но ожидают, что в недалеком будущем она сможет конкурировать с традиционным семеноводством для быстрого размножения элитных растений, а также размножения новых линий и сортов. Ведь многие формы, полученные с помощью культуры клеток, не могут быть размножены семенами из-за мейотической нестабильности, которая ведет к потере искомым качеств. Считают, что технология искусственных семян внесет значительный вклад и производство продукции в будущем.

#### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. В чём преимущества и недостатки технологии искусственных семян? Почему она до сих пор широко не внедрена?*
- 2. Какие стадии имеет технология получения искусственных семян?*
- 3. Какое строение имеют искусственные семена? Какое значение имеют их составные части?*

### **3.17. Регенерация растений *in vitro***

Эффективность получения трансгенных растений напрямую зависит от регенерационной способности клеток растения-реципиента. В свою очередь регенерация взрослых растений из трансформированных клеток зависит от тотипотентности клеток определенного происхождения, в связи с чем регенерационная способность отдельных тканей значительно различается. Кроме того, виды и даже сорта растений могут отличаться по способности к регенерации. Тотипотентность хорошо выражена в клетках двудольных растений, таких как табак, картофель, свекла, соя, рапс, люцерна, томаты, морковь, капуста, некоторых плодовых. Напротив, получить регенерацию трансгенных растений из клеток большинства бобовых, перца, баклажана

крайне тяжело. У однодольных, особенно злаков, свойство тотипотентности клеток выражено гораздо слабее, в связи с чем процесс регенерации клеток в целое растение затруднён. В настоящее время разработаны методики регенерации трансформированных клеток основных зерновых культур, таких как кукуруза, рис, пшеница, ячмень. Однако необходимо отметить, что с каждым годом методы регенерации разрабатываются для всё большего числа растений.

**Вопросы для самоконтроля:**

1. Для чего нужна регенерация *in vitro*?
2. От каких факторов зависит регенерационная способность?

**Раздел 4. Методы последующей селекции *in vivo***

Процесс селекции не заканчивается условиями *in vitro*, а активно развивается и после высадки в нестерильные условия. Сам по себе этот этап может значительно отбраковать неприспособленные виды. К сожалению, степень экспрессии нужного гена и адаптационные возможности растения в период перевода в условия *in vivo* никак не коррелируют. На данном этапе любой отбор и гибель растений будут крайне нежелательны.

**4.1. Адаптация растений к нестерильным условиям**

Растения, выращенные в культуре *in vitro*, имеют ряд анатомических и физиологических особенностей. Для них характерны более мелкие и тонкие листья, слабо развитая кутикула, нарушенная работа устьиц, закрытая проводящая система из элементов ксилемы, тип питания чаще миксо- или гетеротрофный. При пересадке в условия теплицы микрорастения испытывают стресс, что может вызвать гибель значительной части растений от недостатка влаги, повышенной температуры и других неблагоприятных факторов. В связи с этим главная задача этапа – акклиматизация в условия *in vivo*. Важно также контролировать патогены, так как *in vivo* микрорастения могут инфицироваться бактериями, грибами, вирусами. В качестве дополнительной задачи этого этапа может быть укоренение, если корни слабо развиты. Для успешного решения этих проблем микрорастения пересаживают в теплицы с контролируемыми условиями: высокая относительная влажность, уменьшенная интенсивность света, не слишком влажный субстрат и оптимальная температура. В теплицах для более высокой влажности над растениями помещают полиэтиленовую пленку или применяют туманообразующую установку. Такие условия поддерживают в течение 2-3 недель. Иногда проводят обработку химическими веществами (глицерин, парафин) для предотвращения обезвоживания растений. Упрощенный способ адаптации пробирочных растений винограда был разработан в Институте физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН. Адаптацию проводят прямо в пробирках, снимая с них пробки, когда растения винограда дорастают до верха пробирки, используя для этого обеднённую среду культивирования. Возможно также охлаждение дна сосудов. Для

предотвращения инфицированности микрорастений используют фунгициды и стерилизацию субстрата.

Подготовка к высадке в поле или к реализации. Во время данного этапа, проводимому в теплице, укорененные растения, полученные *in vitro*, адаптируют к новым условиям внешней среды: проводят закаливание растений, повышают их устойчивость к патогенным микроорганизмам и различным неблагоприятным факторам внешней среды. Необходимо подобрать почвенный субстрат и оптимальную влажность. В качестве субстрата применяют верховой торф, или его смеси с песком или перлитом. Хорошие результаты при укоренении микрорастений показал субстрат на основе ионообменных смол «Биона», разработанный в Институте физико-органической химии НАН Беларуси. Субстрат содержит необходимые элементы по Мурасиге-Скуга. Его можно использовать многократно.

Микроорганизмы почвы улучшают азотное и фосфорное питание растений, снабжают корни регуляторами роста, подавляют развитие патогенов. Поскольку микрорастения *in vitro* не имеют контакта с микроорганизмами, целесообразно создавать такие микробсообщества на этапе адаптации. Некоторые деревья лучше приживаются, если ещё *in vitro* их заражают микоризой. Источниками микроорганизмов могут быть специально культивируемые штаммы, или природные популяции.

Микрорастения высаживают непосредственно в грунт теплицы или в ящики, горшки или пластиковые кассеты, установленные на стеллажах. В классическом варианте корни растений отмывают в воде от агара, как субстрата, способного стимулировать развитие внешней инфекции. Но есть и обратные рекомендации (полагая снизить риск механического повреждения корней, что позволяет значительно упростить и удешевить этап акклиматизации).

#### ***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. Как пробирочные растения адаптируют к условиям низкой влажности?*
- 2. Каким образом восстанавливают симбиотические отношения корней растений с микроорганизмами?*
- 3. Какие условия среды оптимальны для адаптации пробирочных растений?*
- 4. Какие требования предъявляют к теплицам для адаптации материала из культуры тканей?*
- 5. Какие субстраты используют для пересадки пробирочных растений?*

## **4.2. Селекция *in vivo*. Виды искусственного отбора**

Несмотря на предварительный отбор трансгенных растений в условиях *in vitro*, селекцию перспективных форм продолжают вести и в условиях адаптационных теплиц, а также впоследствии – в открытом грунте селекционных участков. Осуществляют это разными методами, подбирая их соответственно поставленным задачам и специфике размножения выбранных растений.

Массовый отбор – наиболее древний метод, где отбору подвергается вся исследуемая группа. Семена с лучших растений объединяются и высеваются совместно (на одной делянке). Массовый отбор считается примитивной формой отбора, поскольку не позволяет вычлнить влияние ненаследуемой модификационной изменчивости, но до сих пор широко применяется в семеноводстве. Рекомендуются при селекции новых, вводимых в культуру растений или культур, мало изученных в селекционном отношении. Достоинством этой формы отбора является сохранение высокого уровня генетического разнообразия в селектируемой группе растений. Массовый отбор проводят многократно.

Индивидуальный отбор – отбираются отдельные особи, и собранные с них семена высевают раздельно. Индивидуальный отбор считается прогрессивной формой отбора, поскольку позволяет исключить влияние модификационной изменчивости и вести родословную будущего сорта. Недостатком является большая трудоёмкость в работе и оформлении её результатов.

Одним из наиболее прогрессивных методов отбора, учитывающим модификационную изменчивость, считается метод «педигри» (англ. pedigree – родословная), основанный на индивидуальном отборе лучших особей с оценкой их потомства. При оценке материала бракуются не отдельные особи, а целые линии, содержащие нежелательные для селекционера аллели.

Этот метод особенно эффективен при селекции малолетников (однолетников, двулетников и быстро развивающихся многолетников). Однако метод «педигри» неприменим для видов, склонных к инбредной депрессии (снижению жизненных показателей при близкородственном скрещивании) и для двудомных видов растений.

Для перекрестноопыляющихся растений используется особая форма индивидуального отбора – семейный отбор (семья – совокупность особей, выращенных из семян, собранных с одного растения, причем донор пыльцы, как правило, неизвестен).

Если разные семьи изолированы друг от друга, то такой отбор называют индивидуально-семейным. При воспроизведении каждой семьи выбраковываются особи с нежелательными признаками, а оставшиеся лучшие особи свободно переопыляются. Затем производится оценка семьи по её потомству. Те семьи, в которых велика доля растений с нежелательными признаками, бракуются и исключаются из селекционного процесса, а семьи с высокими средними показателями используются для дальнейшего семенного размножения и отбора.

Такой метод селекции представляет собой модификацию метода «педигри» применительно к перекрестноопыляющимся растениям.

К недостаткам метода следует отнести частичное ограничение опыления (в пределах потомства), что сопровождается инбридингом и в итоге приводит к резкому снижению урожайности. Метод целесообразно использовать для культур не чувствительных к близкородственному скрещиванию, или когда отбор проходит по элементарному признаку (устойчивость к болезни и др.).

### **Вопросы для самоконтроля:**

1. *Какие виды искусственного отбора используются в селекции растений?*
2. *В чём отличие метода «педигри» от массового и индивидуального отбора?*
3. *Какой подход реализуют в селекции перекрёстно-опыляемых растений?*
4. *Для каких видов отбора используют частичную выбраковку по негативным признакам, а для каких полностью бракуют всех, кроме лучших?*

### **4.3. Организация государственного сортоиспытания**

Государственное испытание проводится для выявления наиболее ценных для данной зоны сортов и гибридов. Сортоиспытанием занимается Государственная комиссия по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур. В госсортоиспытание принимаются только те сорта-новинки, которые успешно прошли экологическое испытание в зональном селекционном центре (лучшие). На госсортоучастках проводят три вида сортоиспытания: расширенное, конкурсное и производственное.

В расширенное сортоиспытание включаются все вновь выведенные сорта с целью выявления лучших для дальнейшего изучения. Его проводят по некоторым культурам на специально выделенных госсортоучастках (ГСУ). Конкурсное сортоиспытание – это основной вид сортоиспытания, при котором изучение сортов ведется по всему комплексу хозяйственных и биологических признаков.

Обычно каждый ГСУ изучает от 5 до 15 сортов по отдельной культуре. В зависимости от вида растения площадь делянки составляет, как правило, 25—50 м<sup>2</sup> при 4-6-кратной повторности. При сборе урожая комбайном размер делянок увеличивают до 100 м<sup>2</sup>.

В производственное испытание включают сорта, хорошо показавшие себя в конкурсном испытании, перепроверяя их показатели роста на полях хозяйств-производителей под контролем сотрудников ГСУ на делянках площадью не менее 2 га при двукратной повторности. Испытание проводится в условиях, максимально приближенных к производственным.

На всех этапах оценки сортов их изучают в сравнении со стандартом – лучшим из районированных сортов. Данные сортоиспытания подвергаются статистической обработке. Изучение сорта не должно продолжаться более 3-4 лет. Разработана специальная методика для экономической оценки новых сортов. В странах – членах СЭВ проводится и международное сортоиспытание по единой методике.

Ежегодно ГСУ отчитывается о результатах испытаний каждой культуры. Лучший из новых сортов, устойчиво превысивший стандарт (ранее районированный сорт) по урожаю и другим показателям, предлагают внедрить, а сорта бесперспективные для зоны снять с дальнейшего испытания.

Порядок районирования сортов. Предложения каждого сортоучастка по районированию обсуждаются на межрайонном совещании работников сельского хозяйства. На основе отчетов всех ГСУ области составляется отчет, где обобщаются результаты изучения сортов на всех сортоучастках.

Предложения областной инспектуры по изменениям в сортовом районировании обсуждаются на областном агрономическом совещании и затем направляются в Госкомиссию по сортоиспытанию сельскохозяйственных культур. Она формулирует предложения по изменениям в сортовом районировании. В проекте указывается, какие новые сорта и для какой зоны районированы, а какие снимаются с районирования.

***Вопросы для самоконтроля:***

- 1. Какие цели преследует госсортоиспытание?*
- 2. Сколько и каких этапов проходит сортоиспытание?*
- 3. Результаты какого сортоиспытания считаются самыми адекватными в оценке перспективности новых сортов?*
- 4. Что такое конкурсное сортоиспытание?*

#### **4.4. Растения со сложным генотипом. Химеры**

Химера – организм, состоящий из генетически разнородных клеток. В 1907 году термин впервые применил немецкий ботаник Г. Винклер для форм растений, которые были получены в результате сращивания паслёна и томата. Растение считается химерой, когда в растущих тканях совместно присутствуют клетки более чем одного генотипа. Вариегатные растения – наиболее частый тип химер и, конечно, это наиболее удобный пример для представления основной концепции. Клетки в вариегатном листе происходят из апикальной меристемы побега, но некоторые клетки отличаются неспособностью синтезировать хлорофилл. Они выглядят желто-белыми, хотя являются частью той же самой ткани. Много химер среди сортов декоративнолиственных и красивоцветущих садовых растений. Барвинок малый (*Vinca minor*) «*Variegata*», живучка ползучая (*Ajuga reptans*) «*Burgundy Glow*», хлорофитумы (*Chlorophytum*) имеют вариегатные формы. Химеры могут возникать в природе в результате спонтанных мутаций соматических клеток, в экспериментальных условиях (обработка мутагенами, колхицином и др.) среди растений-регенерантов, а также в результате прививок. Химеры более распространены среди растений, размножаемых вегетативно, так как при этом способе химерность сохраняется достаточно долго. При половом размножении возможно наследование химерности, возникающей при нестабильности аллелей. В этом случае наследование признаков не подчиняется менделевским законам и считается нестабильной мутацией. В природе химеры редки, возникают, как правило, в результате случайной гибридизации и механических повреждений.

Виды химер. Химерные растения могут быть систематизированы на основе размещения и соотношения измененных клеток к неизменным в апикальной меристеме. Периклиналильные химеры – относительно устойчивы и могут быть вегетативно размножены. Мутация даёт периклиналильную химеру, если мутировавшая клетка находилась около апикального купола и образующиеся из неё клетки формируют полный слой изменённого типа. Классический пример

периклиальной химеры – ежевика без шипов. Эпидермальный слой у этого типа не производит никаких шипов. Эпидермис без шипов покрывает остальные слои стебля, чей генотип содержит информацию для образования колючек, что проявляется при образовании побегов корневой поросли. Адвентивные побеги, которые образуются на корневых черенках, нехимерны и имеют шипы.

Мериклиальные химеры получаются, когда потомки изменённой клетки не полностью накрывают апикальный купол. Изменённый клеточный слой поддерживается на одной стороне меристемы. В результате химерные побеги или листья развиваются только с одной стороны оси побега, в то время как на другой стороне абсолютно нормальные. Также как и периклиальные мериклиальные химеры ограничиваются одним клеточным слоем.

Секторные химеры получаются из мутаций, которые затрагивают целый сектор апикальной меристемы, простирающийся через все клеточные слои вглубь. Этот тип химер непостоянен и может давать не химерные побеги и листья. И нормальный, и химерный типы могут быть получены, в зависимости от места на апексе, от которого дифференцируется конкретный лист или побег.

Химеры (особенно периклиальные, как более стабильные) обладающие комплексом хозяйственных преимуществ, имеют важное значение в растениеводстве. Они часто выращиваются как декоративные растения. Взаимодействие между компонентами химер и переход различных веществ из одного компонента в другой могут приводить к различным аномалиям развития и иногда к бесплодию химеры.

В практике садоводства химеры, возникшие случайно в результате прививок (пестролистность), воспроизводят вегетативным размножением из поколения в поколение (например, химеры между пурпурным ракитником и золотым дождём – так называемый ракитник Адама, химеры между померанцем и лимоном).

Потеря химерности свойственна как растениям, полученным в результате обработки колхицином, так и химерам, возникшим спонтанно. Наряду с периклиальными химерами, сохраняющими свои особенности при вегетативном размножении в течение 100 и более лет, описаны случаи исчезновения химерности (у трихимер *Pelargonium zonae*, известного с XIX века сорта апельсина «Shamouti» и др.). У некоторых форм винограда расхимеривание может происходить на отдельных побегах.

Частота расхимеривание зависит от способа размножения растений. Размножение корневыми черенками чаще приводит к расхимериванию, чем вегетативное размножение другими частями растений.

Размножение химерных растений. Мериклиальные и секторные химеры по своей природе очень нестабильны и вероятность получения растений с тем же самым фенотипом при размножении низка. Периклиальные химеры очень устойчивы и широко реализуются в садоводстве. У них расположение клеточных слоев в апикальной меристеме боковых побегов является идентичным расположению этих слоев в меристеме исходного побега. Укоренение черенков, прививка и деление куста – эти методы размножения

обеспечивают высококачественное воспроизведение. Важным исключением из этого правила является дифференциация побегов от адвентивных почек (описанный выше пример ежевики без шипов). Адвентивные корни, которые формируются на стеблевом черенке ежевики, происходят из субэпидермальных тканей стебля (L. II и L. III). Если получить корневую поросль от этих растений, адвентивные побеги не будут содержать мутантный слой (L. I) «без шипов» и побеги будут с обычными шипами.

Сенполии (африканские фиалки) с химерным полосатым цветком (тип «pinwheel») аналогично не могут быть размножены с сохранением этого типа окраски цветка через листовые черенки. Побеги, которые происходят от листовых черенков, будут иметь или какой-то один цвет, или различные спорты с нерегулярными пятнами двух цветов, не соответствующие сорту. Размножение химерных сортов африканских фиалок с полосатыми цветками в настоящее время достигается отделением боковых побегов из боковых почек или при укоренении цветоносов. Это иллюстрирует, что палитра цветка определяется распределением клеточных слоев в апикальной меристеме.

#### ***Вопросы для самоконтроля:***

1. *Какие типы химер выделяют по строению побегов?*
2. *Чем отличаются периклиналильные химеры?*
3. *Какие химерные формы могут быть воспроизведены при вегетативном размножении?*
4. *Что такое расхимеривание? В каких случаях оно происходит?*
5. *Какое значение имеют химерные формы для растениеводства?*

## **Раздел 5. Лабораторные работы по клеточной инженерии растений**

### ***5.1. Определение видовой специфичности культивируемых клеток с помощью изоферментного анализа (по Б.А. Маргулис, 1988)***

Определение видовой специфичности необходимо для анализа процессов, происходящих при культивировании клеток и создании клеточных гибридов. Задача может быть решена с помощью изоферментного анализа на основе электрофореза в крахмальном, агарозном или полиакриламидном гелях. Анализ осуществляется по следующей методике:

1. Приготовление клеточных проб,
2. Электрофорез белков
3. Гистохимическое выявление изоферментов.

#### **Приготовление клеточных проб:**

Клетки суспензируют в гипотоническом растворе: 0,01 М Трис-НСl, рН 7,0-7,5 или 0,005-0,010 М фосфатном буфере, рН 6,8-7,4. Концентрация клеток суспензии  $5 \times 10^6$ - $5 \times 10^7$  в 1 мл. клетки разрушают при 3-кратном замораживании-оттаивании, пропуская через иглу шприца или введением неионного

детергента Тритон-100 до 1%. Пробы центрифугируют при 8000-10000 об/мин, для повышения плотности вводят 10-15% сахарозу. Нанесение их на гель проводят сразу или убирают на хранение при - 20°C (не более 3 недель).

#### Электрофорез белков:

Наибольшей разрешающей способностью обладает электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ). Процедуру проводят в вертикальном блоке. Для большинства ферментов используют для ПААГ 0,04 М Трис-НСI, рН 8,9; электродный раствор: 0,005 М Трис, 0,0384 М глицин, рН 8,3. Концентрация акриламида 5-7,5%.

Условия проведения электрофореза определяются составом буферной системы. Для привязки спектра изоферментов изучаемых клеток к стандартному на крайние дорожки гелевого блока наносят тканевые экстракты аналогичным способом.

#### Гистохимическое выявление изоферментов:

Полученные отпечатки с гели или сам разделяющий гель окрашивают для выявления изоферментов. Инкубируют гель в растворе при 37°C в темноте в течение 10-20 мин, после чего на желтоватом фоне проявляются синие полосы.

*Состав раствора для лактатдегидрогеназы (э/ф в ПААГ):*

0,1 М Na-фосфатный буфер, рН 7,4

0,1 М Na-лактат

0,01 М NaCl

$5 \times 10^{-4}$  МgCl<sub>2</sub>

НАД 1 мг/мл

НБТ 0,25 мг/мл

ФМС 0,025 мг/мл

### **5.2. Получение и культивирование протопластов (по И.Н. Смоленская, А.В. Носов, 1988)**

Необходимо взять молодое растение (с предварительной стерилизацией), каллусную или суспензионную культуру в возрасте 2-3 суток. Для суспензионной культуры сахарной свёклы процедура следующая:

В круглодонную колбу на 250 мл помещают на 2 суток 10 мл 3-х дневной суспензии клеток. Температура 28°C. Спустя 48 часов добавляют 10 мл ферментной смеси: 0,56 М сорбит на макро- и микроэлементах по Шенку-Хильдебрандту, 0,4% целлюлаза Onozuka R-10, 0,2% целлюлозин, 0,2% мацерозим, 0,8% дрейселлаза, рН 5,5-5,7. Затем колбы ставят на качалку в темноту при 22-23°C на 18-20 часов.

По истечении времени под инвертированным микроскопом оценивают качество и количество выделившихся протопластов. Их отмывают от ферментной смеси при центрифугировании (100g – 3 мин). После осаждения протопластов верхний слой налосадочной жидкости отбирают пипеткой и ресуспензируют протопласты в 7-8 мл 0,4 М маннита, центрифугируют в тех же условиях. Процедуру отмывки повторяют дважды. К осадку протопластов добавляют 1-2 мл среды для последующего культивирования. Для анализа плотности

суспензию разбавляют в 10 раз и определяют в камере Фукса-Розенталя. Окрашивают 0,01% раствором синьки Эванса для анализа жизнеспособности. Посев проводят после разбавления средой с учётом полученных данных, чтобы число живых протопластов было  $1-4 \times 10^4$  клеток/мл. На чашку Петри 50-60 мл помещают 2 мл готовой суспензии. Процесс роста и регенерации протопластов проводят в темноте при 25 °С с постоянным контролем под инвертированным микроскопом.

### **Использованные термины:**

**In vitro** – выращивание растительных объектов «в стекле» (пробирке, колбе, биореакторе) на искусственных питательных средах, в асептических условиях.

**Адвентивные почки** – почки, возникшие из тканей и клеток растения, обычно их не образующих.

**Апекс** – верхушечная часть стебля или корня.

**Апикальное доминирование** – явление подавления роста боковых почек побега в присутствии терминальной почки.

**Ауксины** – фитогормоны (ИУК, НУК, 2,4-Д), активизирующие рост стеблей и корней, стимулирующие образование корней у проростков.

**Гиббереллины** – фитогормоны (ГК и др.), активизирующие рост стеблей, вызывающие прорастание семян.

**Дедифференциация** – переход специализированных клеток к пролиферации и неорганизованному каллусному росту (утрата клетками специализации).

**Дифференциация** – комплекс процессов, приводящих к различиям между клетками.

**Клональное микроразмножение** или микрклональное размножение – получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному (метод вегетативного размножения растений в культуре *in vitro*).

**Культура зиготических зародышей *in vitro*** – асептическое выращивание на искусственной питательной среде незрелых или зрелых изолированных зародышей.

**Культура корней *in vitro*** – асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней.

**Культура меристем *in vitro*** – асептическое выращивание на искусственной питательной среде изолированного апекса или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями.

**Культура органов *in vitro*** – асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней, стеблевых апексов, незрелых частей цветка, незрелых плодов.

**Культура суспензионная** или культура клеток *in vitro* – асептическое выращивание отдельных клеток или их небольших групп во взвешенном состоянии в жидкой питательной среде.

**Культура тканей in vitro** – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений.

**Меристема** – образовательная ткань с мелкими, активно делящимися клетками.

**Морфогенез in vitro** – процесс формообразования, то есть заложения, роста и развития клеток (цитогенез), тканей (гистогенез) и органов (органогенез) в культуре клеток и тканей in vitro.

**Омнипотентность ядер** – сохранение ядрами соматических клеток растений всех потенций ядра зиготы, то есть сохранение всей генетической информации.

**Пролиферация** – новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

**Регенерация** – восстановление целостного организма из клетки, ткани, органа.

**Редифференциация** – переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

**Ризогенез** – процесс заложения, роста и развития корней.

**Тотипотентность** – свойство соматических клеток полностью реализовать генетический потенциал целого организма.

**Фитогормоны** – (гормоны растений) – биологически активные соединения, образующиеся в растениях в малых количествах, вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект.

**Цитокинины** – фитогормоны (кинетин, 6-БАП), активизирующие развитие меристем, стимулирующие образование почек.

**Эксплант** – фрагмент ткани или органа, инкубируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

### **Библиографический список:**

1. Биохимия растений / Г.-В. Хелдт ; пер. с англ.-2-е изд. (эл.). -М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014, 471 с. - ISBN 978-5-9963-1302-0.
2. Викторов В.П., Черняева Е.В. Интродукция растений; М.: Прометей, 2014, 152 с., - ISBN 978-5-7042-2409-9
3. Генетические основы селекции растений. Частная генетика растений. Том 2, монография/ Кильчевский А.В. [и др.] Минск: Белорусская наука, 2013, 579 с. ISBN 978-985-08-1127-1
4. Генетические основы селекции растений. Том 3. Биотехнология в селекции растений. Клеточная инженерия/ Анохина В.С. [и др.] Минск: Белорусская наука, 2012, 490 с. ISBN 978-985-08-1392-3

5. Генетические основы селекции растений. Том 4. Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетич. инженерия/ Урбанович О.Ю. [и др.]. Минск: Белорусская наука, 654 с. ISBN 978-985-08-1791-4
  6. Гистология, эмбриология, цитология : учебник / Н. В. Бойчук, Р. Р. Исламов, Э. Г. Улумбеков, Ю. А. Чельшев ; под ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Чельшева. - 4-е изд. перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. 944 с. - ISBN 978-5-9704-3782-7.
  7. Кузнецов Вл.В. Физиология растений: Учебник / Вл.В. Кузнецов, Г.А. Дмитриева. - М.: Абрис, 2012, 783 с.: - ISBN 978-5-4372-0046-9.
  8. Методы культивирования клеток: сборник трудов, под ред. Г.П. Пинаева/ Л.: Ленинградское отд. «Наука», 1988, 320 с., ISBN 5-02-026610-8
  9. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия/ Р. Шмид ; пер. с нем.-2-е изд.; М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015, 327 с., - ISBN 978-5-9963-2407-1.
  10. Основы сельскохозяйственной биотехнологии/ Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихонович Т.И. и др., М.: Агропромиздат, 1990, 384 с.,
  11. Патофизиология сельскохозяйственных культур: учебное пособие. - Москва : РГ-Пресс, 2016, 304 с. - ISBN 978-5-9988-0433-5.
  12. Пирузян Э.С., Основы генетической инженерии растений/ М.: Знание, 1988, с. 68, IB – 9163, - 4107000000
  13. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник/ под ред. Академика РАСХН В.С Шевелухи, 3-е изд., М.: «Высшая школа», 2008, 712 с., ISBN 978-5-06-004264-1.
  14. Физиология и биохимия сельскохозяйственных растений / Н.Н. Третьяков, Е.И. Кошкин, Н.М. Макрушин и др.; Под ред. Н.Н. Третьякова. - 2-е изд. - М.: КолосС, 2013, 656 с. - ISBN 5-9532-0185-0.
-

Учебное издание

**КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ**

Игорь Евгеньевич Князьков  
Ольга Николаевна Сахно

Учебное пособие

Подписано в печать 14.12.2016 г.  
Формат 60x80/16. Бумага офсетная  
Печать лазерная. Усл. печ. л. 5,25  
Тираж 300 экз. Заказ №1913

Печатается в авторской редакции с готового оригинал-макета

Отпечатано ООО «Аркаим»,  
Владимир, Б. Нижегородская, 1а  
Тел.: 8 (4922) 32-49-52  
e-mail: [print@arkprint.ru](mailto:print@arkprint.ru)  
[www.arkprint.ru](http://www.arkprint.ru)