

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

ФГБОУ ВПО

«Приморская государственная сельскохозяйственная академия»

Институт землеустройства и агротехнологий

Кияшко Н.В.

ОСНОВЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебное пособие

для студентов очной и заочной форм обучения направлений подготовки

35.03.04 Агрономия, 35.03.07 Технология производства и

переработки сельскохозяйственной продукции

Электронное издание

Уссурийск, 2015

УДК 631.52
ББК 41.3
К 46

Рецензенты:

Барсукова Е.Н. – канд. с.-х. наук, зав. лабораторией биотехнологии ГНУ
Приморский НИИСХ Россельхозакадемии;

Рыженко О.В., канд. с.-х. наук, доцент кафедры земледелия и растение-
водства ФГБОУ ВПО ПГСХА

Кияшко Н.В. Основы сельскохозяйственной
биотехнологии[Электронный ресурс]: учеб. пособие для студентов
К 46 очной и заочной форм обучения направлений подготовки 35.03.04
Агрономия, 35.03.07 Технология производства и переработки
сельскохозяйственной продукции / Н.В.Кияшко; - 2-е изд-е перераб.и
доп.; ФГБОУ ВПО Приморская ГСХА. –Электрон. текст. дан. –
Уссурийск, 2015. – 110 с. - Режим доступа: www.elib.primacad.ru

В учебном пособии приведены содержание и методики выполнения ла-
бораторных работ по клеточной биотехнологии и генетической инженерии.
Изложена современная методика культивирования изолированных клеток и
тканей растений. Особое внимание было уделено растениям, используемым в
сельскохозяйственном производстве. Учебное пособие дополнено контроль-
ными вопросами, содержит словарь терминов.

Материал предназначен для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по направлениям подготовки: агрономия, технология произ-
водства и переработки сельскохозяйственной продукции.

© Н.В. Кияшко, 2015

© ФГБОУ ВПО ПГСХА, 2015

Содержание

Введение	5
Содержание разделов дисциплины	6
Правила по технике безопасности при работе в лаборатории	7
Тема 1. Техника введения в культуру <i>in vitro</i> и культивирование изолированных клеток и тканей растений	8
Работа №1. Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений	11
Работа №2. Методы стерилизации оборудования при проведении работ с культурой изолированных клеток и тканей растений	17
Работа №3. Получение стерильных эксплантов из семян огурца и стерильных проростков из семян гороха, фасоли и кукурузы	20
Тема 2. Культура каллусных тканей	24
Работа №4. Получение и культивирование каллусной ткани из зрелых зародышей пшеницы	28
Работа №5. Получение и культивирование каллусной ткани из фрагментов гипокотыля, листа и семядолей стерильного проростка растения огурца	29
Работа №6. Пассирование каллусной ткани огурца на свежую питательную среду	31
Тема 3. Культура клеточных суспензий и одиночных клеток	33
Работа №7. Получение и культивирование суспензии	36
Работа №8. Подсчёт плотности суспензии	37
Работа 9. Определение степени агрегированности и жизнеспособности суспензии	38
Тема 4. Морфогенез в каллусных тканях	
Гормональная регуляция в культуре клеток и тканей	41
Работа №10. Индукция органогенеза и соматического эмбриогенеза	

в каллусной ткани табака под действием фитогормонов	42
Тема 5. Клональное микроразмножение растений	45
Работа №11. Изолирование и культивирование апикальных меристем картофеля	60
Тема 6. Культура изолированных клеток и тканей в селекции растений	62
Работа №12. Культура изолированных зародышей	68
Тема 7. Основы молекулярной биологии и генетической инженерии	69
7.1 Выделение суммарной ДНК из тканей растений	83
7.2 Выделение ядер и ядерной ДНК из растительных тканей	84
7.3 Выделение хлоропластной и митохондриальной ДНК	85
7.4 Методы анализа ДНК	86
7.5 Генная инженерия	87
Работа №13 Размножение бактериальных штаммов и обращение с ними	90
Работа №14. Выделение плазмидной ДНК из бактерий <i>E. coli</i>	94
Контрольные вопросы для самостоятельной работы	97
Темы рефератов по изучаемой дисциплине	98
Вопросы для подготовки к зачёту по дисциплине	98
Рекомендуемая литература	99
Словарь терминов	101

Введение

Сельскохозяйственная биотехнология - это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных и микроорганизмов с повышенной устойчивостью к стрессовым факторам среды, высокой продуктивностью и качеством продукции, в целях оздоровления экологической обстановки во всех отраслях производства.

Цель дисциплины: формирование необходимых теоретических знаний о методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

Задачи: изучить методы генной инженерии, клеточной инженерии, способы клонального микроразмножения и основы гормональной регуляции.

Требования к уровню освоения содержания дисциплины

Процесс изучения дисциплины направлен на формирование следующих компетенций:

- способностью использовать основные законы естественнонаучных дисциплин в профессиональной деятельности, применять методы математического анализа и моделирования, теоретического и экспериментального исследования;

- готовностью использовать микробиологические технологии в практике производства и переработки сельскохозяйственной продукции.

В результате освоения дисциплины студент должен:

знать: взаимосвязь процессов и объектов назначения и последовательность технологических стадий клонального размножения растений на безвирусной основе, способы получения новых растений с улучшенными свойствами;

уметь: применять практические навыки для организации размножения ценных генотипов, оздоровления растений от вирусов;

Содержание разделов дисциплины:

Раздел № 1. Клеточная, суспензионная и тканевая биотехнология.

Основные направления и задачи биотехнологии. Применение достижений биотехнологии в агропромышленном комплексе. Техника введения в культуру *in vitro*. Условия культивирования изолированных клеток, тканей, клеточных суспензий, органов и протопластов. Культура каллусных тканей. Условия дедифференцировки растительной клетки. Свойства каллусной ткани. Морфогенез в каллусных тканях. Клональное микроразмножение растений, этапы и методы.

Раздел № 2. Основы молекулярной биологии.

Строение и структура нуклеиновых кислот. Репликация ДНК, репарация, процесс генетической рекомбинации. Генетический код, биосинтез белка. Механизм транскрипции и трансляции.

Раздел № 3. Основы генной инженерии.

Выбор гена и его клонирование. Методы трансформации растений и улучшение качества и повышение продуктивности растений методами генной инженерии. Проблемы получения трансгенных растений.

Раздел № 4. Основы гормональной регуляции

Фитогормональная регуляция и саморегуляция у растений. Фитогормоны и синтетические регуляторы роста и развития растений в биотехнологии. Роль фиторегуляции в растениеводстве.

Раздел № 5. Биотехнология микроорганизмов.

Генетические основы биотехнологии в симбиотической азотфиксации. Бобово-ризобияльный симбиоз и симбиозы растений с цианобактериями. Биотехнология кормовых препаратов и дрожжей. Получение кормовых белков, витаминных препаратов, липидов и ферментов.

Правила по технике безопасности при работе в лаборатории

При проведении работ нужно соблюдать общие правила техники безопасности, выполнение которых обязательно для каждого работающего в лаборатории независимо от характера эксперимента.

1. Во время работы в лаборатории необходимо соблюдать чистоту, тишину и порядок.

2. К выполнению каждой работы могут приступать только студенты, прошедшие инструктаж по технике безопасности, что фиксируется в специальном журнале.

3. Рабочее место следует держать в чистоте. Нельзя загромождать его посудой, бумагой и ненужным материалом.

4. При нагревании жидкостей и твёрдых тел в пробирках либо в колбах нельзя направлять отверстие сосуда на себя или на соседей.

5. Категорически запрещается пробовать какие-либо вещества на вкус.

6. При взвешивании запрещено насыпать химические вещества непосредственно на чашку весов.

7. Всю посуду после работы следует сразу же тщательно вымыть.

8. При обращении со стеклянной химической посудой и приборами необходимо соблюдать меры предосторожности. Стеклянную посуду следует держать осторожно, не сжимая её сильно пальцами. Мыть посуду ершами или стеклянной палочкой надо аккуратно.

9. Исследования необходимо проводить в белом халате, чтобы избежать порчи одежды химическими реактивами и для соблюдения стерильности во время работы.

10. Выливать в раковины остатки стерилизующих веществ, отработанные питательные среды строго запрещено.

11. Спиртовую горелку следует содержать в чистоте, вдали от открытых источников огня, не допуская сильного нагревания резервуара; нельзя оставлять зажжённую спиртовку без присмотра.

12. Нагревание растворов и питательных сред необходимо проводить в стеклянной посуде на асбестовой сетке.

13. При попадании кислоты на кожу нужно немедленно её смыть водой и обработать поражённые участки тела мыльным раствором.

14. При возникновении пожара следует немедленно отключить электроприборы, засыпать песком или накрыть одеялом очаг возгорания. Большое пламя тушить с помощью огнетушителя.

15. Если на ком-то загорится одежда, пострадавшего следует облить водой, немедленно положить на пол и накрыть одеялом.

16. По окончании работы необходимо рабочее место привести в порядок, проверить, выключены ли электроприборы и вода в лаборатории.

Тема 1. Техника введения в культуру *in vitro* и культивирование изолированных клеток и тканей растений

Клеточная инженерия (клеточная и тканевая биотехнология) основана на использовании принципиально нового метода – метода изолированной культуры клеток эукариотических организмов (растений, животных).

Выращивание изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах (*in vitro*) в стерильных условиях получило название метода культуры изолированных тканей.

Методы культивирования изолированных фрагментов растений основаны на исследовании важного свойства растительной клетки – тотипотентности.

Тотипотентность (лат. *Totus* – весь, *potentia* – сила) – это свойство клетки реализовать генетическую информацию, обеспечивающую её дифференцировку и развитие до целого организма.

Тотипотентностью обладают оплодотворенные яйцеклетка растений и яйцо животных организмов. 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 способны сохранять плюрипотентность – способность дифференцироваться во все типы клеток как собственно зародыша, так и экстраэмбриональных тканей. Такие клетки получили название эмбриональных стволовых клеток, с ними связывают решение проблемы пересадки тканей.

У растений в природных условиях тотипотентность могут проявлять и специализированные клетки. Пример тому – вегетативное размножение, в том числе наблюдения в результате развития растений из клеток листьев бегонии, каланхое и др.

Тотипотентность у растений реализуется при заживлении ран; на раневой поверхности растений в результате неорганизованной пролиферации клеток происходит развитие каллуса (лат. *Callus* – мозоль, толстая кожа).

Каллус способствует заживлению ран. Однако многие однодомные растения утратили способности к образованию каллуса и вегетативному размножению.

В экспериментальных условиях *in vitro* при выращивании фрагментов тканей, органов (эксплантов) или клеток на искусственных питательных средах возможна реализация супрессированной (подавленной) *in vivo* тотипотентности. Это осуществляется под действием регуляторов роста и развития фитогормонов. Реализация супрессированной *in vivo* тотипотентность легче всего осуществляется как при культивировании меристематических клеток, изолированных из кончиков корней и почек и использования сложных по составу культуральных сред, так и при культивировании каллуса. Эти подходы

были удачно реализованы в 30-е годы в работах американского исследователя Ф.Уайта и французского исследователя Р.Готре, которых принято считать родоначальниками современных методов культивирования изолированных органов и тканей растений.

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в 3 направлениях:

1) связано со способностью изолированных растительных клеток продуцировать ценные для медицины, парфюмерии вещества вторичного синтеза: алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла;

2) использование культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала. Этот метод, названный клональным микроразмножением растений, позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год;

3) использование изолированных клеток в селекции растений, дающее возможность получать быстрорастущие растения, устойчивые к различным неблагоприятным факторам среды: засуха, низкие и высокие температуры, болезни, тяжёлые металлы и т.д. Это направление предусматривает создание новых растений путём слияния изолированных протопластов и получения соматических гибридов. Перенос в изолированные протопласты чужеродных генов методами генной инженерии позволяет получать в дальнейшем растения с новыми наследуемыми свойствами.

Питательные среды для культивирования изолированных клеток и тканей должны включать все необходимые растениям макроэлементы – это N, P, K, Ca, Mg, S, Fe и микроэлементы B, Mn, Zn, Cu, Mo, а так же витамины, углеводы (глюкоза или сахароза в концентрации 2-3%), фитогормоны (ауксины и цитокинины, которые необходимы для деления клеток) или их синтетические аналоги. Кроме того, в состав питательных сред входит ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) или её натриевая соль, которые улучшают доступность железа для клеток. В качестве источников ауксинов в питательных

средах используют 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д), индолил-3-уксусную кислоту ИУК, нафтилуксусную кислоту НУК. В качестве источников цитокининов используют кинетин, 6-бензиламинопуридин БАП, зеатин.

Для приготовления твёрдых питательных сред используют агар-агар, который представляет собой полисахарид, получаемый из морских водорослей.

Для успешного культивирования изолированных клеток и тканей растений необходимо соблюдать определённые условия выращивания. Большинство каллусных тканей не нуждаются в свете, так как не имеют хлоропластов. Влажность в комнате должна составлять 60-70%. Более сухой воздух способствует усыханию питательной среды в пробирках и колбах, если они закрыты ватными пробками и нарушению условий культивирования. Для повышения влажности в комнате ставят поддоны с водой. Оптимальная температура для большинства культивируемых тканей 25-26 градусов.

Работа №1. Приготовление питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей растений

Пояснение. Компоненты среды для выращивания растительных клеток и тканей можно разделить на 6 основных групп, что обычно отражает порядок приготовления концентрированных маточных растворов: макроэлементы, микроэлементы, источники железа, витамины, источники углерода, фитогормоны.

Основой для всех питательных сред для культивирования растительных эксплантов является смесь минеральных солей. Это соединения азота в виде нитратов, нитритов, солей аммония; фосфора – в виде фосфатов; серы – в виде сульфатов; а также растворимых солей K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Mg^{++} . Железо используется в виде хелатов $[FeO_4$ или $Fe_2O_4 + ЭДТА$ (этилендиаминтетрауксусная кислота) или её натриевая соль $Na ЭДТА$ (трилон Б)] – наиболее доступной форме для усвоения растительными тканями.

Азот, фосфор, сера входят в состав органических соединений: белков, жиров, нуклеиновых кислот. Железо, цинк, марганец, молибден, кобальт в сочетании с порфиринами образуют макромолекулы пигментов фотосинтеза (хлорофилла), окислительно-восстановительных ферментов (каталазы, пероксидазы, полифенолоксидазы). Следовательно, все эти соединения выполняют в клетках и тканях структурную функцию. В то же время ионы K^+ , Na^+ , Ca^{++} , Cl^- , H^+ необходимы для регуляции рН среды и поддержания физиологических градиентов клеток (тургора, осмотического давления, полярности).

В качестве источника углерода для биологических макромолекул, а также при культивировании гетеротрофных тканей (калусов и суспензий) в питательные среды добавляют углеводы в концентрации 20-60 г/л. Обычно это дисахариды (сахароза), моносахариды (гексозы: глюкоза и фруктоза, пентозы: ксилоза и другие). Полисахариды в питательных средах практически не используются. Только некоторые типы тканей (опухолевые), содержащие гидролитические ферменты, выращивают на средах с крахмалом, рафинозой, целлобиозой.

Для стимуляции биохимических реакций в клетке используют биологические катализаторы – витамины группы В (В1, В6, В12), С (аскорбиновую кислоту), РР (никотиновую кислоту), мезоинозит.

Тиамин (В1) входит в состав пируватдекарбоксилазы, участвует в превращениях углеводов.

Пиридоксин (В6) в виде фосфорнокислого эфира входит в состав ферментов декарбоксилирования и переаминирования аминокислот.

Никотиновая кислота (РР) в виде амида входит в состав дегидрогеназ НАД и НАДФ, катализирующих донорно-акцепторную цепь H^+ (отнятие H^+ от молекул органических веществ).

Для управления процессами формообразования в культуре тканей необходимы биологические регуляторы роста и развития – фитогормоны. Эти

вещества влияют на дифференциацию и дедифференциацию клеток и тканей, инициируют гистогенез, индуцируют деление и растяжение клеток, участвуют в процессах старения и созревания, либо стимулируют, либо ингибируют рост и развитие клеточных культур, обуславливают формирование пола. В биотехнологических исследованиях чаще используют гормоны, стимулирующие рост и развитие: ауксины, цитокинины, гиббереллины.

Ауксины: ИУК – β -индолил-3-уксусная кислота, ИМК – индолил-3-масляная кислота, НУК – α -нафтилуксусная кислота, 2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиксусная кислота.

Цитокинины: кинетин – 6-фурфуриламинопурин, зеатин, NN-дифенилмочевина, 6-БАП – 6-бензиламинопурин.

Гиббереллины: гибберелловая кислота.

В качестве биологических добавок для индукции первичного каллуса можно использовать растительные экстракты (10-15 % от общего объёма среды): кокосовое молоко (жидкий эндосперм кокосового ореха), вытяжки из незрелых зерновок кукурузы (лучше в период молочной спелости), которые содержат цитокинины – кинетин и зеатин (6-ти замещенные аминопурины) и NN-дифенилмочевину.

В культуре *in vitro* применяют жидкие и агаризованные (твердые) среды. Жидкие среды используются для культивирования суспензий, каллусов, изолированных органов и тканей, растений-регенерантов. При этом для поддержания эксплантов в пробирки со средой помещают специальные мостики-поддержки из фильтровальной бумаги или синтетических пористых материалов.

Агаризованные среды готовят на основе агар-агара – полисахарида, входящего в состав морских водорослей, который образует с водой гель при pH 5,6-6,0. иногда в качестве уплотнителя и заменителя агар-агара используют полиакриламидные гели (биогели) P10 и P200.

В настоящее время известно большое число различных по составу питательных сред, но наиболее часто применяется выращивание изолированных тканей в условиях *in vitro* среда Т.Мурасига и Ф.Скуга (табл.1)

Таблица 1 – Состав питательных сред для культивирования изолированных тканей растений

Компоненты питательной среды	Концентрация, мг/л, питательных сред		
	Мурасиге-Скуга (МС)	Гамборга	Уайта
Na ₂ SO ₄	-	-	200
Ca(NO ₃) ₂	-	-	200
NH ₄ NO ₃	1650	2500	-
KNO ₃	1900	-	80
KCl	-	-	65
CaCl ₂ * 2H ₂ O	440	150	-
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	370	250	360
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	130	-
KH ₂ PO ₄	170	-	16,5
Na ₂ ЭДТА	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ * 7H ₂ O	27,95	27,95	27,95
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	-	150	-
H ₃ BO ₃	6,2	3,0	1,5
MnSO ₄ * 4H ₂ O	22,3	10,0	4,5
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	8,6	2,0	1,5
KI	0,83	0,75	0,75
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	2,5
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,25	0,25	0,0025
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,025	0,025	0,02
CoCl ₂ * 6 H ₂ O	0,025	0,025	-
Глицин	2	-	3,0
Мезоинозит (витамин В8)	100	100	10,0
Никотиновая кислота (витамин В3)	0,5	1,0	0,5
Пиридоксин (витамин В6)	0,5	1,0	0,1
Тиамин (витамин В1)	1	10,0	0,1
Сахароза	30000	30000	20000

Для искусственных питательных сред растворы макро- и микросолей готовят заранее и используют многократно. Это маточные (концентрирован-

ные) растворы. Их хранят в специальных условиях: макро- и микросоли в холодильнике в сосудах с притертыми пробками при 0...+4°C; витамины, фитогормоны, ферменты, растительные экстракты – при -20°C в небольших по 5-10 мл сосудах с пробками (пеницилловые флаконы).

Состав маточного раствора питательной среды Мурасиге-Скуга (МС) представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Состав маточного раствора по МС для приготовления питательной среды

Компоненты	Навеска	Кол-во маточного раствора для приготовления 1 л питательной среды, мл
Макросоли, г на 1 л маточного раствора		
KNO ₃	38	50
NH ₄ NO ₃	33	
KH ₂ PO ₄	3,4	
MgSO ₄ *7 H ₂ O	7,4	
CaCl ₂ *2H ₂ O	8,8	5
Микросоли, мг на 100 мл маточного раствора		
H ₃ BO ₃	620	1
MnSO ₄ * 4H ₂ O	2230	
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	860	
KI	83	
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	25	
CuSO ₄ *5 H ₂ O	2,5	
CoCl ₂ *6 H ₂ O	2,5	
Хелат железа, мг на 100 мл маточного раствора		
Na ₂ ЭДТА	745	5
FeSO ₄	557	

Маточные растворы макросолей обычно превосходят рабочие по концентрации в 10-40 раз, микросолей – в 100-1000 раз, витаминов – в 1000 раз.

Растворы фитогормонов желательно готовить непосредственно перед работой со средами.

Для приготовления маточного раствора макро- и микросолей каждую соль растворяют в отдельном стаканчике при нагревании, затем сливают и доводят до нужного объема. В охлажденную смесь микросолей последним добавляют раствор солей молибдена, а в макросоли – раствор солей магния (для предотвращения выпадения осадка).

Маточные растворы хлористого кальция и хелата железа (сернокислое железо + ЭДТА, либо Na ЭДТА – трилон Б) готовят и хранят отдельно от других солей.

Концентрированные растворы витаминов готовят следующим образом: 10-кратные навески растворяют в 10 мл дистиллированной воды каждый отдельно.

Фитогормоны – это вещества, которые плохо растворяются в воде. Поэтому предварительно 100 мг вещества растворяют в небольших количествах (0,5-2,0 мл) спирта (ауксины, гиббереллины), 0,5-1 н HCl или KOH (цитокнины), затем подогревают до полного растворения (кроме абсцизовой кислоты и кинетина) и доводят до 100 мл объема (1 мл содержит 1 мг вещества).

Материалы и оборудование. Химические стаканы, колбы, мерные цилиндры от 5 мл до 2 л, пробирки, пипетки от 0,01 мл до 10 мл или дозаторы, весы аналитические до 500 г, весы торсионные до 100 мг, пинцеты, ножницы, шпатели, электроплитки, магнитные мешалки, химические реактивы или готовые маточные растворы макро- и микросолей, витаминов, фитогормонов.

Ход работы.

1. В химический стакан емкостью 2 л поместить 20 г сахарозы, долить дистиллированной водой до 400 мл и растворить.

2. Добавить к раствору сахарозы 50 мл маточного раствора макросолей, 1 мл микросолей, 5 мл хелата железа, 5 мл хлористого кальция.

3. Приготовить агар: навеску 7 г поместить в стакан и залить водой до 200 мл, растворить, нагревая плитке или газовой горелке, при постоянном помешивании. Готовый агар долить к раствору солей.

4. Питательную среду довести до нужного объема (1 л) дистиллированной водой. Измерить рН среды: если рН превышает 5,5-6,0 добавить несколько капель 0,1 н HCl, если ниже этого значения – 0,1 н KOH.

5. Готовую питательную среду разлить в пробирки на 5...10 мм объема, закрыть пробирки ватными пробками, поместить пробирки в металлические штативы.

6. Штативы с пробирками завернуть в целлофановую бумагу (чтобы в автоклаве не открылись пробки).

7. Поместить штативы с пробирками в автоклав и проавтоклавить.

Контрольные вопросы:

1. На чём основывается клеточная инженерия?
2. Что такое тотипотентность?
3. Назовите основные компоненты питательных сред
4. Какие вещества используют для управления процессами формообразования в культуре тканей?
5. Как готовят маточные растворы для питательных сред?

Работа №2. Методы стерилизации оборудования при проведении работ с культурой изолированных клеток и тканей растений

Пояснение. Одним из основных условий успешного культивирования изолированных органов, тканей, клеток и протопластов является соблюдение строгой стерильности. Питательная среда является прекрасным субстратом для развития в ней микроорганизмов, а изолированные от растения фрагменты (экспланты), которые помещают на питательную среду, легко поражаются микроорганизмами. Поэтому надо стерилизовать как эксплант, так и питательную среду. Все манипуляции с изолированными тканями (введение в культуру, пересадка на свежую питательную среду) проводят в асептическом помещении стерильными инструментами. Стерильность надо соблюдать и во время культивирования изолированных тканей, особенно при перепаде тем-

пературы и влажности, так как при этом пробки становятся влажными и по ним в пробирку могут проникать микроорганизмы.

Стерилизация ламинар-бокса. Ламинар-боксы предназначены для культивирования изолированных клеток, тканей и некоторых других работ, требующих стерильности, которая обеспечивается с помощью бактериальных воздушных фильтров. За 40...60 мин до начала работы ламинар-бокс облучают бактерицидными ультрафиолетовыми лампами.

Перед началом работы следует вымыть руки с мылом, надеть латексные перчатки, и стерильный халат, завязать волосы стерильной марлевой косынкой.

Стерилизация посуды. Посуду тщательно моют с использованием детергентов, а также раствора дихромата калия в серной кислоте (хромпик). Детергент (лат. *Detergeo* — «стираю») — вещество или смесь, помогающее отмывать что-либо от грязи, моющее средство. Наиболее распространены три вида смесей-детергентов: мыло, стиральный порошок и шампуни.

Вымытую посуду трижды ополаскивают дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. Чтобы избежать заражения простерилизованных предметов из воздуха, перед стерилизацией их заворачивают в оберточную бумагу или фольгу (у стаканов, колб достаточно обернуть только горлышко).

Затем посуду помещают в сушильный шкаф и прогревают при 160 °С в течение 2 ч.

Стерилизация инструментов. Предварительная стерилизация инструментов (скальпелей, пинцетов, игл) заключается в нагревании их сухим горячим жаром в сушильном шкафу в течение 2 ч при 160...200 °С. Шприцы, ножницы, пробочные свёрла удобнее кипятить. Металлические предметы нельзя автоклавировать, так как под действием пара они ржавеют и тупятся. Непосредственно перед работой и в процессе работы инструменты ещё раз стерилизуют в ламинар-боксе, помещая их в фарфоровый стакан с 96%-ным эти-

ловым спиртом, обжигая в пламени спиртовки. Стерильный инструмент используют только для одноразовой манипуляции. Перед повторным употреблением его следует снова простерилизовать спиртом и обжечь. Очень тонкие инструменты – иглы, кусочки лезвий могут терять свои свойства при обжигании, поэтому их стерилизуют, погружая в спирт.

Стерилизация материалов. Вату, марлю, ватные пробки, бумажные матрасики, фильтровальную бумагу, халаты, косынки стерилизуют в автоклаве под давлением 2 атм в течение 25...30 мин.

Материалы и оборудование. Чашки Петри, колбы с дистиллированной водой, штативы с пробирками, заполненными питательной средой, препарировальные иглы, пинцеты, скальпели, вата, марля, бумага: фильтровальная и целлофановая.

Ход работы.

1. Металлические инструменты поместить в металлическую биксу и поставить в сушильный шкаф для стерилизации сухим жаром при $t^{\circ} 170-200^{\circ}\text{C}$ в течение 2 часов.

2. Чашки Петри, штативы с пробирками, заполненными питательной средой, вату, марлю, фильтровальную бумагу, колбы с дистиллированной водой (закрытые фольгой) завернуть в плотную крафт-бумагу и поместить в автоклав.

3. Автоклав привести в рабочее состояние: закрыть плотно крышку, воду залить до метки. Включить автоклав, давление пара довести до метки 1,2 атм. (в паровой камере), заполнить паром стерилизационную камеру, вытеснить конденсат в течение 10 минут, при этом давление пара в стерилизационной камере должно быть на уровне 0,1-0,2 атм. Довести давление в стерилизационной камере до 1 атм., включить автоматический режим.

4. Автоклавировать 20 минут при давлении в стерилизационной камере 1-1,2 атм.

5. Отключить автоклав, вытеснить пар из обеих камер довести давление до 0 атм.

6. Проавтоклавированные материалы перенести в комнату для пересадки тканей и поместить в шкафы или на стеллажи.

Работа №3 Получение стерильных эксплантов из семян огурца и стерильных проростков из семян гороха, фасоли и кукурузы

Пояснение. *Стерилизация растительного материала.* Для стерилизации семян, верхушечных меристем, кусочков ткани, выделенных из различных частей растения, применяют следующие растворы: 13...20%-ного пероксида водорода, 10%-ного хлорамина, 8%-ного гипохлорита натрия или кальция.

Перед стерилизацией ткань растения предварительно очищают. Корнеплоды, клубни, толстые стебли растений тщательно моют щёткой с мылом в тёплой проточной воде, снимают кожуру (у корней и корнеплодов), кроющие чешуи (у листьев), промывают дистиллированной водой и опускают на несколько секунд (семена на 1...2 мин) в 70%-ный этиловый спирт. Затем растительные объекты многократно прополаскивают в стерильной воде.

Пероксид водорода рекомендуется использовать для фасоли, люпина, подсолнечника, сулему – для томатов, тыквы. Продолжительность стерилизации семян, пероксидом водорода составляет 30 мин, для меристем и кусочков тканей требуется примерно в 2 раза меньше времени. Продолжительность стерилизации растительного материала приведена в таблице 3.

Стерилизация питательных сред. Разлитые в пробирки или стеклянные колбы питательные среды закрывают ватными пробками или фольгой, завёртывают в целлофан и автоклавируют при 120 °С и давлении 1 атм в течение 20 мин.

Холодная стерилизация. Если в состав питательной среды входят вещества, разрушающиеся при высокой температуре, то их подвергают холодной стерилизации, пропуская через бактериальные фильтры. Органические жид-

кости не поддающиеся тепловой обработке, гормоны также пропускают через бактериальные фильтры.

Таблица 3 – Продолжительность стерилизации, мин, исходного растительного материала (по Р. Г. Бутенко)

Объект	Диацид* 0,1%-ный	Сулема* 0,1%-ная	Гипохлорит натрия 5...9%-ный	Пероксид водорода 12%-ый
Семена сухие	15...20	10...15	15...20	12...15
Семена набухшие	6...10	6...8	10...15	6...8
Ткани мясистого корня клубня	20...30	15...25	15...20	-
Ткани одревесневшего стебля	20...40	20...25	20...25	-
Листья	1...3	1...3	3...6	3...5
Апексы	1...10	1...7	3...15	2...7

Примечание: диацид и сулема – ртутьсодержащие препараты и в настоящее время почти не используются.

Получить стерильный материал из семян огурца селекционных образцов часто бывает достаточно трудно, что связано с необходимостью правильного выбора стерилизующего агента. Как правило, стерилизующее вещество должно обеспечивать наибольший процент неповреждённых тканей под семенной оболочкой, способных к росту и новообразованиям при наименьшем проценте инфекции.

Перед стерилизацией семена промывают на сите тёплой проточной водой, затем помещают в марлевые мешочки, в которые кладут этикетки с указанием номера генотипа. После этого марлевые мешочки вносят в стерильный бокс, где последовательно проводят все операции по стерилизации.

Материалы и оборудование. Семена огурца, гороха, фасоли, кукурузы (по 10 шт.), стерильные чашки Петри с 1-2 слоями фильтровальной бумаги, химические стаканы, пробирки, пинцеты, ножницы, марлевые мешочки, кол-

бы на 250 мл со стерильной дистиллированной водой, коническая колба на 300...500 мл, дно которой покрыто ватой или фильтровальной бумагой, пробирки с питательной средой МС (1/2 нормы) без гормонов, 10%-ный раствор хлорамина, 70%-ный этиловый спирт, спиртовка, спички.

Ход работы.

1. Отобрать по 10 семян огурца, тщательно промыть в мыльном растворе, а затем под проточной водой.
2. Поместить семена в марлевые мешочки и погрузить на 10 с в 70%-ный этиловый спирт.
3. Поместить семена в раствор хлорамина (10%-ный) или перекиси водорода (13-18%-ный) на 10...15 мин.
4. Промыть семена в 3...5 объёмах стерильной дистиллированной воды и слегка подсушить.
5. Пинцетом разложить по 10 семян в чашки Петри на 1-2 слоя фильтровальной бумаги и добавить по 10...15 мл стерильной воды, закрыть крышками.
6. Подготовленные в чашках Петри семена проращивают в термостате при 25 °С или в световой комнате в течение 2...3 суток.
7. В рабочей тетради зарисовать схему процесса стерилизации, заполнить таблицу 4, с указанием стерилизующего агента, его концентрации и экспозиции для стерилизации семян огурца.

Таблица 4 – Характеристика методов стерилизации семян огурца

Метод стерилизации	Стерилизующее вещество	Концентрация, %	Экспозиция, мин или сек
Предстерилизация			
Стерилизация			
Постстерилизация			

Получение стерильных проростков из семян гороха, фасоли или кукурузы.

Стерильные проростки выращивают с целью изолирования эксплантов для получения каллусной ткани или прямой регенерации растений.

Ход работы

1. Отобрать по 10 здоровых, одинаковых по размеру семян гороха, фасоли и кукурузы, тщательно промыть в мыльном растворе, затем водопроводной и дистиллированной водой.

2. Поместить семена в марлевые мешочки и погрузить на 1...2 мин в 70%-ный спирт, после чего стерилизовать 10%-ным раствором хлорамина в течение 15 мин.

3. Промыть семена в стерильной дистиллированной воде, сменяя её 5...6 раз.

4. С помощью стерильного пинцета разложить семена в стеклянную колбу на смоченную стерильной водой фильтровальную бумагу (мелкие семена можно проращивать в чашках Петри), а часть семян разложить на агаризованную безгормональную питательную среду МС в одну пробирку по одному семени.

5. Пробирки, колбы и чашки Петри с семенами поставить в термостат или световую комнату на 5 дней, где поддерживают температуру 25°C.

Контрольные вопросы.

1. Как простерилизовать посуду, дистиллированную воду, инструменты, помещение лаборатории?
2. Как стерилизуют питательные среды?
3. Для чего предназначены ламинар-боксы?
4. Какие стерилизующие растворы используют для растительных эксплантов?
5. Как получают стерильные проростки и для чего их используют?

Тема 2. Культура каллусных тканей

Культура изолированных тканей обычно бывает представлена каллусными тканями, состоящими из дедифференцированных клеток.

Каллусная культура – это неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из дедифференцированных клеток. В дальнейшем они специализируются как каллусные, т.е. становятся особым образом дифференцированными.

Каллусную ткань можно получить на искусственных питательных средах, включающих фитогормоны, из различных частей растений: корней, стеблей, тканей клубня, листа, зародыша.

Каллус, что означает «мозоль», может образовываться как на изолированных кусочках ткани (эксплантах) *in vitro*, так и на растении при поранении. Каллусная ткань *in vitro* в основном бывает белого или желтоватого, реже светло-зелёного цвета. Тёмно-коричневая окраска возникает чаще при старении каллусных клеток.

Молодые ткани (гипокотили, семядоли, незрелые зародыши, соцветия) более пригодны для получения каллуса, чем зрелые. Семена представляют собой хороший исходный материал в следующих случаях: 1) для получения каллуса путем посадки целых семян на агаризованную среду; 2) для получения из прорастающих семян, помещенных на агаризованную среду без гормонов, стерильных корней, побегов или листьев, которые затем используются как экспланты; 3) для изолирования тканей зародышевого корня и зародышевой почки непосредственно из семян и дальнейшего их использования в качестве экспланта.

Особенности дедифференцировки клеток экспланта и каллусогенеза зависят от эпигенетических характеристик составляющих его тканей. Клетки запасющей паренхимы корня и стебля, мезофилла листа и других специализированных тканей, эксплантированных на питательную среду, содержащую минеральные соли, источники углерода, витамины и гормоны, должны де-

дифференцироваться, т.е. потерять структуру, характерную для их специфических функций в растении и вернуться к состоянию делящейся клетки. Как правило, на стадии G1 клетки могут выйти из цикла деления (митотического цикла) и перейти в дифференцированное состояние и соответственно на этой же стадии вернуться в цикл при дедифференцировке и индукции их к делению.

При изучении молекулярных механизмов дедифференцировки, действия гормонов и других факторов, индуцирующих деление, неважно, в какой фазе клеточного цикла клетка перешла к дифференцировке, т.е. с какой фазы ей предстоит двигаться повторно по циклу. Часто эксплант, используемый для получения каллуса, является фрагментом органа и включает ткани, клетки которых различно дифференцированы.

Каллусные культуры, полученные из отрезков органов, таких, как корни, стебли, могут возникать из разных типов клеток, присутствующих в исходной ткани. Так, взятый целиком фрагмент стебля имеет в своем составе клетки – эпидермальные, первичной коровой паренхимы, камбия и сосудистой системы, сердцевинной паренхимы. В разных условиях культивирования и в зависимости от различий в физиологическом состоянии исходного растения можно наблюдать преимущественную пролиферацию клеток камбия и его молодых дериватов, коры и сердцевинной паренхимы. Различное тканевое происхождение первичных каллусных клеток является одной из причин гетерогенности культуры каллусной ткани, так как некоторые функциональные особенности исходных клеток передаются в ряду клеточных поколений как стойкие модификации или эпигенетически наследуемые признаки.

Размер и форма исходного экспланта до определенных пределов не оказывают влияния на пролиферацию каллуса, хотя существует минимальный критический размер, уменьшив который, нельзя вызвать рост экспланта. Экспланты из флоэмы корней моркови массой всего 3,8 мг вполне жизнеспособны.

собны для активного роста каллуса, тогда как экспланты такой же массы клубней земляной груши не жизнеспособны. Это зависит, очевидно, от размеров и, следовательно, числа клеток у этих двух типов эксплантов.

Для получения каллуса в асептических условиях экспланты переносят на агаризованную среду и слегка вдавливают в агар для обеспечения хорошего контакта со средой. Кончики корней легко образуют каллус, если они помещены на агар горизонтально, тогда как сегменты стебля лучше образуют каллус, если их поместить вертикально, одним из концов погрузив в агар. Чашки Петри запечатывают с помощью парафилма, чтобы предотвратить высыхание. Для индукции каллуса экспланты обычно инкубируют в темноте при 25°C. В клетках экспланта, состоящего из неделящихся, специализированных клеток, в самом начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, вызываемые и травматическими синтезами, и дедифференцировкой, и подготовкой к процессу деления. В готовящейся к делению клетке стимулируется синтез всех форм РНК, исчезают тканеспецифичные белки-антигены и появляются белки, специфичные для делящихся клеток и каллусной ткани. Эти наблюдения свидетельствуют об изменениях в активности генов и белкового аппарата клеток при дедифференцировке.

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

- 1) рыхлой, состоящей из сильно оводнённых клеток, легко распадающейся на отдельные мелкие агрегаты;
- 2) средней плотности, с хорошо выраженными меристематическими очагами;
- 3) плотной, в которой дифференцируются элементы камбия и проводящей системы.

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения её в каллусную является присутствие в питательной среде фи-

тогормонов ауксинов и цитокининов. Ауксины вызывают процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий её к делению, а цитокинины - пролиферацию, то есть деление клеток. Если в питательную среду без гормонов поместить кусочек стебля, листа, корня без верхушки, состоящие из дифференцированных клеток, то деления клеток не произойдёт и каллусная ткань не образуется. Каждая клетка проходит 3 фазы роста: 1) деление; 2) растяжение; 3) 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, нужно чтобы произошла их дедифференцировка, т.е. клетки как бы возвратились в меристематическое состояние. Размножение таких клеток приводит к неорганизованному росту, в результате чего образуется каллусная ткань. При переходе дедифференцированной клетки к неорганизованному размножению, приводящему к образованию каллусной ткани, в клетках происходят биохимические и цитологические изменения. Дедифференцировка начинается с использования запасных веществ и разрушения специализированных клеточных органелл. Через 6-12 часов после этого клеточная стенка разрыхляется и разбухает, увеличивается число свободных рибосом, а так же размеры и число ядрышек. Все эти изменения предшествуют началу делений, которое начинается через 48-72 ч.

Каллусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки, включая деление, растяжение и дифференцировку, после чего наступает старение и отмирание клетки.

Для того чтобы не произошло старения, утраты способности к делению и отмирания каллусных клеток первичный каллус, возникающий на эксплантах, через 4-6 недель переносят на свежую питательную среду. Эту операцию называют пассированием. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение десятков лет.

Ростовая кривая каллусных клеток имеет S-образную форму, рис. 1.



Рис.1 Модельная S-образная кривая роста

Кривая роста включает 5 фаз. Во время 1 латентной или лаг-фазы увеличения числа или массы клеток не происходит. Клетки в этот период подготавливаются к делениям. 2 фаза – логарифмическая или экспоненциального роста характеризуется наибольшей митотической активностью и увеличением массы каллусной культуры, рост происходит с ускорением. 3 фаза – линейная, в которой скорость роста клеток постоянна. Затем наступает 4 фаза – замедленного роста, когда митотическая активность клеток резко снижается. В 5-й - стационарной фазе – ростовая кривая выходит на плато. Начинается деградация клеток, в целом скорость нарастания клеточной массы равна нулю. После этой фазы наступает отмирание (деградация) клеток, во время которой число и масса живых клеток уменьшается - 6 фаза.

Работа №4. Получение и культивирование каллусной ткани из зрелых зародышей пшеницы

Пояснение. Каллусную ткань, полученную из зародышей пшеницы, используют для исследований по клеточной селекции на солеустойчивость, за-

сухоустойчивость, устойчивость к другим неблагоприятным факторам абиотической и биотической природы. Она может быть использована для получения суспензионной культуры, изолированных протопластов, растений-регенерантов, а также для количественного и качественного исследования вторичных метаболитов.

Материалы и оборудование. Замоченные в течение 1 сут зрелые семена пшеницы, стерильные пинцет, скальпель, матрасики или чашки Петри, пробирки или чашки Петри со средой МС с добавлением 2,4-Д 3 мг/л, мезоинозит 100 мг/л, 6-бензиламинопурина 0,5 мг/л и сахарозы 30000 мг/л, агар, спиртовка, спирт, спички.

Ход работы.

1. Для получения каллуса из зрелых зародышей пшеницы семена, замоченные за 1 сут до начала работы, стерилизовать.
2. Тщательно промыть 5 раз стерильной дистиллированной водой, разложить на стерильный матрасик и скальпелем изолировать зародыш.
3. Изолированные зародыши поместить на агаризованную питательную среду МС в пробирки или чашки Петри.
4. Культивировать зародыши в климакамере или световой комнате при температуре 25 °С.
5. Через 3 недели рассмотреть и зарисовать образовавшийся каллус.

Работа №5. Получение и культивирование каллусной ткани из фрагментов гипокотыля, листа и семядолей стерильного проростка растения огурца

Пояснение. Для каллусогенеза пригодны все части растения, но ткани стебля наиболее легко образуют каллус и их значительно легче ввести в стерильную культуру. Культивирование фрагментов семядолей, листьев и гипо-

коти́лей огу́рца на пита́тельных средах определённого состава приводит к следующим морфогенетическим процессам: образованию эксплантом первичного каллуса с последующей регенерацией адвентивных почек; к образованию меристематических очагов в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Каллусная ткань огурца, образованная в условиях *in vitro* обычно имеет тёмно-зелёный, тёмно-жёлтый или жёлто-зелёный оттенок. По консистенции каллус огуречного растения близок к желеобразному и рыхлому.

Материалы и оборудование. Чашки Петри с 7-дневными стерильными проростками огурца, фарфоровый стаканчик с 96%-ным этанолом, стерильные скальпели, матрасики или чашки Петри, спиртовка, спички, колба с модифицированной средой МС для каллусогенеза огурца с добавлением сахарозы 30000 мг/л, 6-бензиламинопурин 0,5 мг/л, НУК 0,1 мг/л, гидролизат казеина 200 мг/л, глицин 100 мг/л, агар.

Ход работы.

1. Чашки Петри с пророщенными семенами огурца протереть спиртом, снять крышку и пинцетом вынуть стерильные проростки (2...3 штуки) на матрасик или чашку Петри.
2. Острым скальпелем вырезать участки гипокотилия, семядоли и листа длиной 1,5...2 см.
3. Колбу со стерильной средой МС нагреть на электроплитке до расплавления агара.
4. Затем колбу открыть, горлышко обжечь над пламенем спиртовки.
5. В стерильные чашки Петри разлить питательную среду по 15 мл и сразу закрыть крышками.
6. Пинцет обжечь над пламенем спиртовки. Экспланты разместить на поверхности застывшей агаризованной среды, после чего закрыть крышками и поставить в световую комнату

7. Культивировать при 26 °С, влажности 70%.
8. Через 1 неделю рассмотреть и зарисовать образовавшийся каллус, заполнить таблицу 5.

Таблица 5 – Каллусогенез и органогенез эксплантов, изолированных от стерильных проростков огурца

Первичный эксплант	Количество эксплантов, шт.		Число каллусов, образующих	
	высажено	образовали каллус	корни	зачатки стеб- ля
Гипокотиль				
Семядоли				

Работа №6. Пассирование каллусной ткани огурца на свежую питательную среду

Пояснение. После того как на сегменте экспланта образовался хороший каллус, его изолируют и переносят на свежую питательную среду для самостоятельного роста в культуре. У огурца этот процесс продолжается 2...3 недели. Первичные каллусы в стерильных условиях делят скальпелем на кубики массой 100 мг. Частота дальнейших пассажей зависит от скорости роста каллусной ткани, диаметра культурального сосуда и количества питательной среды. Обычно при пассировании культуры огурца ткань часто погибает после 3-4 пассажей. Чтобы этого не происходило, к питательной среде с минеральной основой МС добавляют витамины, ауксины и растительные экстракты.

Материалы и оборудование. Культура каллусной ткани в чашках Петри из предыдущей работы, чашки Петри со стерильной агаризованной средой МС для пересадки каллусной ткани с добавлением сахарозы 30000 мг/л, 6-бензиламинопурина 0,8 мг/л, НУК 1,0 мг/л, гидролизат казеина 200 мг/л, гли-

цин 100 мг/л. Стерильные чашки Петри, пинцеты, скальпели, бумажный матрасик, спиртовка, спички, 70%-ный и 96%-ный этанол, торсионные весы.

Ход работы.

1. Чашку Петри с каллусной культурой открыть и стерильным пинцетом извлечь каллус.
2. На стерильной чашке Петри его разделить скальпелем на кусочки массой до 100 мг и поместить на поверхность агаризованной питательной среды МС (по 5 шт. в каждой).
3. Закрыть крышками и поставить в световую комнату.
4. Через 1 неделю растущие каллусные культуры описать, заполняя таблицу 6.

Таблица 6 – Характеристика каллусной ткани огурца в зависимости от выбранного экспланта

Эксплант, образовавшийся каллус	Интенсивность каллусообразования, %	Цвет каллусной ткани	Консистенция	Сырая масса, мг	
				в начале пассажа	в конце пассажа
Гипокотиль					
Семядоли					

Контрольные вопросы.

1. Что такое каллусная ткань? Как получить каллусную ткань и каковы возможности её использования в биотехнологии?
2. Что такое дедифференцировка клеток и почему она является обязательным условием перехода специализированных клеток к делению и каллусообразованию?
3. Какие гормоны являются индукторами дедифференцировки?
4. Почему каллусную ткань необходимо пассировать на свежие питательные среды?

Тема 3. Культура клеточных суспензий и одиночных клеток.

Культуры клеток растений, выращиваемые в жидкой питательной среде, обычно называют суспензионными культурами. Отдельные клетки, небольшие группы или достаточно крупные агрегаты (более 50 клеток) выращивают во взвешенном состоянии в жидкой среде. Применяют различные аппараты и способы поддержания их в таком состоянии. Начальный момент получения суспензионной клеточной культуры является событием случайным. Это означает, что только клетки, которые по ряду причин способны к перестройке метаболизма и размножению с высоким коэффициентом в конкретных условиях суспензионного культивирования, образуют «хорошие» линии. Важными характеристиками таких линий является высокая степень дезагрегации (5-10 клеток в группе), морфологическая выравненность клеток (небольшие размеры, сферическая или слегка овальная форма).

Выращивание клеточных суспензий в жидкой питательной среде имеет ряд преимуществ перед выращиванием каллусных тканей поверхностным способом. Эти культуры представляют собой относительно гомогенную популяцию клеток, поэтому можно получать хорошо воспроизводимые результаты по влиянию экзогенных факторов на метаболизм и рост клеточных популяций. Суспензионные культуры клеток широко используются в качестве модельных систем для изучения путей вторичного метаболизма, индукции ферментов и связи их с событиями клеточного цикла, экспрессии и репрессии отдельных генов, деградации чужеродных соединений, а также как исходный материал для очистки ферментов. Важным их преимуществом при выделении ферментов или продуктов вторичного метаболизма является отсутствие у большинства суспензионных культур хлорофилла и каротиноидных пигментов.

Суспензию клеток можно получить из каллуса, поместив его в жидкую питательную среду. Используя фермент, например пектиназу, получаем сус-

пензионную культуру непосредственно из ткани экспланта (лист, стебель, корень). Вначале на поверхности экспланта образуется каллусная ткань, а затем уже от неё отделяются клетки, в результате чего получается клеточная суспензия. Для получения 100 мл клеточной суспензии необходимо 2...3 г свежей каллусной ткани.

Необходимым условием культивирования клеточных суспензий является постоянное перемешивание или встряхивание среды. Если клеточная суспензия находится в неподвижном состоянии, то деление суспензионных клеток приводит к образованию каллусной ткани.

Деление суспензионных клеток поддерживается при наличии ауксинов и цитокининов. Таким образом, суспензионные культуры представлены типичными каллусными клетками, обладающими всеми свойствами, характерными для клеток такого рода.

Суспензии лучше образуются из рыхлой каллусной ткани, получаемой на средах с 2,4-Д. Ещё более интенсивно этот процесс идёт при добавлении в среду фермента пектиназы.

Клеточные суспензии в биотехнологии используются для получения вторичных метаболитов, многие из которых являются ценными лекарственными препаратами. Наряду с этим, суспензии клеток можно применять в качестве исходного материала для получения изолированных протопластов.

Для генетических и физиологических исследований, а также для практического использования в клеточной селекции очень ценным является культивирование отдельных клеток. Одиночная гибридная клетка, выделенная из культуры изолированных протопластов, при дальнейшем её делении позволяет получить клон, состоящий из гибридных клеток. Это намного облегчает работу исследователя, т.к. устраняет необходимость отбора потомства в культуре изолированных протопластов от негибридных, что представляет значительные трудности. Кроме того сам процесс соматической гибридизации лучше наблюдать, если работа ведётся с одиночными протопластами.

Трудности культивирования одиночных клеток связаны с тем, что отдельная клетка не делится в тех условиях, в которых хорошо растёт каллусная ткань. Для того чтобы заставить их делиться, разработаны специальные методы, один из них метод «няньки», предложенный в 1960 г. Джонсоном, при котором функцию «няньки», стимулирующей деление одиночной клетки, выполняют кусочки каллусной ткани, отделённые от неё фильтровальной бумагой. В присутствии их одиночная клетка делится и даёт индивидуальную колонию клеток – клон.

Для клеточных делений у одиночной клетки можно использовать также «кормящий слой» (активно делящиеся клетки суспензионной культуры того же вида растения, что и одиночная клетка), рис. 2

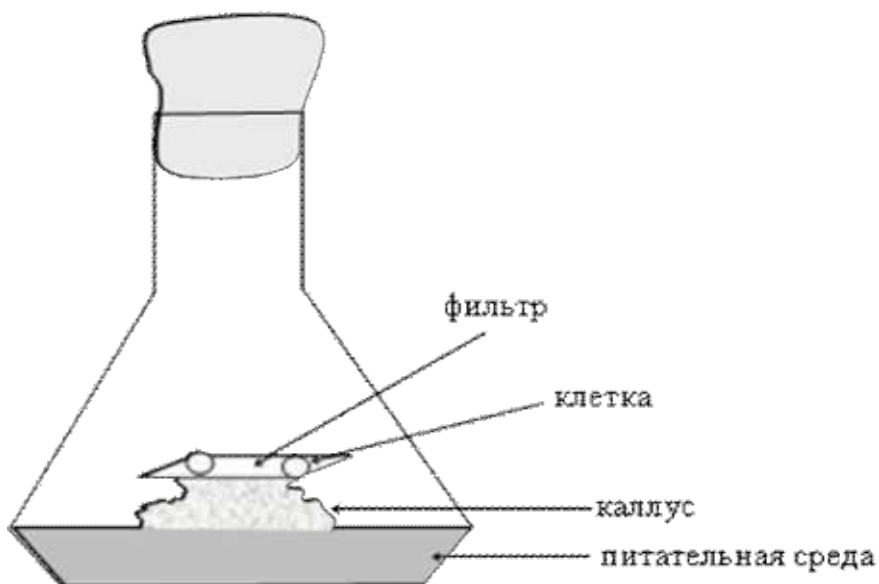


Рис. 2. Использование в качестве «няньки» культуры суспензионных клеток при выращивании изолированных протопластов и одиночных клеток.

Стимулирует клеточное деление и кондиционирование среды, для чего в неё добавляют питательную среду от интенсивно делящейся культуры клеток. Кондиционирующий фактор получают при фильтровании клеточной суспензии в экспоненциальной фазе роста через бактериальный фильтр.

Выделяют одиночные клетки из клеточных суспензий, из тканей растений, например, из мезофилла листа после его мацерации ферментами, из

культуры изолированных протопластов после восстановления клеточной стенки. Для получения одноклеточной фракции суспензионной культуры иногда достаточно простого отстаивания в колбе в течение 15-30 мин. При этом крупные агрегаты оседают на дно, а надосадочная фракция содержит только одиночные клетки или мелкие агрегаты. Если при отстаивании не удаётся получить одноклеточную фракцию, то применяют мацерирующие ферменты (целлюлаза, амилаза, протеаза) или фильтрование через сита нейлоновые или металлические.

Работа №7. Получение и культивирование суспензии

Пояснение. Для инициации суспензионной культуры необходимо 2–3 г свежей рыхлой массы каллусных клеток на 60–100 мл жидкой питательной среды. Первичную суспензию культивируют в колбах с жидкой питательной средой на круговых качалках со скоростью 100–120 об./мин.

Модельная кривая роста суспензии имеет S-образную форму и включает: лаг-фазу, экспоненциальную фазу, стационарную фазу и фазу деградации. Форма реальных ростовых кривых отличается продолжительностью фаз. Это зависит от генетики популяции, количества инокулюма и состава питательной среды. Скорость нарастания биомассы колеблется от 15 до 70 суток.

Материалы и оборудование. Ламинар-бокс, пробирки с рыхлыми каллусами табака (среда МС+2,4-Д 2 мг/л), колбы с питательной средой для инициаций суспензии, магнитные мешалки, стерильные инструменты, флакон с 96 % спиртом.

Ход работы.

1. В асептических условиях извлечь каллус из пробирки и поместить в колбу с питательной средой, из расчета 2–3 г на 100 мл среды: 1. МС+2,4-Д, 2. МС+ИУК, 3. МС+ИУК+6-БАП, 4. МС без гормонов.

2. Колбы с суспензией поместить на круговые качалки при 100–120 об./мин. и оставить на 2 недели.

3. Результаты культивирования суспензии на различных по составу средах зарисовать и сделать выводы.

Работа №8. Подсчёт плотности суспензии

Пояснение. По плотности суспензии можно не только охарактеризовать состояние клеточной популяции, но и определить время субкультивирования (отбора инокулянта и пересадки на свежую питательную среду). В большинстве случаев суспензию для субкультивирования отбирают в конце экспоненциальной фазы (через 14-16 дней после начала культивирования). При построении кривой роста показатели снимают через день. Плотность суспензии за 2-3 недели культивирования возрастает в 20 раз. Клетки суспензий удобнее всего подсчитывать в специальных счетных камерах Фукса-Розенталя /гемоцитомерах/. Для подсчета клеток суспензии иногда используют временные препараты, но это более трудоемкий процесс: значительно увеличивается число повторностей.

Объем выборки должен составлять не менее 1000 клеток. Подсчет клеток затрудняется, если в суспензии преобладает фракция агрегатов. В таких случаях к 1 объему культуры добавляют 2 объема 8 % оксида хрома и нагревают до 70°C в течение 2-15 минут. После охлаждения культуру встряхивают, чтобы распались агрегаты. Для разрушения агрегатов в суспензию добавляют пектиназу – 0,25 % объема.

Плотность суспензии можно определить и по соотношению объема биомассы к общему объему суспензии. Измеряют средний объем клетки и получают число клеток в 1 мл суспензии.

Материалы и оборудование. Микроскоп, центрифуга, колба с суспензией, стерильная пипетка, предметное стекло, покровное стекло, камера для подсчета элементов крови, фильтровальная бумага.

Ход работы.

1. Колбу с суспензией встряхнуть и отобрать пипеткой несколько мл суспензии.
2. 1 мл суспензии смешать с 2 мл 8 % оксида хрома и поставить на 15 минут в термостат при температуре 70° С.
3. Смесь пропустить 3 раза через шприц с толстой иглой (пипетировать).
4. Камеру Фукса-Розенталя заполнить суспензией.
5. Подсчитать клетки под микроскопом.
6. Плотность суспензии рассчитать по формуле:

$$X = \frac{M \cdot n \cdot 1000}{3,2} ,$$

где X – число клеток в мл,

M – среднее число клеток в камере,

n – разведение.

Работа №9. Определение степени агрегированности и жизнеспособности суспензии

Пояснение. В зависимости от целей исследования условия культивирования и состав питательной среды подбирают так, чтобы в суспензии преобладала определенная фракция клеток. Обычно в суспензии различают 4 основные фракции: одиночные клетки, мелкие агрегаты, средние агрегаты, крупные агрегаты. Степень агрегированности определяют, подсчитывая клетки в нескольких полях зрения на временных препаратах под малым увеличением микроскопа (не менее 1000 клеток).

При работе с суспензиями необходимо учитывать и ее жизнеспособность. О жизнеспособности клеток можно судить по движению цитоплазмы, по степени проницаемости клеточной стенки для красителей, по активности ферментов.

Прижизненные красители, такие как метиленовый синий, клетки не убивают и через оболочки живых клеток в цитоплазму не проникают. Суспензия считается жизнеспособной, если более 70 % клеток не окрашиваются в синий цвет; агрегат жизнеспособен, если более 50 % его клеток не окрасились.

Для количественного определения жизнеспособности суспензии используют вещества, участвующие в метаболизме клетки: флуоресцеиндиацетат расщепляется в клетке эстеразами с образованием флуоресцеина, дающего флуоресценцию цитоплазмы живых клеток. Активность эстеразы определяют на спектрофотометре. Окрашивание клетки солями тетразоля позволяет определить интенсивность дыхания клетки.

Материалы и оборудование. Микроскоп, флакон с 0,1 % раствором метиленового синего, предметные и покровные стекла, фильтровальная бумага, дистиллированная вода, марлевые салфетки, пипетки.

Ход работы.

1. Приготовить препарат суспензии: встряхнуть суспензию в колбе, пипеткой отобрать небольшое количество суспензии, поместить каплю суспензии на предметное стекло, добавить каплю красителя, накрыть покровным стеклом, излишки жидкости убрать фильтровальной бумагой.
2. Поместить препарат на столик микроскопа под малое увеличение объектива и подсчитать клетки и агрегаты в 3-х полях зрения (просмотреть не менее трех препаратов).
3. Результаты записать в таблицу.
4. Один препарат зарисовать, описать морфологию клеток суспензии (форму, величину).
5. Сделать вывод о степени агрегированности суспензий (какие фракции преобладают, %) и жизнеспособности суспензии (неокрашенных клеток, %).

Таблица 7 – Степень агрегированности и жизнеспособности суспензии.

Фракции	Препараты																	
	1						2						3					
	Поля зрения																	
	1		2		3		1		2		3		1		2		3	
	о	н	о	н	о	н	о	н	о	н	о	н	о	н	о	н	о	н
одиначные клетки																		
мелкие агрегаты (2-5 клеток)																		
средние агрегаты (6-20 клеток)																		
крупные агрегаты (21-50 клеток)																		
очень крупные агрегаты (50 и более клеток)																		

Примечание: о – окрашенные клетки и агрегаты,
н – неокрашенные клетки и агрегаты.

Контрольные вопросы

1. Как получить суспензионную культуру?
2. Для чего используются суспензионные культуры в биотехнологии?
3. В чём заключается трудность культивирования одиночных клеток?
4. Как подсчитать плотность суспензии?
5. Как определить жизнеспособность суспензии?

Тема 4. Морфогенез в каллусных тканях.

Гормональная регуляция в культуре клеток и тканей

Существует несколько путей, по которым может идти развитие клетки после её дедифференцировки. 1) это вторичная регенерация целого растения, возможна дифференцировка на уровне клеток, тканей и органов. 2) это утрата клеткой способности к вторичной дифференцировке и регенерации растения, стойкая дедифференцировка, приобретение способности расти на среде без гормонов, т.е. превращение в опухолевую. Такими свойствами часто характеризуются клетки старых пересадочных культур. 3) это нормальный цикл развития каллусной клетки, заканчивающийся её старением и отмиранием. В этом случае клетка претерпевает вторичную дифференцировку и прекращает делиться (стационарная фаза роста). Но такая дифференцировка не ведёт к морфогенезу, а закрепляет за ней свойства старой каллусной клетки.

Для сельскохозяйственной биотехнологии наибольший интерес представляет регенерация в культуре тканей из отдельной клетки целого растения. В культуре каллусных тканей *морфогенезом* называют возникновение организованных структур из неорганизованной массы клеток.

Существует два основных типа морфогенеза. В культуре тканей он может проявляться в виде органогенеза (образование отдельных органов): корневого, стеблевого, реже флорального (цветочного) или листового – 1 тип. В этом случае сначала регенерируют отдельные органы, а затем уже из них целые растения. 2 тип - в виде соматического эмбриогенеза (образования биоплярных зародышеподобных структур из соматических клеток), здесь сразу образуется зародыш, имеющий как меристему корня, так и меристему верхушечной почки, из которого потом развивается целое растение.

Морфогенезом в культуре каллусных тканей можно управлять. На способность изолированных растительных клеток к морфогенезу оказывают влияние как внутренние так и внешние факторы. К внутренним относятся:

видовая принадлежность исходного растения, орган, из которого взят эксплант, возраст экспланта. К внешним факторам относятся состав питательной среды, температура, интенсивность света. При преобладании цитокининов над ауксинами часто начинается стеблевой органоогенез, а в случае преобладания ауксинов над цитокининами – корневой. Также из образующихся в культуре каллусной ткани корней почти никогда не регенерируется целое растение, а при стеблевом органоогенезе сначала образуется побег, который затем при пересадке на среду с преобладанием ауксинов укореняется и даёт начало целому растению. Следовательно, ауксины и цитокинины, вызывающие в зависимости от соотношения либо дедифференцировку и переход к каллусному росту, либо дифференцировку и морфогенез в культуре каллусных тканей, являются не только регуляторами роста, но и регуляторами дифференцировки.

Если органоогенез можно индуцировать с помощью фитогормонов, то соматический эмбриогенез фактически независим от них. Обычно эмбрионные зоны возникают в каллусной ткани на той же питательной среде, которая использовалась для каллусообразования. Независимость соматического эмбриогенеза от гормонов является аргументом того, что сам процесс изоляции клетки стимулирует реализацию тотипотентности, т.е. переход к морфогенезу. Следовательно, основными стимулами морфогенеза являются изменения соотношения гормонов в питательной среде, а так же сам процесс изоляции растительной клетки от организма. Дополнительными стимулами морфогенеза в культуре каллусных тканей является присутствие в питательной среде нитрата аммония, аминокислот таких как тирозин, серин.

Работа №10. Индукция органоогенеза и соматического эмбриогенеза в каллусной ткани табака под действием фитогормонов

Пояснение. Фитогормоны – это биологические регуляторы роста и развития растений, осуществляющие взаимодействие клеток, тканей и органов,

стимулирующие и ингибирующие морфогенетические и физиологические процессы в растительных организмах. Фитогормоны влияют на деление и рост клеток растяжением, состояние покоя, созревание, старение, формирование пола, устойчивость к стрессу, тропизмы, транспирацию; обеспечивают функциональную целостность растительного организма, закономерную последовательность фаз индивидуального развития.

По химической природе гормоны растений четко подразделяются на две группы: производные мевалоновой кислоты (гиббереллины, абсцизины, брассины, фузикоцин, цитокинины), производные аминокислот (ауксины – из триптофана, этилен – из метионина и аланина). Биосинтез фитогормонов происходит в определенных частях растений: в апексах побегов образуется ИУК– индолил-3-уксусная кислота, лист служит донором ключевого продукта синтеза гиббереллинов – каурена, а также абсцизовой кислоты, в апексах корней синтезируется кинетин, а в зоне растяжения корня – гиббереллины, источником зеатина является эндосперм проростающих семян.

По функциональному действию различают 5 основных групп фитогормонов: ауксины, цитокинины, гиббереллины, абсцизины и этилен. Ауксины в культуре тканей вызывают рост клеток растяжением, в больших концентрациях – деление клеток, в сочетании с цитокининами – органогенез. В биотехнологии применяют как природные ауксины (ИУК), так и синтетические [ИМК (индолил-3-масляная кислота), ИПК (индолил-3-пропионовая кислота), 2,4-Д (2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота), НУК(нафтилуксусная кислота)].

Цитокинины в сочетании с ауксинами индуцируют митозы, пролиферацию клеток, почек и побегов. К природным цитокининам относятся: зеатин, кинетин (6-фурфуриламинопурин), NN-дифенилмочевина (кокосовое молоко); к синтетическим – 6-БАП (6-бензиламинопурин).

Гиббереллины стимулируют рост клеток растяжением, а также синтез ауксинов и цитокининов. Сейчас известно около 60 видов гиббереллинов. В культуре ткани используется гибберелловая кислота.

Абсцизины (АБК – абсцизовая кислота) и этилен ингибируют ростовые процессы, деление клеток, в сочетании с цитокининами и хлорхолинхлоридом индуцируют органогенез (образование микроклубней).

Гормональная система тесно связана с генетическим аппаратом клетки. Фитогормоны не только влияют на степень метилирования ДНК и таким образом регулируют экспрессию генов, но и связываются с белками – репрессорами на опероне, что приводит к активации структурных генов и синтезу определенных ферментов. Следовательно, изменяя соотношение гормонов в питательных средах, можно в какой-то степени изменять и генетические программы клеток и тканей. Эти процессы известны как дедифференциация, редифференциация и дифференциация клеток и тканей.

Материалы и оборудование. Пробирки с каллусами табака, колбы на 50 мл со стерильной питательной средой (МС без гормонов), колбы со средами для стеблевого органогенеза и соматического эмбриогенеза и индукции ризогенеза, флаконы с 96 % спиртом, стерильные пинцеты и препарировальные иглы, спиртовка, ламинар-бокс.

Ход работы.

1. Стерильным пинцетом переложить каллусы на стерильную поверхность стола ламинар-бокса, разделить на кусочки 5x5 мм, и поместить в колбы с питательными средами, содержащими различные наборы фитогормонов.

2. Колбы перенести в культуральную комнату с температурой $25 \pm 2^\circ\text{C}$, влажностью воздуха 70 % и интенсивностью освещения 5кЛх.

Результаты эксперимента зарисовать через 2-4-6-8 недель.

Контрольные вопросы

1. Назовите основные типы морфогенеза в культуре каллусной ткани.
2. Основные этапы соматического эмбриогенеза.

3. Что такое фитогормоны и в чем заключается их действие на клетки, ткани и органы растений?
4. Назовите основные группы фитогормонов и их функции.

Тема 5. Клональное микроразмножение растений

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения – **клонального микроразмножения** (получение в условиях *in vitro*, т.е. в пробирке неполовым путём растений, генетически идентичных экземпляру). Этот метод имеет ряд преимуществ: 1) получение генетически однородного посадочного материала; 2) освобождение растений от вирусов за счёт использования меристемной культуры; 3) высокий коэффициент размножения; 4) сокращение продолжительности селекционного процесса; 5) размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами; 6) возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала.

Первые достижения в области клонального микроразмножения были получены в конце 50-х годов XX столетия французским ученым Жоржем Морелем, которому удалось получить первые растения-регенеранты орхидей. Успеху Ж. Мореля в микроразмножении способствовала уже разработанная к тому времени техника культивирования апикальной меристемы растений в условиях *in vitro*. Как правило, исследователи в качестве первичного экспланта использовали верхушечные меристемы травянистых растений: гвоздики, хризантемы, подсолнечника, гороха, кукурузы, одуванчика, салата и изучали влияние состава питательной среды на процессы регенерации и формирования растений. В результате им было обнаружено, что этот процесс бесконечен и можно было получать в большом количестве высококачественный и генетически однородный, безвирусный посадочный материал.

В России работы по клональному микроразмножению были начаты в 60-х годах в лаборатории культуры тканей и морфогенеза Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН.

Таким образом, первые успехи в клональном микроразмножении связаны с культивированием апикальных меристем травянистых растений на соответствующих питательных средах, обеспечивающих в конечном итоге получение растений-регенерантов.

Однако область применения микроразмножения разнообразна и имеет тенденцию к постоянному расширению. Это в первую очередь относится к размножению *in vitro* взрослых древесных пород, особенно хвойных, и использование техники *in vitro* для сохранения редких и исчезающих видов лекарственных растений. В настоящее время в этом направлении наметился положительный сдвиг.

Этапы и методы клонального микроразмножения. Процесс клонального микроразмножения можно разделить на четыре этапа:

- выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры;
- собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества мериклонов;
- укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям, а при необходимости депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре (+ 2°, + 10 °С);
- выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.

Существует несколько методов клонального микроразмножения.

Основной метод, применяемый при клональном микроразмножении растений — это активация развития уже существующих в растении меристем, основывающийся на снятии апикального доминирования, рис. 3. Это может быть достигнуто двумя путями:

- удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде;
- добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин), а также 2-изопентениладенин (2ip) и зеатин. Полученные таким образом побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.

В настоящее время этот метод широко используется в производстве безвирусного посадочного материала сельскохозяйственных культур как технических (сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стахис), так и овощных (томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.). А также для размножения культур промышленного цветоводства (гвоздика, хризантема, роза, гербера), тропических и субтропических растений (рододендрон, азалия, камелия, чай и др.), плодовых и ягодных культур (земляника, яблоня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, крыжовник и др.) и древесных растений (тополь, ива, ольха, береза, рябина, секвойя, туя, можжевельник и др.). Для некоторых сельскохозяйственных культур, таких как картофель, технология клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. Применение метода активации развития существующих в растении меристем позволяет получать из одной меристемы картофеля более 10^5 растений в год, причем технология предусматривает получение в пробирках микроклубней — ценного, безвирусного семенного материала.

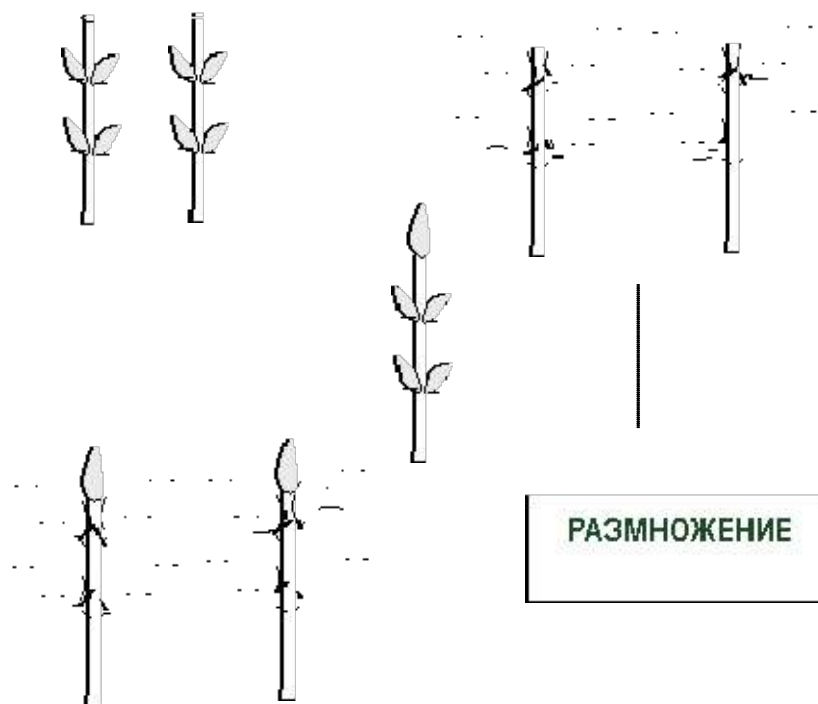


Рис.3. Схема размножения растений методом активации развития существующих меристем: 1 – путем удаления верхушечной меристемы; 2 – добавлением цитокининов в среду (б/г – среда без гормонов, Ц – цитокинин, А – ауксин).

Второй метод — это индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта. Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и, таким образом, регенерировать целые растения. Образование адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий), если их удастся получить свободными от инфекции. Этот процесс, как правило, происходит на питательных средах, содержащих один цитокинин или в сочетании с ауксином, находящихся в соотношении 10:1 или 100:1 в качестве аук-

сина в этом случае наиболее часто используют бета-индолил-3-уксусную кислоту (ИУК) или альфа-нафтилуксусную кислоту (НУК).

Это наиболее распространенный метод микроразмножения высших растений, которым были размножены многие луковичные цветочные растения (нарциссы, лилии, гиацинт, гладиолусы, тюльпаны) из луковичных чешуи, сегментов базальной части донца луковиц, эксплантов листьев; представители рода *Brassica* (капуста цветная, кочанная, брюссельская, листовая, брокколи — из сегментов гипокотыля, семядолей, листьев; лук, чеснок — из верхушечной меристемы, ткани донца луковиц; томаты — из апикальных или пазушных меристем; салат цикорный — из сегментов листовых пластинок; петуния — из сегментов корней; глоксиния, фиалки — из сегментов листовых пластинок, а также некоторые представители древесных растений — из изолированных зрелых и незрелых зародышей).

Достаточно хорошо разработана технология клонального микроразмножения земляники, основанная на культивировании апикальных меристем. Меристематические верхушки изолируют из молодых, свободных от вирусных болезней, растений и выращивают на модифицированной питательной среде. Через 3—4 недели культивирования меристема развивается в самостоятельное растение, в основании которого формируются адвентивные почки, которые быстро растут и дают начало новым почкам. В течение 6—8 недель образуется конгломерат почек, связанных между собой соединительной тканью и находящихся на разной стадии развития. Появляются листья на коротких черешках, в нижней части которых формируются новые адвентивные почки. Эти почки разделяют, и пересаживают на свежую питательную среду. На среде с цитокинином продолжается пролиферация придаточных побегов, а на среде без регуляторов роста в течение 4—6 недель формируются нормальные растения с корнями и листьями. Морфогенетическая активность экспланта сохраняется в течение 3—4 лет. Таким образом, от одного мате-

ринского растения можно получать несколько миллионов растений-регенерантов в год.

Третий метод, практикуемый при клональном микроразмножении, основывается на дифференциации из соматических клеток зародышеподобных структур, которые по своему внешнему виду напоминают зиготические зародыши, рис.4 .

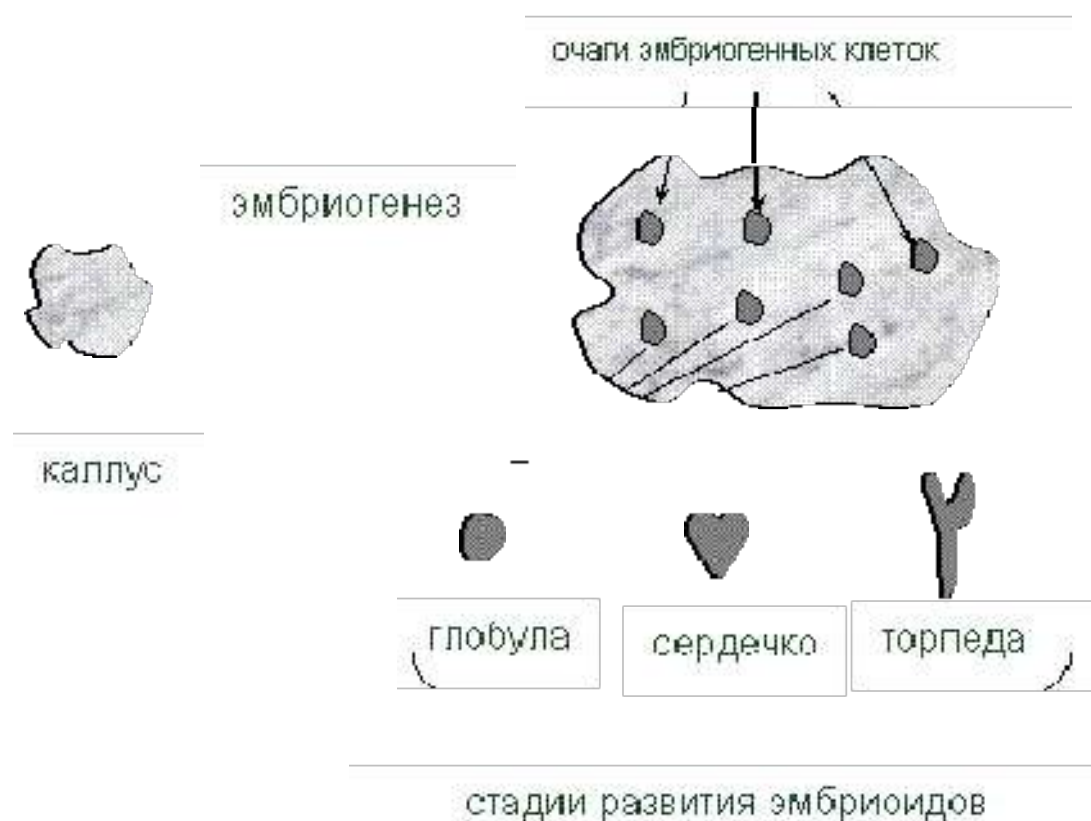


Рис.4. Соматический эмбриогенез в каллусной ткани

Этот метод получил название — соматический эмбриогенез. Формирование эмбриоидов в культуре тканей происходит в два этапа. На первом этапе клетки экспланта дифференцируются за счет добавления в питательную среду ауксинов, как правило, 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) и превращаются в эмбриональные. На следующей стадии необходимо заставить сформировавшиеся клетки развиваться в эмбриониды, что достигается уменьшением концентрации ауксина или полного его исключения из состава питательной среды. Соматический эмбриогенез возможно наблюдать непо-

средственно в тканях первичного экспланта, а также в каллусной культуре. Причем последний способ менее пригодный при клональном микроразмножении, так как посадочный материал, полученный таким методом, будет генетически нестабилен по отношению к растению-донору. Как правило, соматический эмбриогенез происходит при культивировании каллусных клеток в жидкой питательной среде (суспензия) и является наиболее трудоемкой операцией, так как не всегда удается реализовывать свойственную клеткам тотипотентность.

Четвёртый метод клонального микроразмножения — дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани, рис.5.



Рис. 5. Дифференциация придаточных почек в каллусной ткани

Он мало используется для получения посадочного материала *in vitro*. Это связано с тем, что при периодическом пересаживании каллусной ткани на свежую питательную среду часто наблюдаются явления, нежелательные при микроразмножении: изменение ploидности культивируемых клеток, структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций, потеря морфогенетического потенциала культивируемыми клетками. Наряду с генетическими изменениями растений наблюдаются и морфологические: низкорослость, неправильное жилкование листьев и их расположение по стеблю, образование укороченных, утолщенных междоузлий, уродливость, пониженная устойчивость к болезням и вредителям. Причем длительное культивирование каллусных клеток усугубляет эти изменения, поэтому период неорганизованного роста при микроразмножении должен быть сведен к минимуму.

Однако, несмотря на некоторые недостатки, данный метод имеет положительные стороны и преимущества. Во-первых, он является эффективным и экономически выгодным, так как в процессе размножения из каждой индивидуальной каллусной клетки при благоприятных условиях культивирования может сформироваться адвентивная почка, дающая начало новому растению. Во-вторых, в ряде случаев он является единственно возможным способом размножения растений в культуре тканей. В-третьих, представляет большой интерес для селекционеров, так как растения, полученные данным методом, различаются генетически и морфофизиологически. Это дает возможность селекционерам проводить отбор растений по хозяйственно-важным признакам и оценивать их поведение в полевых условиях. Этот метод целесообразно применять лишь к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, а вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. К таким растениям можно отнести амариллис, томаты, спаржу, некоторые древесные породы и другие культуры. Через каллусную культуру были размножены: сахарная свекла, некоторые представители рода Brassica, кукуруза, рис, пшеница и другие злаковые, подсолнечник, лен, разработаны условия, способствующие регенерации растений из каллуса огурца, картофеля, томатов.

Техника культивирования растительных тканей на разных этапах клонального микроразмножения. Для культивирования тканей на каждом из четырёх этапов требуется применение определенного состава питательной среды.

Первый этап. На этом этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Это осуществляется путем стерилизации растительных тканей ртутьсодержащими растворами (сулема, или диацид, 0,1—0,2%-ная) или хлорсодержащими (хлорамин 10—15%-ный, гипохлорит натрия или кальция 5—10%-ный) в течение 5—10 мин для нежных, легко повреждаемых тканей растений и 10—12 мин — для тканей, имеющих более

плотную оболочку. После этого растительные ткани необходимо тщательно промыть в стерильной дистиллированной воде, как правило, в трех порциях и перенести на заранее приготовленную стерильную питательную среду. Если исходную стерильную культуру экспланта получить трудно, рекомендуется вводить в состав питательной среды антибиотики (тетрациклин, бензилпенициллин и др.) в концентрации 100—200 мг/л. Это в первую очередь относится к древесным растениям, у которых наблюдается тенденция к накоплению внутренней инфекции. На первом этапе, как правило, используют среду, содержащую минеральные соли по рецепту Мурасига и Скуга, а также различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. В случае, когда наблюдается ингибирование роста первичного экспланта за счет выделения им в питательную среду токсичных веществ (фенолов, терпенов и других вторичных соединений), усилить его рост можно, используя антиоксиданты. Это возможно двумя способами: омывкой экспланта слабым раствором антиоксиданта в течение 4—24 ч; непосредственным добавлением антиоксиданта в питательную среду. В качестве антиоксидантов используют: аскорбиновую кислоту (1—60 мг/л), глутатион (4—5 мг/л), дитиотриэтол (1—3 мг/л), диэтилдитиокарбамат (2—5 мг/л), поливинилпирролидон (5000—10 000 мг/л). В некоторых случаях целесообразно добавлять в питательную среду адсорбент — древесный активированный уголь в концентрации 0,5—1%. Продолжительность первого этапа — от 1 до 2 месяцев, в результате которого наблюдается рост меристематических тканей и формирование первичных побегов.

Второй этап — собственно микроразмножение. На этом этапе необходимо добиться получения максимального количества мериклонов, учитывая при этом, что с увеличением субкультивирований увеличивается число растений-регенерантов с ненормальной морфологией и возможно образование растений-мутантов. Как и на первом этапе, используют питательную среду

по рецепту Мурасига и Скуга, содержащую различные биологически активные вещества, а также регуляторы роста. Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. Из цитокининов наиболее часто используют БАП в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов — ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л. При долгом культивировании растительных тканей на питательных средах с повышенным содержанием цитокининов (5—10 мг/л) происходит постепенное накопление их в тканях выше необходимого физиологического уровня, что приводит к появлению токсического действия и формированию растений с измененной морфологией. Вместе с тем, возможно, наблюдать такие нежелательные для клонального микроразмножения эффекты, как подавление пролиферации пазушных меристем, образование витрифицированных (оводненных) побегов и уменьшение способности растений к укоренению. Отрицательное действие цитокининов возможно преодолеть, по данным Н. В. Катавой и Р. Г. Бутенко, используя питательные среды с минимальной концентрацией цитокининов, обеспечивающих стабильный коэффициент микроразмножения, или чередованием циклов культивирования на средах с низким и высоким уровнем фитогормонов.

3—4 этапы — укоренение микропобегов, их последующая адаптация к почвенным условиям и высадка в поле являются наиболее трудоемкими этапами, от которых зависит успех клонального микроразмножения. На третьем этапе, как правило, меняют основной состав среды: уменьшают в два, а иногда и в четыре раза концентрацию минеральных солей по рецепту Мурасига и Скуга или заменяют её средой Уайта, уменьшают количество сахара до 0,5—1% и полностью исключают цитокинины, оставляя один лишь ауксин. В качестве стимулятора корнеобразования используют бета-индолил-3-масляную кислоту (ИМК), ИУК или НУК. Укоренение микропобегов проводят двумя способами: 1) выдерживание микропобегов в течение нескольких

часов (2—24 ч) в стерильном концентрированном растворе ауксина (20—50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка); 2) непосредственное культивирование микропобегов в течение 3—4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1—5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта). В последнее время предложен пока мало практикуемый метод укоренения пробирочных растений — в условиях гидропоники. Этот метод позволяет значительно упростить этап укоренения и одновременно получать растения, адаптированные к естественным условиям. Для картофеля возможно использовать бес-субстратную гидропонику для получения миниклубней. Затенение нижней части культуральных сосудов плотной чёрной материей или добавление в питательную среду активированного угля способствует укоренению микропобегов.

Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клонального микроразмножения. Наиболее благоприятное время для пересадки пробирочных растений — весна или начало лета. Растения с двумя-тремя листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок пинцетом с длинными концами или специальным крючком. Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85—90 °С в течение 1—2 ч. Для большинства растений в качестве субстратов используют торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1). Исключение составляют семейство орхидных, для которых готовят субстрат, состоящий из сфагнового мха, смеси торфа, листьев бука или дуба, сосновой коры (1:1:1). Приготовленным заранее почвенным субстратом заполняют пикировочные ящики или торфяные горшочки, в которых выращивают растения-регенеранты. Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20—22°С),

освещенностью не более 5 тыс. лк и влажностью 65—90%. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. В тех случаях, когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают до полной адаптации растений.

Через 20—30 дней после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают растворами минеральных солей Кнудсона, Мурасига и Скуга, Чеснокова, Кнопа (в зависимости от вида растений) или комплексным минеральным удобрением. По мере роста растений их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом. Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений соответствует принятой агротехнике выращивания для каждого индивидуального вида растений.

Процесс адаптации пробирочных растений к почвенным условиям является наиболее дорогостоящей и трудоемкой операцией. Нередко после пересадки растений в почву наблюдается остановка в росте, опадение листьев и гибель растений. Это связано, в первую очередь, с тем, что у пробирочных растений нарушена деятельность устьичного аппарата, вследствие чего происходит потеря большого количества воды. Во-вторых, у некоторых растений в условиях *in vitro* не происходит образования корневых волосков, что приводит, в свою очередь, к нарушению поглощения воды и минеральных солей из почвы. Поэтому целесообразно на третьем или четвертом этапах клонального микроразмножения применять искусственную микоризацию растений (для микотрофных), учитывая их положительную роль в снабжении растений минеральными и органическими питательными веществами, водой, биологически активными веществами, а также в защите растений от патогенов. Существует два способа заражения растений микоризообразующими грибами:

- 1) *in vitro* (в стерильных условиях);
- 2) *in vivo* (в естественных условиях).

Первый способ более благоприятен, так как в этом случае исключается возможность загрязнений почвы другими микроорганизмами. Кроме того, в условиях *in vitro* есть возможность контролировать условия культивирования (свет, температура, влажность) и подбирать субстрат (рН, аэрация), обеспечивающий нормальное формирование микоризы. Растения, размноженные *in vitro*, развиваются значительно лучше, если их корневая система находилась в контакте с микоризообразующими грибами. В этом случае улучшалось снабжение их азотом, увеличилась в 1,5—2 раза приживаемость растений при их пересадке в почву, а также повышался прирост надземной биомассы. Такие работы были проведены с березой, эвкалиптом, каштаном, сосной, лососем и разными клонами ольхи.

На эффективность микроклонального размножения влияет масса факторов различной природы. Это физиологические особенности вводимого в культуру растения, химические и физические условия культивирования. Наиболее важным моментом является выбор материнского растения и экспланта.

При выборе материнского растения необходимо учитывать его физиологические, сортовые и видовые особенности. Исходные растения должны быть здоровы, не поражены грибными, бактериальными и вирусными болезнями. Кроме того, они должны находиться в состоянии интенсивного роста. Луковицы, корневища и клубни в состоянии покоя непригодны, перед введением в культуру их предварительно обрабатывают высокими или низкими температурами. Способность к размножению также детерминирована генетически. Например, земляника размножается всеми способами, облепиха – ни одним, хотя в природе черенкуется. Двудольные обладают большей регенерационной способностью, чем однодольные и древесные.

При выборе экспланта необходимо учитывать его возраст, строение и происхождение. Для обеспечения максимальной стабильности клонируемого материала, во избежание появления аномальных растений в качестве экс-

планта желательно использовать молодые, слабодифференцированные ткани. Кроме того, экспланты от молодых растений лучше укореняются, чем от зрелых, особенно это касается древесных пород. Лучше всего использовать кончики стеблей, пазушные почки, зародыши, молодые листья, черенки, соцветия, чешую луковиц, то есть экспланты, содержащие меристемы. Опыты с эмбрионами кукурузы, проведенные Грином и Филипсом в 1975 году, показали, что при извлечении эмбрионов из зрелых семян они образуют каллус и корни. Если же изолировать их через 2 – 3 недели после опыления, то образуются и каллус, и растения. Размер экспланта является ещё одним фактором, определяющим успех микроразмножения. Чем меньше размер экспланта, тем меньше его регенерационная способность и наоборот. С другой стороны, в крупном экспланте увеличивается возможность появления в его клетках вирусов и других патогенов, что препятствует оздоровлению тканей.

Успех введения в культуру часто определяется эффективностью стерилизации. Выбор стерилизующего агента определяется особенностями экспланта. Для нежных тканей концентрация стерилизующего агента должна быть снижена, чтобы сохранить жизнеспособность экспланта. Часто внутреннее заражение исходных эксплантов бывает намного сильнее, чем поверхностное, поэтому экспланты предварительно обрабатывают фунгицидами и антибиотиками против грибной и бактериальной инфекций. Хорошие результаты дает обработка растений бензоатом натрия.

Немаловажный фактор, влияющий на успех клонального микроразмножения - гормональный баланс питательной среды. При высоком соотношении гормонов цитокинин – ауксин происходит развитие пазушных меристем, при низком – индуцируется корнеобразование, а при среднем – наблюдается образование каллуса. Кроме цитокининов и ауксинов в питательную среду иногда добавляют гибберелловую кислоту, которая стимулирует рост и вытягивание сформировавшихся почек и способствует получению растений с хорошо развитой надземной частью.

К физическим факторам относится консистенция среды, кислотность, интенсивность освещения и температура. В зависимости от вида растений необходимо учитывать консистенцию питательной среды. При культивировании эксплантов верхушки побегов в жидких питательных средах значительно стимулируется их рост, сокращается период выращивания и количество пересадок. Но, с другой стороны, в этих условиях возрастает возможность образования аномальных побегов. Использование твёрдых агаризованных сред способствует преодолению возникновения анамаллий, но этот способ выращивания ухудшает условия питания эксплантов и препятствует удалению продуктов метаболизма. Состав питательной среды необходимо подбирать для каждого вида растений.

На клональное микроразмножение и рост растений также влияет и кислотность среды, определяющая доступность для растений питательных веществ. Известно, что сильно кислые или щелочные среды лимитируют поступление фосфора и железа, делая их относительно нерастворимыми и этим ограничивая рост растений. Как правило, ткани и органы растений культивируют на питательной среде с рН 5,2-5,8.

К физическим факторам выращивания относятся температура и условия освещения. Высокая интенсивность света может вызывать хлорозы и задерживать развитие, но при переносе в почву эти растения чувствуют себя лучше и растут энергичнее. Спектральный состав также играет немаловажную роль. Некоторые исследователи (Катаева Н.В., Аветисов В.А, 1981) указывают на синий свет как основной компонент морфогенеза. Красный свет стимулирует образование почек у табака, у салата – образование побегов, у березы – укоренение. В работах Т.Н. Константиновой с соавторами (1987) показано, что синий свет усиливает закладку вегетативных почек у побегов табака в условиях *in vitro*, а красный стимулирует развитие цветочных почек. Однако при добавлении цитокининов и ауксинов в различной концентрации

соотношение процессов дифференциации цветочных и вегетативных почек меняется, в некоторых случаях наблюдается даже противоположный эффект.

Температура культивирования оказывает значительное влияние на рост и регенерацию изолированных тканей растений. Для большинства растительных тканей температурный оптимум обычно варьирует в интервале 22 – 26°C днем и 18 – 22°C ночью. Для повышения коэффициента размножения необходимо каждому виду с учетом его естественного ареала произрастания подбирать индивидуальные условия культивирования.

Работа №11. Изолирование и культивирование апикальных меристем картофеля.

Пояснение. Культуру изолированных апикальных меристем используют для получения свободного от вирусов посадочного материала и для микроклонального размножения растений. Апикальная меристема обычно свободна от вирусов, она представляет собой конус активно делящихся клеток высотой 0,1 мм и шириной 0,25 мм. Поскольку меристеме бывает трудно изолировать без повреждения, её часто отделяют с 1-2 листовыми зачатками. Для повышения эффективности оздоровления картофеля метод верхушечной меристемы сочетают с термо- и химиотерапией. Безвирусные растения размножают *in vitro* и высаживают в теплицы для получения безвирусных клубней.

Материалы и оборудование. Клубни картофеля, лупа, стерильные скальпели, иглы, чашки Петри, пробирки со стерильной питательной средой МС с добавлением сахарозы, глюкозы по 20000 мг/л, гидролизата казеина 1000 мг/л, мезоинозита 100 мг/л, тиамин, пиридоксин по 1 мг/л, аденин 40 мг/л, витамина В12 0,015 мг/л, гибберелловой кислоты и биотин по 1 мг/л, никотиновой кислоты 2 мг/л, фолиевой кислоты, рибофлавина и кинетин по 0,5 мг/л, стерилизующие растворы, спиртовка, спички.

Ход работы.

1. Прорастить клубни картофеля в темноте при 20...22°C.
2. Рабочее место, инструменты и пробирки протереть спиртом.
3. Пинцеты, скальпели, иглы стерилизовать перед каждой манипуляцией, погружая их в спирт и обжигая над пламенем спиртовки.
4. Ростки картофеля опустить в химический стакан и залить 1...6%-ным раствором гипохлорита кальция или натрия.
5. Затем не менее 3 раз промыть стерильной водой, поместить в стерильную чашку Петри и добавить несколько капель стерильной воды для предупреждения подсыхания.
6. Перед изолированием меристем с помощью препаровальной иглы под бинокулярной лупой с верхушки ростка удалить покровные листочки, последовательно обнажая боковые и верхушечные меристемы с примордиальными листочками.
7. Меристему, включающую кусочек ткани без листовых зачатков, изолировать обычной тонкой иглой.
8. Каждую операцию проводить отдельным простерилизованным инструментом.
9. Меристему на острие иглы перенести на поверхность питательной среды в пробирку, которую закрывают пробкой над пламенем горелки и поставить в штатив.
10. Штатив с пробирками закрыть целлофаном для предупреждения подсыхания среды и поставить в световую комнату.
11. Через 2, 3, 4 недели провести наблюдения за развитием побега из меристем и зарисовать этапы этого процесса.

Контрольные вопросы

1. Что такое микрклональное размножение растений: основные этапы?

2. Каковы основные способы микроклонального размножения?
3. Как получить безвирусный посадочный материал?
4. Какой из способов получения безвирусного посадочного материала Вы бы предпочли в своей работе?
5. Чем отличаются питательные среды для пролиферации побегов, индукции корнеобразования, культивирования меристем, получения микроклубней?

Тема 6. Культура изолированных клеток и тканей в селекции растений

Одно из направлений клеточных технологий – использование их в селекции. Достоинство этого направления заключается в том, что при создании новых форм, сортов и гибридов растений облегчается и ускоряется традиционный селекционный процесс. Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей *in vitro* следующие. **Оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости)** проводится в том случае, когда невозможно осуществить оплодотворение между выбранными парами в естественных условиях. Это вызвано несколькими причинами: 1) физиологические (несоответствие во времени созревания пыльцы и т. д.); 2) морфологические (короткая пыльцевая трубка или блокирование роста ее на разных этапах развития и т. д.).

Оплодотворение *in vitro* можно осуществить двумя способами: а) культивирование на искусственной агаризованной питательной среде завязи с нанесенной на нее готовой пыльцой; б) завязь вскрывается и на питательную среду переносятся кусочки плаценты с семязпочками, вблизи которых или непосредственно на ткани плаценты культивируется готовая пыльца. Визуально определить, прошло оплодотворение *in vitro* или нет, можно по быстро увеличивающимся в размерах семязпочкам. Сформировавшийся зародыш, как

правило, не переходит в состояние покоя, а сразу прорастает и дает начало гибриднему поколению.

Постгамная несовместимость при отдаленной гибридизации возникает после оплодотворения. Часто при этом образуются щуплые невсхожие семена. В таких случаях из зрелой щуплой зерновки изолируют зародыш и выращивают его в питательной среде.

Выращивание зародышей в искусственной питательной среде называется **эмбриокультурой**. Среда для выращивания зрелого зародыша может быть простой, без добавок физиологически активных веществ (например, среда Уайта) или любая другая, содержащая минеральные соли и сахарозу. Эмбриокультура даёт возможность вырастить гибридные растения из неполноценных зародышей, но выход гибридных растений мал и гибриды часто бывают стерильны.

Получение гаплоидов *in vitro*. Роль гаплоидных растений в селекции очень велика. Применение их позволяет быстрее найти нужную комбинацию, сокращает время для создания сорта. Искусственным путём с использованием методов *in vitro* удаётся получить большие количества гаплоидных растений тремя способами: 1) андрогенез – получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор; 2) гиногенез - андрогенез – получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семязачек; 3) партеногенез – получение гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы.

Криосохранение растений. Криосохранение соматических клеток растений в жидком азоте (температура -196 градусов) – новое направление в биотехнологии, которое широко стало развиваться с начала 70-х годов 20 столетия. Цель данной технологии заключается в сохранении в культуре *in vitro* генофонда, а также в обеспечении селекционеров в любое время генотипом, имеющим искомые признаки.

Для проведения работ по **клеточной селекции растений в условиях *in vitro*** в качестве объекта исследования могут быть использованы каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты. Выбор объекта зависит от наличия разработанных технологий применительно к различным видам растений, а также от конечных целей исследования. Каллусная ткань представляет собой легко доступный материал, который наиболее часто используют для клеточной селекции. Как правило, работу проводят на первичной или пересадочной каллусной ткани.

Однако при работе с каллусными культурами многие исследователи отмечают существенные недостатки данного объекта: медленный рост ткани, неравноценное для всех клеток действие токсических веществ, которые применяются в качестве селективного фактора, а также потеря регенерационной способности в процессе культивирования каллусных клеток. Несомненно, проводить селекцию целесообразно на уровне одиночных клеток (суспензионная культура, протопласты). Однако для многих видов растений не разработаны эффективные технологии и способы культивирования одиночных клеток. Поэтому, несмотря на перечисленные выше недостатки использования каллусных культур, этот способ селекции остается для некоторых видов растений пока единственным.

Получение стабильно устойчивых линий — процесс длительный. Как правило, селекция начинается с получения достаточного количества каллусной массы из изолированных растительных эксплантов, использующейся в дальнейшем для определения концентрации селективного фактора (построение дозовой кривой), при которой наблюдается одновременно рост каллусной ткани, и в то же время часть каллусных колоний погибает. Выбранная концентрация селективного фактора признается оптимальной и используется в дальнейших экспериментах. Так как первично полученные на средах с селективными факторами колонии клеток могли возникнуть вследствие физиологической адаптации или определенного состояния дифференцировки кле-

ток и не быть генетически устойчивыми, то в течение последующих 4—6 субкультивирований на селективной среде проверяется стабильность устойчивости полученных клонов. Затем их переносят на среду без селективного фактора и субкультивируют еще 2—3 пассажа. И только после повторного возвращения в селективные условия отбирают стабильные клоны, из которых пытаются получить растения-регенеранты. Большое число работ по культивированию каллуса, с целью получения нового селекционного материала, проведено на пшенице, ячмене, рисе, сорго, а также на картофеле, томатах, люцерне и, крайне редко, на древесных. Таким образом, использование каллусной культуры в селекционных целях открывает огромные возможности в создании новых форм растений, несущих ценные признаки, необходимые для человечества.

Культивирование растительных клеток *in vitro* представляет универсальную экспериментальную модель для получения и изучения биохимических растительных мутантов. Условно мутагенез делят на индуцированный и спонтанный. Подразумевается, что в первом случае мутации обусловлены действием известных и осознанно применяемых мутагенных факторов, а во втором случае природа мутаций случайна и не поддается конкретизации.

Индукцируемый мутагенез широко и давно применяется в генетике и селекции для получения истинных мутантов. Установлено, что вызвать мутации могут некоторые химические соединения, определенные электромагнитные излучения, а также некоторые вирусы и плазмиды. В клеточной селекции используются прежде всего химические и физические мутагены (УФ-излучение, Рентгеновское излучение). При обработке исходного материала мутагеном значение имеет зависимость выживаемости клеток от дозы мутагена. Выживаемость может зависеть также от того, на какой стадии развития культуры применяется обработка мутагеном, поэтому мутагенез нужно проводить либо сразу после выделения протопластов, либо на следующий день. Обладают токсическими свойствами и физические, и химические мутагены,

но токсичность химических мутагенов несравнимо выше. Так, если даже высокие дозы облучения подавляют только репродуктивную и регенерационную способность клетки, сохраняя ее метаболическую активность, то при работе с химическими мутагенами наблюдается высокий процент летальности клеток, а иногда и гибель всей клеточной популяции. Поэтому, применяя химические мутагены, используют невысокие их дозы. Выживаемость зависит и от пloidности клеток. Так, гаплоидные протопласты более чувствительны к мутагенам, чем диплоидные.

Значение растительных белков в пище человека и животных невозможно переоценить, поскольку именно белки содержат незаменимые аминокислоты, которых нет в животных продуктах и которые люди неспособны синтезировать. Такими аминокислотами являются триптофан, лизин, треонин, метионин. Однако и у растений их недостаточно. Например, злаки имеют низкий уровень лизина, кукуруза – триптофана, бобовые – метионина. Поэтому данный признак в настоящее время включен во многие селекционные программы. Одним из подходов к решению этой задачи является получение мутантов с нарушенной регуляцией биосинтеза аминокислот. Отбор таких мутантов проводят *in vitro* на средах с повышенным содержанием аминокислот или их аналогов.

Современные гербициды обладают селективным действием, т.е. при их применении гибнут только сорняки и остаются незатронутыми культурные растения. В основе такого дифференциального действия гербицидов лежит способность растений выводить или разлагать их до нетоксичных соединений. Традиционно из популяции растений выявляют устойчивые формы и вовлекают их в скрещивание. Однако, как правило, устойчивость характерна для дикорастущих видов и при скрещивании их с культурными формами может наблюдаться гибридологическая несовместимость. Иногда для получения гербицидоустойчивых растений применяют мутагенез, но это требует анализа большого количества материала, т.к. частота мутаций низкая. Выде-

ленные путем клеточной селекции линии, устойчивые к гербицидам, находят все большее применение в качестве исходного материала для исследований по генной инженерии растений.

Наиболее простой подход в селекции *in vitro* на устойчивость к болезням связан с культивированием клеток непосредственно в присутствии культурального фильтрата патогена. Для выбора правильной схемы селекции прежде всего необходимо знание жизненного цикла патогена. Многие патогены, например, грибы имеют различные стадии жизненного цикла, несколько стадий спороношения, в зависимости от которых могут изменяться выживаемость, рост и эпидемиология. Исследования по культивированию растительных клеток в присутствии патогена были начаты с 1965 года и направлены на изучение корреляции устойчивости / чувствительности к патогену.

Следующий метод клеточной селекции – создание неполовых гибридов путём слияния изолированных протопластов, полученных из соматических клеток. Этот метод позволяет скрещивать отдалённые виды растений, которые невозможно скрестить обычным путём. Гибридизация соматических клеток даёт возможность соединить в одном ядре гены далёких видов растений и сочетать гены. В настоящее время продолжается разработка и совершенствование методов выделения и культивирования протопластов на искусственных питательных средах. Для культивирования протопластов применяют те же питательные среды, что и для культуры изолированных клеток и тканей. Отличительной чертой сред для протопластов является повышенное осмотическое давление на начальных этапах культивирования, которое обеспечивается высокой концентрацией хлорида кальция.

В процессе культивирования изолированные протопласты регенерируют новую клеточную стенку и превращаются в клетки, способные делиться и давать начало образованию каллусной ткани. Дальнейшая задача – получение из каллусной ткани растений-регенерантов. Протопласты выделяют из каллусных, суспензионных клеток или из клеток листьев, меристем, стеблей.

При выделении протопластов из листьев сначала удаляют эпидермис, лист нарезают на сегменты и затем подвергают обработке пектиназой или целлюлозой.

Использование изолированных протопластов в селекции растений не ограничивается возможностью их индуцированного слияния и получения соматических гибридов. Изолированные протопласты способны поглощать из окружающей среды макромолекулы и органеллы, т.е. в них можно вводить чужеродную информацию, не пересаживая ДНК или органеллы других клеток. Однако эти работы только начинают развиваться.

Работа №12. Культура изолированных зародышей

Пояснение. При отдалённой гибридизации наблюдается так называемая постгамная несовместимость, в результате чего зародыш остаётся недоразвитым, он неспособен к нормальному прорастанию. При более отдалённых скрещиваниях нарушения в развитии зародыша иногда наблюдаются уже на ранних этапах, что выражается в замедлении темпов роста, отсутствии дифференцировки. Процесс культивирования такого зародыша состоит из 2 этапов – эмбрионального роста, во время которого продолжается дифференциация, и его прорастания.

Материалы и оборудование. Зрелые зерновки пшеницы, замоченные в воде за сутки до занятия, пробирки со стерильной агаризованной питательной средой МС с добавлением сахарозы 15000мг/л, стерильный пинцет, скальпель, матрасики или чашки Петри, спиртовка, спирт, спички.

Ход работы.

1. Предварительно замоченные семена стерилизовать спиртом в течение 2...3 мин.
2. Поместить по 10...20 штук семян в марлевые мешочки и стерилизовать в растворе диоксида или сулемы 15 мин.
3. Раствор слить во флакон для повторной стерилизации.

4. Промыть семена 3...5 раз стерильной дистиллированной водой в том же стакане, в котором проводили стерилизацию.
5. Пинцетом перенести зерновки на стерильный матрасик или в чашку Петри.
6. Положить зерновку бороздкой вниз и, придерживая пинцетом, скальпелем или иглой рассечь оболочку и выделить зародыш.
7. Зародыш, повернутый щитком вниз, перенести в пробирку или чашку Петри со средой МС без гормонов.
8. Через 2...3 недели зарисовать проростки, образовавшиеся из зародышей.

Контрольные вопросы

1. Что такое клеточная селекция и каковы её возможности?
2. Назовите биотехнологические методы ускорения селекционного процесса.
3. Что такое протопласты и как их используют в селекции?
4. Что такое криосохранение и его практическое применение в клеточных технологиях?
5. Что такое постгамная несовместимость и каковы пути её преодоления?

Тема 7. Основы молекулярной биологии и генетической инженерии

Молекулярная биология – это наука о структуре и функциях нуклеиновых кислот и белков, о механизмах хранения, воспроизведения, передачи и реализации генетической информации.

Нуклеиновые кислоты – простетическая группа нуклеопротеидов. Известно 2 вида нуклеиновых кислот – ДНК и РНК, которые различаются составом молекулы, локализацией в клетке и функцией в организме. ДНК и

РНК состоят из мономерных единиц - нуклеотидов, поэтому нуклеиновые кислоты называют полинуклеотидами.

Каждый нуклеотид содержит 3 химически различных компонента: гетероциклическое азотистое основание, моносахарид (пентозу) и остаток фосфорной кислоты. В зависимости от числа имеющихся в молекуле остатков фосфорной кислоты различают нуклеозидмонофосфаты (НМФ), нуклеозиддифосфаты (НДФ), нуклеозидтрифосфаты (НТФ) (рис. 6).

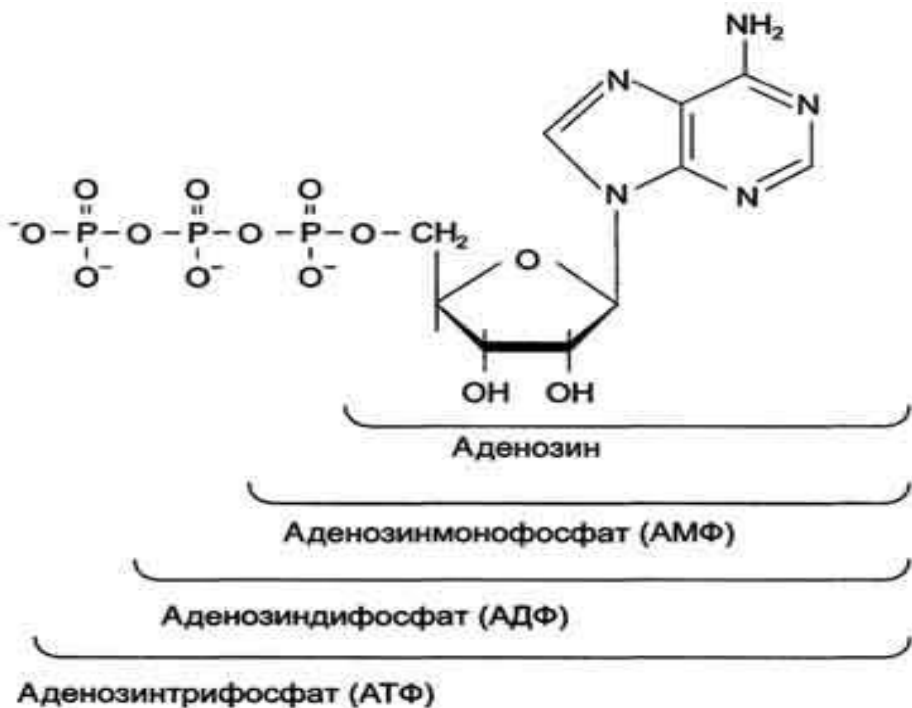


Рис. 6. Нуклеозидмоно-, ди- и трифосфаты аденозина. Нуклеотиды - фосфорные эфиры нуклеозидов. Остаток фосфорной кислоты присоединён к 5'-углеродному атому пентозы (5'-фосфоэфирная связь).

В состав нуклеиновых кислот входят азотистые основания двух типов: пуриновые - **аденин** (A), **гуанин** (G) и пиримидиновые - **цитозин** (C), **тимин** (T) и **урацил** (U). Нумерация атомов в основаниях записывается внутри цикла (рис. 7). Номенклатура нуклеотидов приведена в табл. 7.

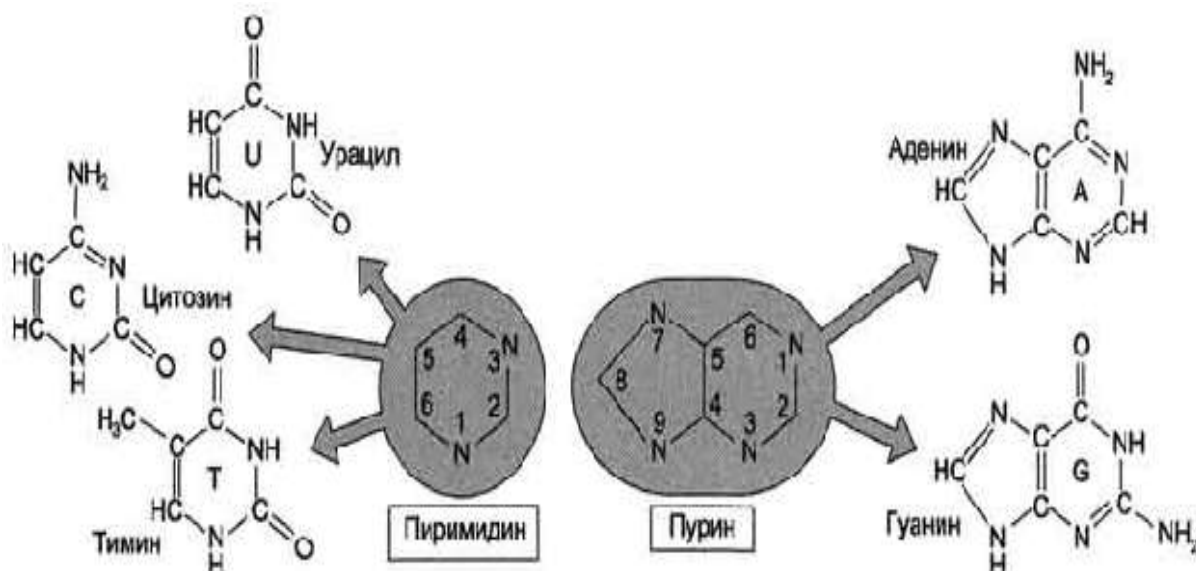


Рис. 7. Пуриновые и пиримидиновые основания.

Таблица 7 - Номенклатура нуклеотидов

Азотистое основание	Нуклеозид	Нуклеотид	Трёхбуквенное обозначение	Однобуквенный код
Аденин	Аденозин	Аденозинмонофосфат	АМФ	А
Гуанин	Гуанозин	Гуанозинмонофосфат	ГМФ	Г
Цитозин	Цитидин	Цитидинмонофосфат	ЦМФ	С
Урацил	Уридин	Уридинмонофосфат	УМФ	U
Тимин	Тимидин	Тимидинмонофосфат	ТМФ	Т

Пентозы в нуклеотидах представлены либо рибозой (в составе РНК), либо дезоксирибозой (в составе ДНК). Чтобы отличить номера атомов в пентозах от нумерации атомов в основаниях, запись производят с внешней стороны цикла и к цифре добавляют штрих (') - 1', 2', 3', 4' и 5' (рис.8).

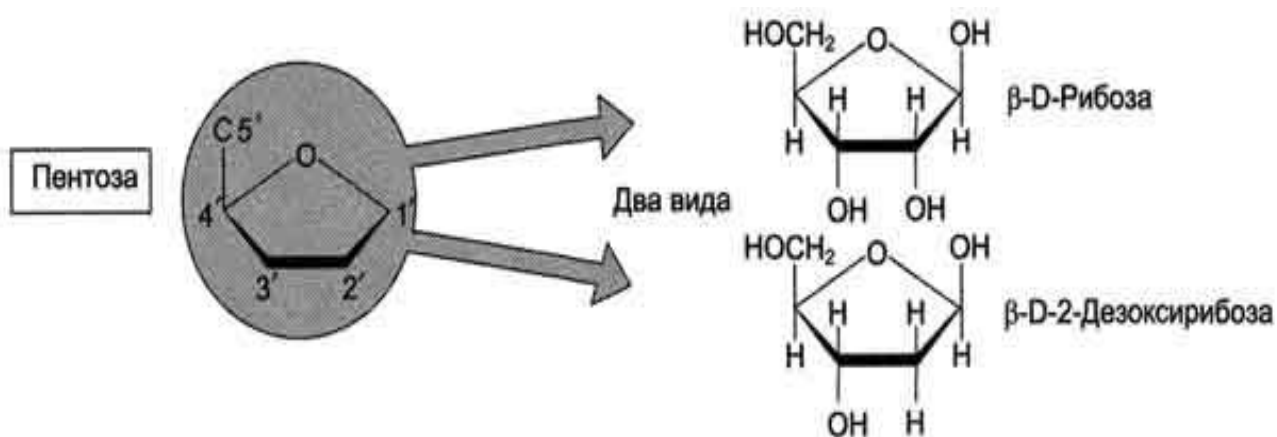


Рис. 8. Пентозы. Присутствуют 2 вида - β -D-рибоза в составе нуклеотидов РНК и β -D-2-дезоксирибоза в составе нуклеотидов ДНК.

Пентозу соединяет с основанием **N-гликозидная связь**, образованная С₁-атомом пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и N₁-атомом пиримидина или N₉-атомом пурина (рис. 9).

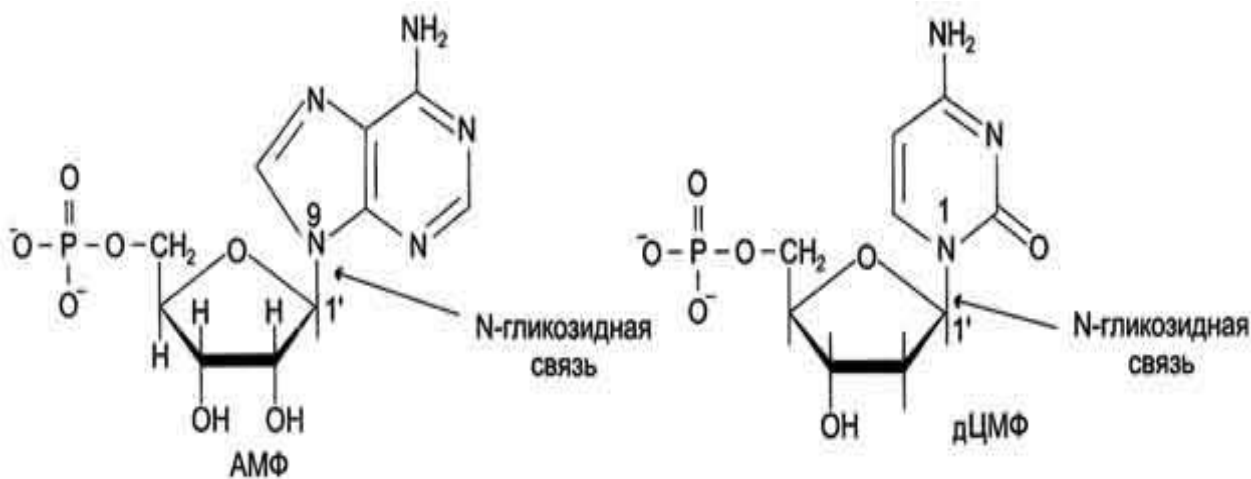


Рис. 9. Пуриновый и пиримидиновый нуклеотиды.

Нуклеотиды, в которых пентоза представлена рибозой, называют рибонуклеотидами, а нуклеиновые кислоты, построенные из рибонуклеотидов, - рибонуклеиновыми кислотами, или РНК. Нуклеиновые кислоты, в мономере которых входит дезоксирибоза, называют дезоксирибонуклеиновыми кислотами, или ДНК. Нуклеиновые кислоты по своему строению относят к классу линейных полимеров. Остов нуклеиновой кислоты имеет одинаковое строение по всей длине молекулы и состоит из чередующихся групп - пентоза-фосфат-пентоза- (рис. 10).

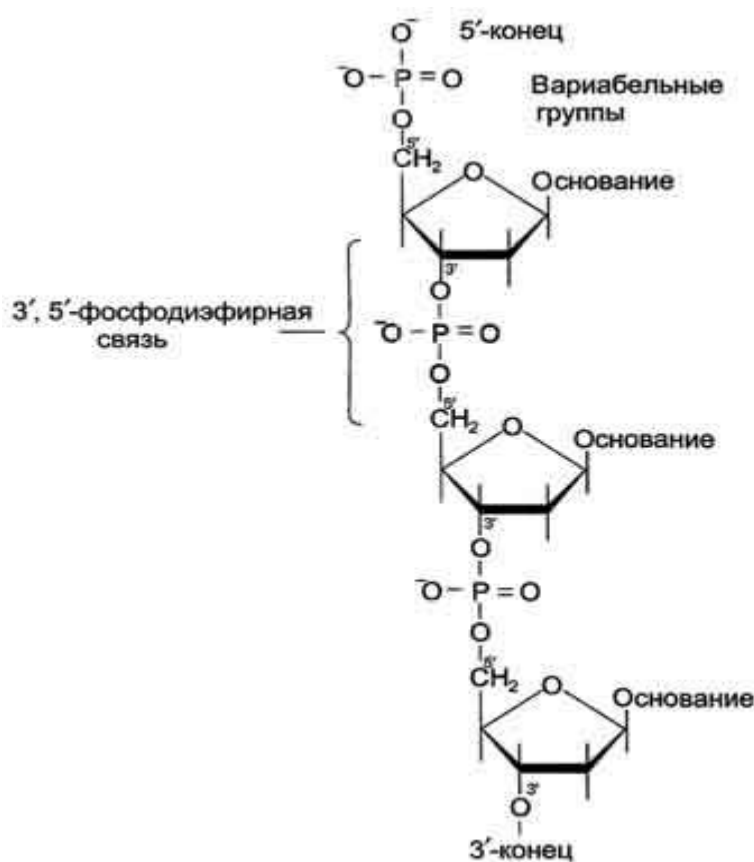


Рис. 10. Фрагмент цепи ДНК.

Варибельными группами в полинуклеотидных цепях служат азотистые основания - пурины и пиримидины. В молекулы РНК входят аденин (А), урацил (U), гуанин (G) и цитозин (С), в ДНК - аденин (А), тимин (Т), гуанин (G) и цитозин (С). Уникальность структуры и функциональная индивидуальность молекул ДНК и РНК определяются их первичной структурой - последовательностью азотистых оснований в полинуклеотидной цепи.

Первичная структура ДНК - порядок чередования дезоксирибонуклеозидмонофосфатов (дНМФ) в полинуклеотидной цепи. Каждая фосфатная группа в полинуклеотидной цепи, за исключением фосфорного остатка на 5'-конце молекулы, участвует в образовании двух эфирных связей с участием 3'- и 5'-углеродных атомов двух соседних дезоксирибоз, поэтому связь между мономерами обозначают 3', 5'-фосфодиэфирной.

Концевые нуклеотиды ДНК различают по структуре: на 5'-конце находится фосфатная группа, а на 3'-конце цепи - свободная ОН-группа. Эти концы называют 5'- и 3'-концами. Линейная последовательность дезоксирибонуклеотидов в полимерной цепи ДНК обычно сокращённо записывают с помощью однобуквенного кода, например -А-Г-С-Т-Т-А-С-А- от 5'- к 3'-концу.

В каждом мономере нуклеиновой кислоты присутствует остаток фосфорной кислоты. При рН 7 фосфатная группа полностью ионизирована, поэтому *in vivo* нуклеиновые кислоты существуют в виде полианионов (имеют множественный отрицательный заряд). Остатки пентоз тоже проявляют гидрофильные свойства. Азотистые основания почти нерастворимы в воде, но некоторые атомы пуринового и пиримидинового циклов способны образовывать **водородные связи**.

Вторичная структура ДНК. В 1953 г. Дж. Уотсоном и Ф. Криком была предложена модель пространственной структуры ДНК. Согласно этой модели, молекула ДНК имеет форму спирали, образованную двумя полинуклеотидными цепями, закрученными относительно друг друга и вокруг общей оси. Двойная спираль **правозакрученная**, полинуклеотидные цепи в ней **антипараллельны** (рис. 11), т.е. если одна из них ориентирована в направлении 3'→5', то вторая - в направлении 5'→3'. Поэтому на каждом из концов молекулы ДНК расположены 5'-конец одной цепи и 3'-конец другой цепи.

Молекулы ДНК состоят из двух антипараллельных цепей с комплементарной последовательностью нуклеотидов. Цепи закручены относительно

друг друга в правозакрученную спираль так, что на один виток приходится примерно 10 пар нуклеотидов.

Все основания цепей ДНК расположены внутри двойной спирали, а пентозофосфатный остов - снаружи. Полинуклеотидные цепи удерживаются относительно друг друга за счёт водородных связей между комплементарными пуриновыми и пиримидиновыми азотистыми основаниями А и Т (две связи) и между G и C (три связи) (рис. 12). При таком сочетании каждая пара содержит по три кольца, поэтому общий размер этих пар оснований одинаков по всей длине молекулы. Водородные связи при других сочетаниях оснований в паре возможны, но они значительно слабее.

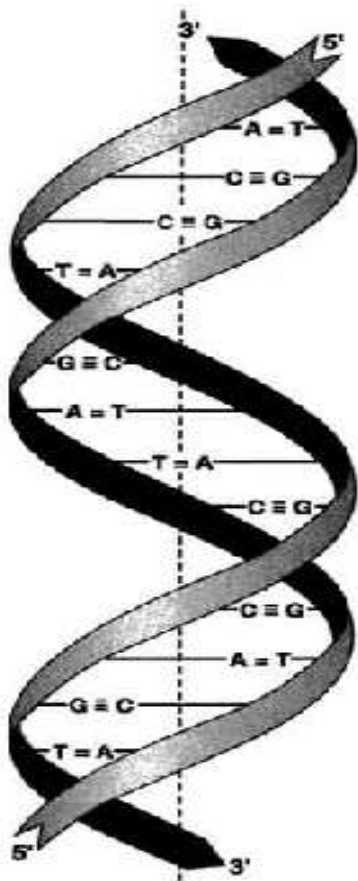


Рис. 11. Двойная спираль ДНК.

Последовательность нуклеотидов одной цепи полностью комплементарна последовательности нуклеотидов второй цепи. Поэтому, согласно правилу Чаргаффа (Эрвин Чаргаффа в 1951 г. установил закономерности в соотноше-

нии пуриновых и пиримидиновых оснований в молекуле ДНК), число пуриновых оснований (A + G) равно числу пиримидиновых оснований (T + C).

Комплементарные основания уложены в стопку в сердцевине спирали. Между основаниями двухцепочечной молекулы в стопке возникают **гидрофобные взаимодействия**, стабилизирующие двойную спираль.

Такая структура исключает контакт азотистых остатков с водой, но стопка оснований не может быть абсолютно вертикальной. Пары оснований слегка смещены относительно друг друга. В образованной структуре различают две бороздки - большую, шириной 2,2 нм, и малую, шириной 1,2 нм. Азотистые основания в области большой и малой бороздок взаимодействуют со специфическими белками, участвующими в организации структуры хроматина.



Рис. 12. Пурип-пиримидиновые пары оснований в ДНК.

Комплементарные основания уложены в стопку в сердцевине спирали. Между основаниями двухцепочечной молекулы в стопке возникают **гидрофобные взаимодействия**, стабилизирующие двойную спираль.

Такая структура исключает контакт азотистых остатков с водой, но стопка оснований не может быть абсолютно вертикальной. Пары оснований слегка смещены относительно друг друга. В образованной структуре различают две бороздки - большую, шириной 2,2 нм, и малую, шириной 1,2 нм. Азотистые основания в области большой и малой бороздок взаимодействуют со специфическими белками, участвующими в организации структуры хроматина.

Третичная структура ДНК (суперспирализация ДНК). Каждая молекула ДНК упакована в отдельную хромосому. В диплоидных клетках человека содержится **46 хромосом**. Общая длина ДНК всех хромосом клетки составляет 1,74 м, но она упакована в ядре, диаметр которого в миллионы раз меньше. Чтобы расположить ДНК в ядре клетки, должна быть сформирована очень компактная структура. Компактизация и суперспирализация ДНК осуществляются с помощью разнообразных белков, взаимодействующих с определёнными последовательностями в структуре ДНК. Все связывающиеся с ДНК эукариотов белки можно разделить на 2 группы: **гистоновые и негистоновые белки**. Комплекс белков с ядерной ДНК клеток называют хроматином.

Гистоны - белки с молекулярной массой 11-21 кД, содержащие много остатков аргинина и лизина. Благодаря положительному заряду гистоны образуют ионные связи с отрицательно заряженными фосфатными группами, расположенными на внешней стороне двойной спирали ДНК.

Существует 5 типов гистонов. Четыре гистона H2A, H2B, H3 и H4 образуют октамерный белковый комплекс (H2A, H2B, H3, H4)₂, который называют "**нуклеосомный кор**" (от англ. *nucleosome core*). Молекула ДНК "накручивается" на поверхность гистонового октамера, совершая 1,75 оборота (око-

ло 146 пар нуклеотидов). Такой комплекс гистоновых белков с ДНК служит основной структурной единицей хроматина, её называют **"нуклеосома"**. ДНК, связывающую нуклеосомные частицы, называют линкерной ДНК. В среднем линкерная ДНК составляет 60 пар нуклеотидных остатков. Молекулы гистона H1 связываются с ДНК в межнуклеосомных участках (линкерных последовательностях) и защищают эти участки от действия нуклеаз (рис. 13).

В ядре каждой клетки присутствует около 60 млн молекул каждого типа гистонов, а общая масса гистонов примерно равна содержанию ДНК. Аминокислотные остатки лизина, аргинина и концевые аминокислоты гистонов могут модифицироваться: ацетилироваться, фосфорилироваться, метилироваться или взаимодействовать с белком убиквитином (негистоновый белок). Модификации бывают обратимыми и необратимыми, они изменяют заряд и конформацию гистонов, а это влияет на взаимодействие гистонов между собой и с ДНК. Активность ферментов, ответственных за модификации, регулируется и зависит от стадии клеточного цикла. Модификации делают возможными конформационные перестройки хроматина.

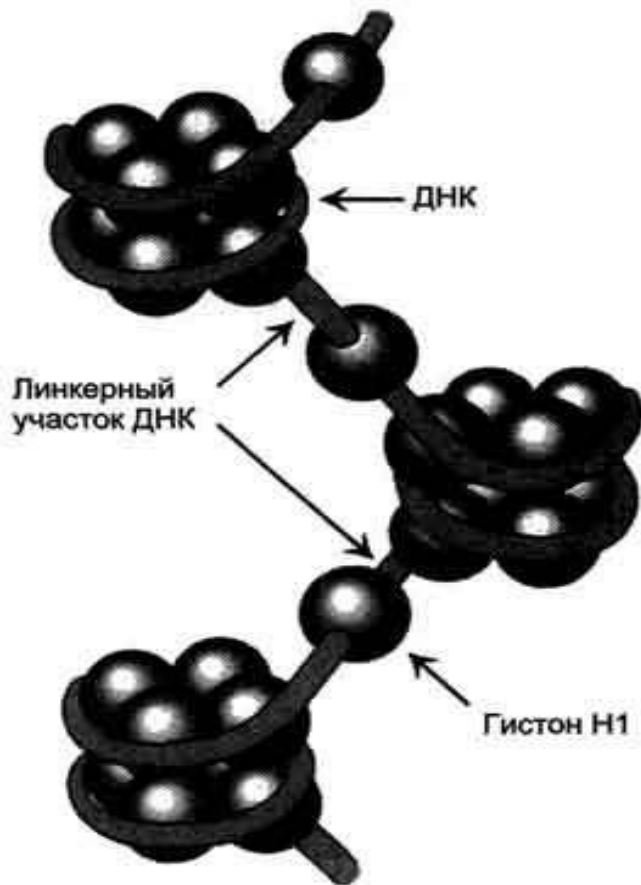


Рис. 13. Структура нуклеосом. Восемь молекул гистонов (H2A, H2B, H3, H4)₂ составляют ядро нуклеосомы, вокруг которого ДНК образует примерно 1,75 витка.

Митохондрии - важнейшие органеллы клеток, осуществляющие синтез АТФ за счёт окисления субстратов. Митохондрии имеют собственный уникальный геном, наследуемый по материнской линии, так как он происходит из цитоплазмы яйцеклетки. Геном митохондрий сперматозоидов не попадает в оплодотворённую яйцеклетку.

Митохондриальный геном человека представлен одной кольцевой молекулой ДНК из 16 569 нуклеотидных пар (рис. 14). Он кодирует 13 белков, используемых на построение структурно-функциональных компонентов митохондрий.

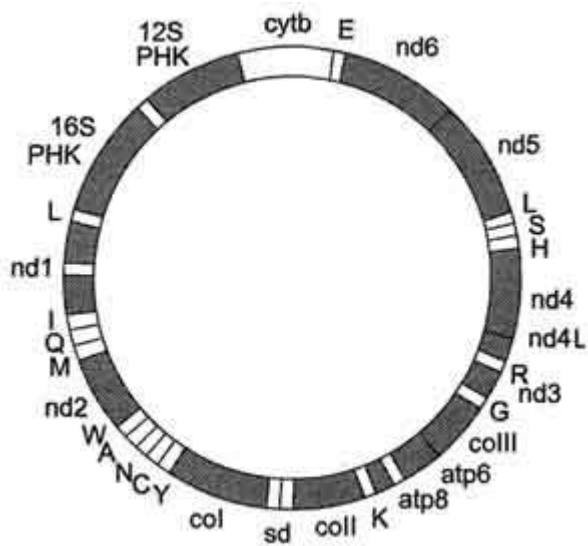


Рис. 14. Кольцевая молекула митохондриальной ДНК. Гены *nd1-nd6*, *nd4l* кодируют субъединицы NADH-дегидрогеназного комплекса; ген *coi-III* - субъединицы цитохромоксидазы; ген *cytb* - цитохром B. Гены *atp 8* и *atp 6* кодируют субъединицы АТФ-синтазы (NADH-дегидрогеназный комплекс, цитохромоксидаза, цитохром b - белки, участвующие в энергетическом обмене). Остальные гены кодируют рибосомные (12S РНК и 16S РНК) и транспортные РНК соответствующих аминокислот, обозначенные латинскими буквами.

Структура рибонуклеиновых кислот (РНК).

Первичная структура РНК - порядок чередования рибонуклеозидмонофосфатов (НМФ) в полинуклеотидной цепи. В РНК, как и в ДНК, нуклеотиды связаны между собой 3',5'-фосфодиэфирными связями. Концы полинуклеотидных цепей РНК неодинаковы. На одном конце находится фосфорилированная ОН-группа 5'-углеродного атома, на другом конце - ОН-группа 3'-углеродного атома рибозы, поэтому концы называют 5'- и 3'-концами цепи РНК. Гидроксильная группа у 2'-углеродного атома рибозы делает молекулу РНК нестабильной. Так, в слабощелочной среде молекулы РНК гидролизуются даже при нормальной температуре, тогда как структура цепи ДНК не изменяется.

Вторичная структура РНК. Молекула рибонуклеиновой кислоты построена из одной полинуклеотидной цепи. Отдельные участки цепи РНК об-

разуют спирализованные петли - "шпильки", за счёт водородных связей между комплементарными азотистыми основаниями А-У и G-C. Участки цепи РНК в таких спиральных структурах антипараллельны, но не всегда полностью комплементарны, в них встречаются неспаренные нуклеотидные остатки или даже одноцепочечные петли, не вписывающиеся в двойную спираль. Наличие спирализованных участков характерно для всех типов РНК.

Третичная структура РНК. Одноцепочечные РНК характеризуются компактной и упорядоченной третичной структурой, возникающей путём взаимодействия спирализованных элементов вторичной структуры. Так, возможно образование дополнительных водородных связей между нуклеотидными остатками, достаточно удалёнными друг от друга, или связей между ОН-группами остатков рибозы и основаниями. Третичная структура РНК стабилизирована ионами двухвалентных металлов, например ионами Mg^{2+} , связывающимися не только с фосфатными группами, но и с основаниями.

Основные типы РНК. В цитоплазме клеток присутствуют 3 типа рибонуклеиновых кислот - транспортные РНК (тРНК), матричные РНК (мРНК) и рибосомальные РНК (рРНК). Они различаются по первичной структуре, молекулярной массе, конформации, продолжительности жизни и, самое главное, по функциональной активности.

Транспортные РНК (тРНК). Пространственную структуру любых тРНК, независимо от различий в последовательности нуклеотидов, описывают универсальной моделью "клеверного листа" (рис. 15).

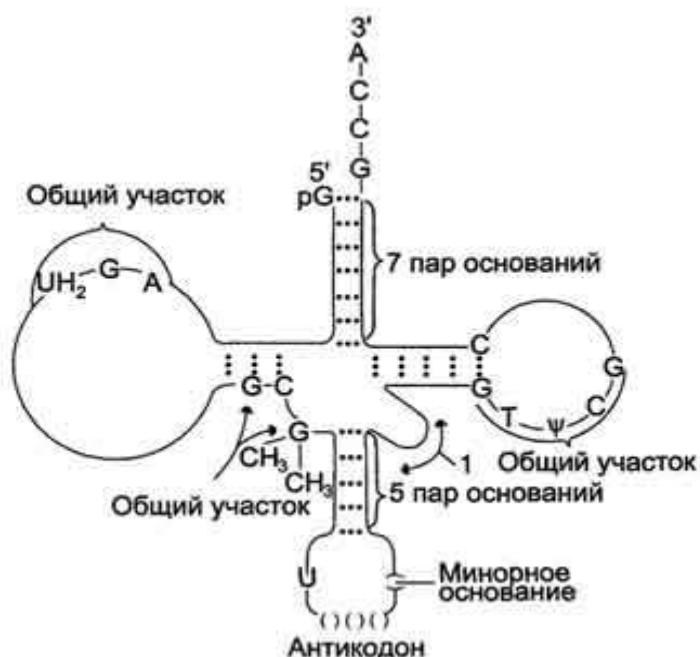


Рис. 15. Строение транспортных РНК.

Спирализованные участки обозначены на рисунке пунктиром; "общие участки" одинаковы у всех тРНК; 1 - петля переменного размера; UH_2 (дигидроурацил), ψ (псевдоурацил) - минорные основания; антикодону всегда предшествует U (урацил), а после него всегда стоит минорное основание.

В каждой молекуле тРНК есть участки цепи, не участвующие в образовании водородных связей между нуклеотидными остатками. К ним, в частности, относят участок, ответственный за связывание с аминокислотой на 3'-конце молекулы и антикодон - специфический триплет нуклеотидов, взаимодействующий комплементарно с кодоном мРНК.

В состав нуклеотидов тРНК входят минорные основания (в среднем 10-12 оснований на молекулу). Они представлены метилированными основаниями, изомерами и аналогами пиримидинов (рис. 16).



Рис. 16. Минорные основания тРНК.

Минорные основания выполняют 2 функции: они делают тРНК устойчивыми к действию нуклеаз цитоплазмы и поддерживают определённую третичную структуру молекулы, так как не могут участвовать в образовании комплементарных пар, и препятствуют спирализации определённых участков в полинуклеотидной последовательности тРНК.

Матричные РНК (мРНК). Первичная структура всех мРНК, независимо от уникальности их кодирующей последовательности, имеет одинаковое строение 5'- и 3'-концов. Так, на 5'- конце присутствует модифицированный нуклеотид **7-метилгуанозин-5'-трифосфат** (кэп). Несколько десятков нуклеотидов отделяют кэп от иницирующего кодона, обычно это триплет - AUG-. За кодирующим участком следует один из терминирующих кодонов - **UGA-, -UUA-, -UAG-**. На 3'-конце большинства мРНК присутствует последовательность нуклеотидов из 100-200 аденозинмонофосфатных остатков.

Рибосомальные РНК (рРНК). Рибосомальные РНК имеют многочисленные спирализованные участки. Различают рРНК - 5S, 5,8S, 28S и 18S (S - коэффициент седиментации). Рибосомальные РНК содержат несколько модифицированных нуклеотидов, чаще всего это метилированные производные азотистых оснований или рибозы (2'-метилрибоза). рРНК образуют комплексы с белками, которые называют рибосомами. Каждая рибосома состоит из двух субъединиц - малой (40S) и большой (60S). Субъединицы рибосом различаются не только набором рРНК, но и количеством и структурой белков.

Величина S характеризует скорость оседания частиц при ультрацентрифугировании и пропорциональна их молекулярной массе. Рибосома прокариотов (70S) состоит из 50S и 30S субъединиц, эукариотов (80S) - состоит из субъединиц 60S и 40S. Рибосомы эукариотов и прокариотов различаются по молекулярной массе субъединиц, количеству молекул рРНК, массе рРНК, количеству и разнообразию белков, способных связывать специфические лиганды.

7.1 Выделение суммарной ДНК из тканей растений

Методики выделения растительной ДНК включают следующие этапы:

1) Измельчение тканей и разрушение клеточных стенок (гомогенизация).

Гомогенизацию часто проводят путём растирания тканей в жидком азоте.

2) Разрушение клеточных мембран (лизис клеток). Эту операцию проводят для того, чтобы ДНК могла выйти в буфер для экстракции. Для лизиса клеток чаще всего используют детергенты, такие как додецилсульфат натрия, цетилтриметиламмоний бромид.

3) Очистку ДНК от белков (депротеинизацию). Очистку осуществляют с помощью экстракции белков хлороформом и (или) фенолом. Для более быстрой и более полной очистки препаратов ДНК также применяют ферменты протеиназы, которые приводят к гидролизу белков.

Для осаждения ДНК из раствора используют низкомолекулярные спирты (этанол или изопропанол).

Получение препаратов нуклеиновых кислот – ДНК и РНК – первоочередная задача при изучении структуры и экспрессии генов, при проведении биотехнологических экспериментов с растениями. Экстракция ДНК является неотъемлемой частью анализа генома растений с помощью различных молекулярных методов, создания библиотек (банков) генов, анализа экспрессии чужеродной ДНК в трансформированных клетках и в целых регенерировавших растениях.

Из-за особенностей различных видов растений и специфичности органов одного растения (присутствие определённых вторичных метаболитов, прежде всего полифенолов, органических кислот и эфирных веществ у древесных форм, повышенное содержание белков, полисахаридов и других веществ) в настоящее время разработаны сотни методик выделения ДНК, например метод выделения суммарной ДНК с использованием раствора ацетата калия, метод выделения суммарной ДНК с использованием детергента, метод выделения суммарной ДНК из растений с повышенным содержанием фенолов,

метод быстрого и простого выделения ДНК для проведения маркер-ассоциированной селекции и массового анализа растений.

7.2 Выделение ядер и ядерной ДНК из растительных тканей

Выделение и очистка ядер и других клеточных органелл из растительной ткани – необходимые этапы многих биохимических, молекулярно-биологических исследований. Ядерную ДНК выделяют в тех случаях, когда примеси ДНК цитоплазматических органелл (митохондрий, протопластов) нежелательны. В генно-инженерных исследованиях такие ситуации встречаются довольно часто.

Методы выделения ядер широко известны, но они разработаны в основном для животных тканей. Выделение ядер из растительных тканей намного сложнее, что связано с рядом особенностей растительных тканей: наличием плотных клеточных стенок, присутствием хлоропластов, липидных и крахмальных гранул и т.д.

Обычная процедура выделения ядер состоит из нескольких этапов, включающих стадии гомогенизации, фильтрации, низкоскоростного центрифугирования, дальнейшей очистки и разделения полученного осадка, в котором ядра смешаны с другими клеточными компонентами.

Гомогенизацию растительных тканей нельзя проводить с помощью методов, разработанных для животных тканей, поскольку растительные клетки имеют очень плотные клеточные стенки. В связи с этим клеточные оболочки разрушают в жидком азоте в ступке пестиком или с помощью высокоскоростной гомогенизации.

Неразрушенные клетки и клеточные оболочки фильтруют и повторно гомогенизируют материал, оставшийся на фильтре, что способствует увеличению количественного выхода ядер. Затем гомогенат фильтруют ещё раз, причём при каждом последующем фильтровании используют фильтры с более мелкими порами.

После гомогенизации важно сохранить ядра в интактном состоянии, что прежде всего зависит как от состава буферной смеси, так и от значения рН, которое должно быть в физиологических пределах 6,0...8,0. Осмотическое давление поддерживают с помощью сахарозы, декстрана и других осмотиков. Чтобы сохранить метаболическую активность и мембранную структуру ядер, в буферы для выделения включают ионы магния и кальция.

Для достижения большей чистоты ядерных препаратов очистку от пластидных примесей целесообразно проводить с помощью центрифугирования.

7.3 Выделение хлоропластной и митохондриальной ДНК.

Методика выделения ДНК из органелл похожа на методику выделения ядерной ДНК. Схема выделения ДНК из органелл включает несколько этапов:

1) Мягкое разрушение клеточной мембраны в условиях, когда мембраны хлоропластов и митохондрий остаются целыми.

2) Разделение ядерной, хлоропластной и митохондриальной фракций с помощью центрифугирования: отделение с помощью низкоскоростного центрифугирования, осаждение при среднескоростном центрифугировании хлоропластов, осаждение при высокоскоростном центрифугировании митохондрий.

3) обработку полученных препаратов хлоропластов и митохондрий для очистки примесей ядерной ДНК.

4) лизис органелл, выделение и очистку хлоропластной и митохондриальной ДНК.

Наиболее часто применяют методику выделения ДНК из хлоропластов и митохондрий с помощью центрифугирования в градиенте сахарозы или перколлы. Это довольно трудоёмкая и длительная методика. Но возможные примеси ядерной ДНК при этом минимальны.

7.4 Методы анализа ДНК

Существует 2 основных метода анализа ДНК – электрофорез ДНК в агарозном геле и рестрикционный анализ ДНК.

Электрофорез в агарозном геле – стандартный метод, используемый для разделения, идентификации и очистки фрагментов ДНК. С помощью этой простой техники быстро разделяют такие смеси фрагментов ДНК, которые нельзя разделить другими способами. Кроме того, часто удобно наблюдать за распределением фрагментов ДНК, так как её полосы в геле хорошо окрашиваются.

Метод электрофореза основан на разделении молекул в электрическом поле. В растворе ДНК присутствует в виде аниона, и при помещении раствора между обкладками конденсатора молекулы двигаются к положительно заряженному полюсу. Чем длиннее молекула, тем больше её заряд и сила действия электрического поля, но при этом увеличивается и сопротивление среды. Но оно растёт быстрее, и поэтому скорость движения молекулы зависит от размера молекулы. Если эту процедуру проделать в растворе, то разделение фрагментов ДНК достичь не удастся. Поэтому электрофорез нуклеиновых кислот проводят в носителе, которым служит гель – концентрированный раствор полимера агарозы или акриламида.

Рестрицирующие нуклеазы, или рестриктазы – это группа ферментов эндонуклеаз, узнающих определённые последовательности нуклеотидов в ДНК и расщепляющих двойную спираль.

Известно 3 основных типа ферментов рестрикции:

1) Рестрицирующие нуклеазы 1 типа узнают определённую последовательность нуклеотидов и разрезают двуцепочечную молекулу ДНК на каком-то расстоянии вблизи от этой последовательности.

2) рестриктазы 2 типа узнают инвертированные повторы, обладающие центральной симметрией и считывающиеся в обе стороны одинаково. Они разрезают молекулу ДНК внутри сайта рестрикции.

3) эндонуклеазы 3 типа узнают определённую последовательность и разрезают двойную спираль.

Наибольший интерес для молекулярной биологии и генетической инженерии представляют рестриктазы 2 типа, так как они позволяют получать фрагменты ДНК. Кроме того, они дают возможность превращать молекулы очень большого размера в набор фрагментов длиной от нескольких сотен до нескольких тысяч пар оснований.

7.5 Генная инженерия

Генетическая инженерия – перспективное направление современной молекулярной биологии, имеющее большое научное и практическое значение и лежащее в основе современной биотехнологии. С помощью этой техники фрагменты ДНК, кодирующие интересующие нас белки, вводят в быстро реплицирующиеся генетические элементы (плазмиды или вирусы). Полученные в результате генетических манипуляций рекомбинантные ДНК (векторы) могут быть перенесены в бактериальные клетки (трансформация) или в клетки животных (трансфекция). Следует отметить, что клонирование молекул стало возможным благодаря открытию целой серии ферментов, оказавшихся незаменимыми инструментами для манипулирования генами. Тем более что практически полностью отсутствуют химические методы, позволяющие получать, модифицировать и амплифицировать молекулы ДНК, представляющие интерес для молекулярного биолога.

С конца 1950-х до начала 1960-х молекулярные биологи научились характеризовать, изолировать, и управлять молекулярными компонентами клеток и организмов. Эти компоненты включают: ДНК – хранителя генетической информации; РНК – близкого родственника ДНК, функции которой колеблются от существования в качестве временной рабочей копии ДНК до, фактически, самостоятельного фермента, а так же компонента аппарата трансляции белков; белки – как главный структурный и функциональный тип клеточных молекул.

Формальной датой рождения генной инженерии считают 1972 г., когда группа П. Берга в США создали первую рекомбинантную молекулу ДНК (рекДНК), объединившую в своем составе генетический материал из трех источников: полный геном онкогенного вируса обезьян SV40, часть генома умеренного бактериофага λ и гены лактозного оперона *E. coli*. Сконструированная рекомбинантная молекула не была исследована функционально, т.к. у авторов этой работы возникли опасения, что методы генетической инженерии могут привести к возникновению микроорганизмов, опасных для здоровья человека, например, бактерий *E. coli*, способных перенести онкогенные вирусы в кишечник человека. Поэтому международным научным сообществом было принято решение проводить такие исследования под строжайшим контролем со стороны государства.

В работах по генетической инженерии используются как методы классической генетики, так и самые современные более тонкие методы молекулярной генетики (такие как выделение и идентификация генов, их секвенирование, картирование, химический и ферментативный синтез, ПЦР-анализ, блот-гибридизация, генный нокаут, генная дактилоскопия и др.).

Для понимания этапов генетической инженерии нужно сначала понять картину технологии в целом (рис.17).

Основными этапами генной инженерии являются следующие:

1. Получение нужного гена (трансгена), намеченного для переноса. Ген может быть выделен из естественных источников (из подходящего генома организма) или геномной библиотеки. Он может быть синтезирован искусственно: химическим путем (по имеющейся последовательности нуклеотидов) или ферментативным путем с использованием механизма обратной транскрипции (синтез кДНК на матрице мРНК с помощью обратной транскриптазы), получен с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

2. Создание специальных генетических конструкций – векторов (переносчиков), в составе которых гены (трансгены) будут внедряться в геном

другого вида или клонированы в клетках про- или эукариот. Клонирование предполагает получение большого числа копий фрагментов ДНК, идентичных исходному.

3. Генетическая трансформация, т.е. перенос и включение генетических векторов (рекДНК) в клетки-мишени хозяина (реципиента).

4. Молекулярная селекция – отбор клонов, несущих рекДНК, осуществляющейся с использованием различных маркерных генов, которые находятся в векторной молекуле наряду с трансгеном.

5. Выращивание измененных клеток в целые трансгенные организмы.

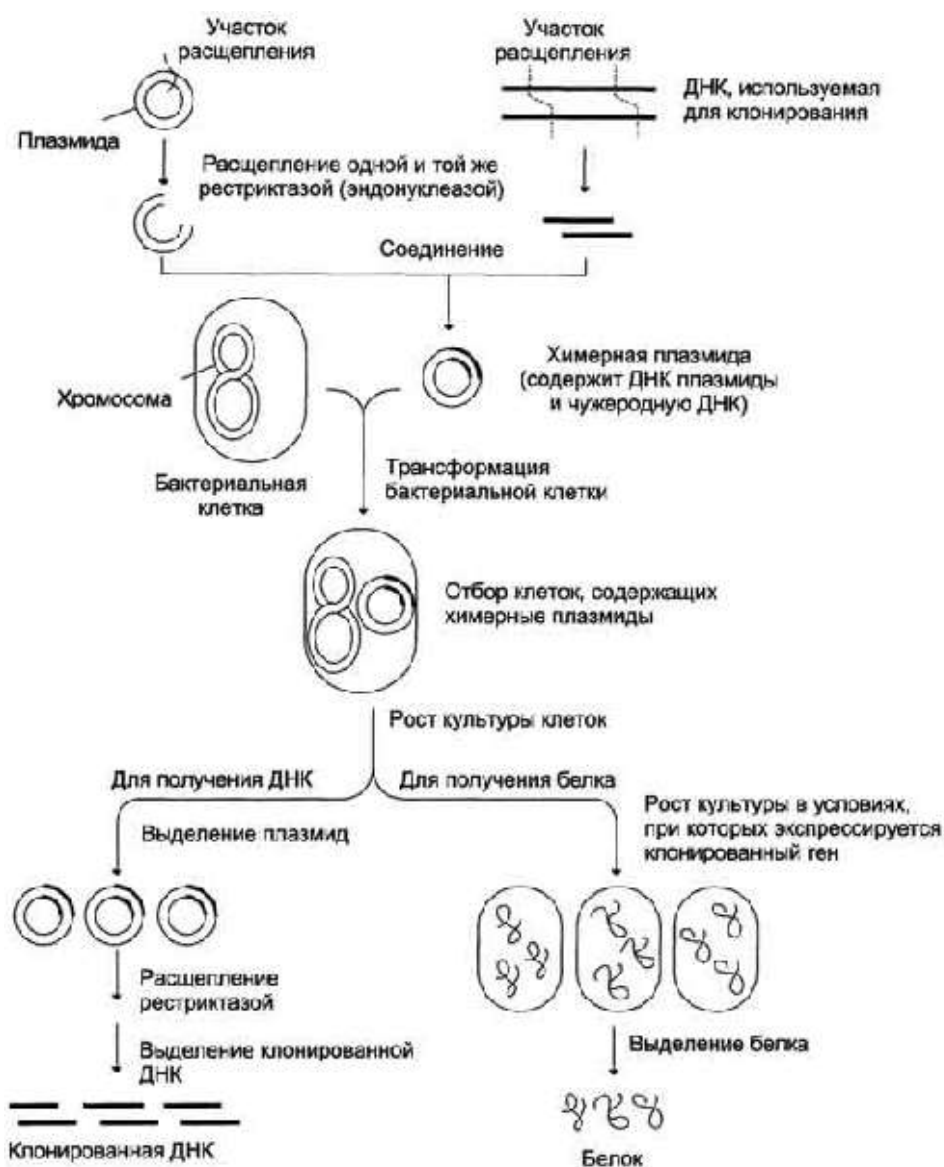


Рис. 17. Схема построения рекомбинантных молекул ДНК и введения их (трансформация) в бактериальные клетки

Работа №13. Размножение бактериальных штаммов и обращение с ними

Пояснение. Микробиологические методики, которые используются в молекулярной биологии, очень просты и не должны представлять затруднений для тех, кто владеет основными приёмами работы в стерильных условиях. Чаще всего приходится сталкиваться с двумя трудностями: с перекрёстным загрязнением штаммов и с утратой или появлением новых генетических маркёров. Оба эти затруднения можно свести к минимуму, если проводить очистку колоний, а затем проверять генотип штамма. Чашки с несоответствующей культурой, как и любые чашки, загрязнённые плесенью или другими грибами, нужно отобрать, проавтоклавировать и утилизировать в соответствии с правилами работы с биологическим материалом.

Бактерии легко могут быть выращены в лабораторных условиях, поэтому некоторые из них играют важную роль в генетических исследованиях. Кишечная палочка (*Escherichia coli*, *E. coli*, по имени автора Теодора Эшериха) – грамотрицательная палочковидная бактерия, которая является частью нормальной флоры кишечника человека и животных. Кишечная палочка является одним из самых изученных прокариотических микроорганизмов и одним из самых важных объектов биотехнологии и микробиологии (рис. 18).

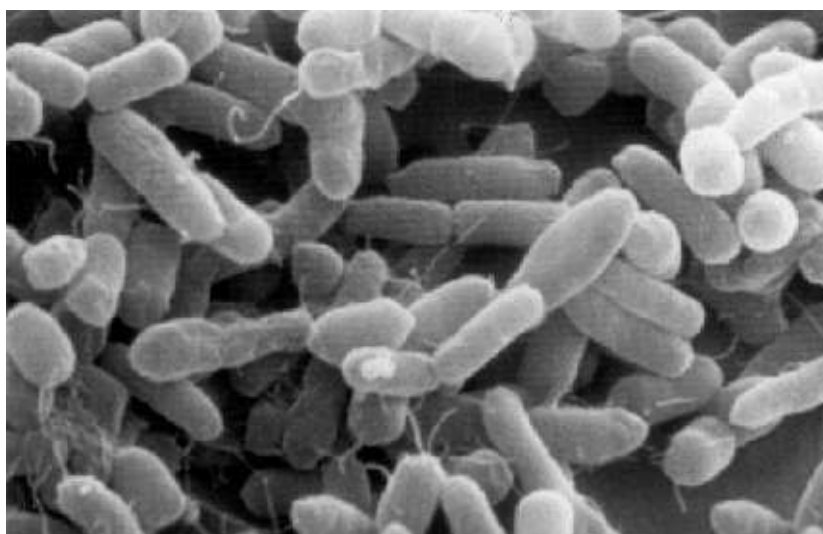


Рис. 18. Фотография бактерий кишечной палочки, сделанная с помощью сканирующего электронного микроскопа

В идеальных условиях культура *E. coli* растёт экспоненциально. Скорость роста культуры зависит от среды, генотипа штамма, температуры и аэрации. По мере увеличения плотности культуры скорость деления клеток снижается до тех пор, пока бактерии не достигнут такой концентрации, при которой они больше уже не делятся, но остаются жизнеспособными.

Наилучшей аэрации культуры достигают в том случае, если поместить колбу или пробирку в ротационную качалку или на вращающуюся платформу. Объём сосуда должен, по крайней мере, в четыре раза превышать объём содержащейся в нём среды, чтобы его можно было энергично встряхивать (на ротационной качалке при 200 об/мин).

В задачи лабораторной работы входит получение навыков работы с лабораторными микроорганизмами и опыта выделения изолированных колоний (кишечной палочки в этом случае), что необходимо для дальнейшей работы.

Материалы и оборудование

Следующие материалы необходимы для каждого студента или пары студентов:

Материалы: Триптон, дрожжевой экстракт, NaCl, NaOH, Агар.

Оборудование: Чашки Петри (100 мм), колба Эрленмейера на 1000 мл, автоклав, спиртовка, спички, металлическая петля.

Ход работы

Методика выращивания культуры клеток кишечной палочки.

В чистой колбе Эрленмейера приготовьте среду LB (Лурия-Бертани):

Добавьте следующие компоненты к 800 мл H₂O:

10 г триптона;

5 г дрожжевого экстракта;

10 г NaCl.

Доведите до pH 7,5 с помощью NaOH (~ 400 мкл 2,5М NaOH)

Доведите объём до 1 л дистиллированной H₂O

Закройте колбу ватно-марлевой пробкой, сверху пробку накройте фольгой.

Простерилизуйте среду в автоклаве.

Для приготовления твёрдой среды, нужно добавить 15 г агара до того как компоненты будете доводить водой и автоклавировать.

После автоклавирования, охладите среду до 55°C если будете добавлять термолабильные вещества (например, антибиотики или глюкозу). Разлейте проавтоклавленную среду по чашкам прямо из колбы, наливая примерно 30-35 мл в стеклянную чашку Петри (в одноразовую пластиковую чашку наливать примерно 20-25 мл) диаметром 100 мм. Если образуются пузырьки, то, не дожидаясь пока застынет агар, следует провести раскалённой иглой по поверхности пузырей. Как правило, прежде чем использовать чашки с приготовленной средой, их следует выдержать в течение 1 суток при комнатной температуре, чтобы не происходила конденсация паров воды, и крышки не запотевали. Также, готовые чашки можно упаковать в пластиковый пакет и хранить в холодильнике при 4°C. Перед использованием их необходимо выдержать закрытыми при комнатной температуре для того чтобы они полностью просохли в течение 2 часов, или открытыми под ламинаром в течение 1 часа. Избыток влаги приводит к расплыванию колоний бактерий и заражению их спорами грибов.

Выделение отдельных колоний (рассев штрихом).

1. Простерилизуйте металлическую петлю в пламени, пока она не накалится до светло красного цвета. Охладите её на воздухе (можно для более быстрого охлаждения воткнуть её в стерильную агаризованную среду).

2. Охлаждённой петлёй захватите бактерии со старой чашки.

3. Коснитесь петлёй отдельной, хорошо изолированной колонии, выросшей на поверхности твёрдой среды. Нанесите прилипшие к петле бактерии штрихом на верхний сегмент чашки с агаром.

4. Один раз проведите петлёй поперёк первичного штриха и рассыйте прилипшие к петле бактерии по свежей области агаризованной среды.

5. Затем снова проведите петлёй поперёк на этот раз вторичного штриха и снова рассыйте прилипшие к петле бактерии по свежей области агаризованной среды. В результате вы должны получить (если всё сделано правильно) на следующий день отдельные колонии бактерий (рис. 19.).

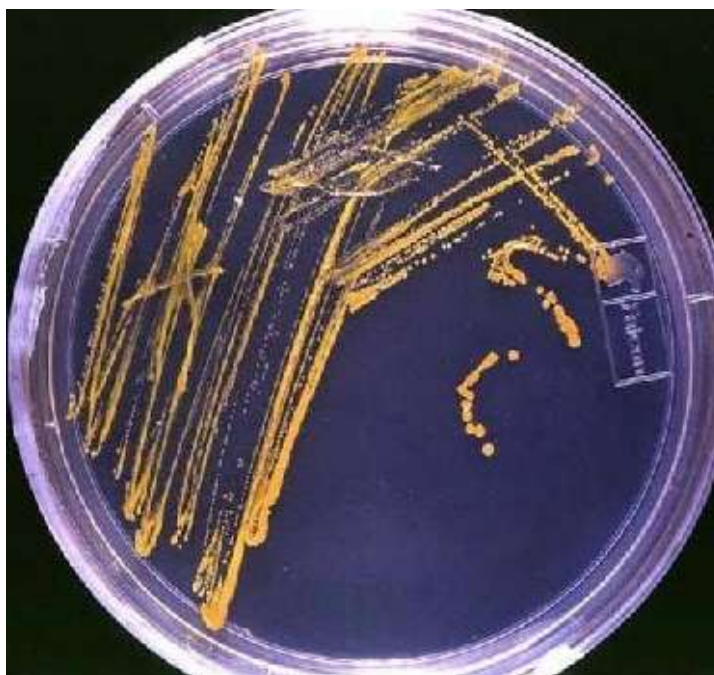


Рис. 19. Колонии кишечной палочки на чашках Петри

6. Чашку с посеянными бактериями поместите в термостат при температуре 37°C.

7. Достаньте чашку из инкубатора, проверьте наличие колоний и зафиксируйте результаты.

8. В течение нескольких недель колонии большинства штаммов бактерий могут храниться на поверхности агаризованной среды, если чашки плотно заклеить парафином и держать перевернутыми при 4°C в холодильнике или холодной комнате.

Работа № 14. Выделение плазмидной ДНК из бактерий *E. coli*

Пояснение. Для выделения плазмидной ДНК пользуются многими методами. Все они включают три основных этапа: рост бактерий и амплификацию плазмиды; сбор бактерий и их лизис; очистку плазмидной ДНК.

Амплификацию плазмид производят при выращивании бактерии-хозяина в богатой среде в присутствии хлорамфеникола. Ночную культуру (10 мл LB с добавлением антибиотика) пересевают в свежую среду LB (0.2 мл н.к. в 25 мл LB с антибиотиком) и инкубируют пока культура не достигнет поздней логарифмической фазы ($D_{600}=0,6$). Переносят культуру в свежую среду LB с антибиотиком (500 мл), инкубируют 2,5 часа (при этом титр удваивается), добавляют антибиотик до концентрации 170 мкг/мл и инкубируют еще 12-16 ч.

Лизиса (разрушения бактерий) для последующего выделения биологически активной ДНК можно добиться разными способами.

- Механические. При этом происходят многочисленные разрывы ДНК.
- У многих бактерий наступает лизис после добавления анионного детергента додецилсульфата (или лаурилсульфата). В частности, так можно разрушить бактерии кишечной группы, пневмококки и гемофильные бактерии. Додецилсульфат не только разрушает клетки, но и денатурирует некоторые белки. Однако затем он должен быть полностью удален из лизата (что и достигается при последующих обработках), так как его примесь в трансформирующей ДНК мешает самому процессу трансформации.

Некоторые грамположительные бактерии нельзя разрушить только додецилсульфатом или другими поверхностно-активными веществами. Вначале нужно удалить клеточную стенку и затем применить тот или иной детергент. Для разрушения клеточной стенки чаще всего применяют лизоцим.

При разрушении бактерий в лизате в числе прочих ферментов появляются дезоксирибонуклеазы. Они, если действие их чем-либо не заблокировано, могут тут же разрушить ДНК. Обычно от них защищаются, добавляя веществ-

ва, которые связывают ионы магния, требующиеся для работы большинства ДНКаз. Вещества, связывающие ионы магния это ЭДТА, цитрат. ЭДТА – разрыхляет наружную мембрану, ингибирует нуклеазы. Лизоцим – разрушает клеточную стенку. SDS – разрушает цитоплазматическую мембрану, денатурирует белки, ингибирует нуклеазы.

Очистка ДНК. В методах очистки так или иначе используют два основных различия между ДНК *Escherichia coli* и плазмидной ДНК: 1) хромосома *E. coli* по размеру много больше ДНК плазмид, обычно используемых в качестве векторов; 2) основная масса ДНК *E. coli* выделяется из клеток в виде фрагментированных линейных молекул, тогда как большинство плазмидной ДНК экстрагируется в виде ковалентно замкнутых кольцевых молекул.

Плазмидная ДНК ведет себя отлично от ДНК *E. coli* также и при равновесном центрифугировании в градиенте хлористого цезия, содержащих какой-нибудь интеркалирующий краситель в насыщающей концентрации, например бромистый этидий или дийодистый пропидий. Ковалентно замкнутые кольцевые ДНК связывают меньше такого красителя, чем линейная ДНК, и поэтому в градиентах хлористого цезия, содержащих интеркалирующий агент, оказываются в зонах с более высокой плотностью. Эту методику используют, если необходима высокая степень очистки плазмидной ДНК. Однако по мере развития методов работы с рекомбинантной ДНК для многих целей оказалось уже необязательным проводить очистку больших количеств плазмидной ДНК до такой степени, чтобы препарат был гомогенным. Например, расщепление рестриктирующими эндонуклеазами, лигирование, трансформация и даже секвенирование ДНК можно проводить теперь, используя относительно малоочищенные препараты плазмидной ДНК, полученные из небольших объемов культуры (около 10 мл). Плазмидную ДНК выделяют из больших объемов культуры лишь в тех случаях, когда нужны значительные ее препараты.

Описанные ниже методики можно успешно использовать для выделения разнообразных плазмид из различных штаммов бактерий. Чем меньше плазмиды, тем лучше достигаемые результаты.

Проведем выделение препаративных количеств плазмидной ДНК щелочным методом из клеток бактерий *E. coli*.

Материалы: 5 мл *лизирующего раствора I* (112.6 мкл 40% глюкозы, 125 мкл 1М Трис, рН 8.0, 100 мкл 0.5 М ЭДТА, 10 мг лизоцима, 4.66 мл H₂O); 10 мл *щелочного раствора II* (200 мкл 40% NaOH, 1 мл 10% SDS, 8.8 мл H₂O); *раствор III* (3 М Na-Ас (рН 4.8)).

Ход работы

1. Нарастите культуру в 150 мл среды LB+Amp при 37°C (20-24 часа).
2. Осадите клетки (4000 об/мин, 15 мин).
3. Ресуспендируйте клетки в 2.4 мл раствора I, содержащего 2 мг/мл лизоцима (лизоцим не работает, если рН <8.0).
4. Выдержите 15 мин во льду.
5. Добавьте 4.8 мл свежеприготовленного раствора II. Пробирку закройте парафилмом и осторожно переверните несколько раз.
6. Выдержите 5-10 мин в ледяной бане.
7. Добавьте 7.2 мл охлажденного раствора III. Резко переверните пробирку, заклеенную парафилмом.
8. Выдержите 30-60 мин в ледяной бане.
9. Центрифугируйте 20 мин при 6000 об/мин при 4°C.
10. К супернатанту добавьте 2V этанола и выдержите 1 час в морозильнике (-20°C).
11. Центрифугируйте 30 мин при 6000 об/мин при 4°C.
12. Осадок растворите в 1 мл TE-буфера.

Контрольные вопросы

1. Что такое молекулярная биология?
2. Назовите состав нуклеиновых кислот
3. Как происходит выделение суммарной ДНК из тканей растений?
4. Перечислите основные этапы выделения ядер и ядерной ДНК из растительных тканей
5. Какие вы знаете методы анализа ДНК?
6. Назовите типы ферментов рестрикции
7. Что такое генная инженерия?
8. Что называют вектором в генной инженерии?
9. Основные этапы генной инженерии

Контрольные вопросы для самостоятельной работы.

1. Каковы главные направления использования культуры изолированных клеток и тканей растений в биотехнологии?
2. Дайте определение следующим понятиям: эксплант, тотипотентность, регенерация, генотип, меристема, протопласт.
3. Назовите основные компоненты основных типов питательных сред для культивирования изолированных клеток и тканей.
4. Расскажите о способах стерилизации оборудования.
5. Что такое каллусная ткань и как её получают? Каковы возможности её использования в биотехнологии?
6. Назовите основные типы морфогенеза в культуре каллусных тканей.
7. Как получают и используют культуру клеточных суспензий?
8. Охарактеризуйте культуру одиночных клеток.
9. Что такое клональное микроразмножение растений?
10. Назовите основные этапы клонального микроразмножения растений.

Темы рефератов по изучаемой дисциплине

1. Основные направления биотехнологии.
2. Этапы культивирования изолированных тканей растений. История развития метода.
3. Культура каллусных клеток в получении веществ вторичного синтеза.
4. Особенности и генетика каллусных клеток.
5. Гормоннезависимые (привыкшие) растительные ткани.
6. Получение гаплоидов *in vitro* и использование их в селекции.
7. Криосохранение растений.
8. Получение растений-регенерантов, устойчивых к абиотическим и биотическим стрессовым факторам.
9. Фитогормоны и регуляторы роста в растениеводстве.
10. Синтетические регуляторы роста и развитие растений.
11. Производство незаменимых аминокислот.
12. Реутилизация промышленных и с/х отходов с помощью методов биотехнологии.

Вопросы для подготовки к зачёту по дисциплине

1. Основные направления и задачи биотехнологии.
2. Применение достижений биотехнологии в агропромышленном комплексе.
3. Техника введения в культуру *in vitro*.
4. Условия культивирования изолированных клеток, тканей, клеточных суспензий, органов и протопластов.
5. Культура каллусных тканей. Условия дедифференцировки растительной клетки.
6. Свойства каллусной ткани. Морфогенез в каллусных тканях.
7. Клональное микроразмножение растений, этапы и методы.
8. Репликация ДНК, репарация, процесс генетической рекомбинации.

9. Генетический код, биосинтез белка. Механизм транскрипции и трансляции.
10. Методы трансформации растений и улучшение качества и повышение продуктивности растений методами генной инженерии.
11. Фитогормональная регуляция и саморегуляция у растений.
12. Фитогормоны и синтетические регуляторы роста и развития растений в биотехнологии.
13. Генетические основы биотехнологии в симбиотической азотфиксации.
14. Приготовление питательных сред для культивирования, методы стерилизации растительных объектов и оборудования при проведении работ.
15. Культура клеточных суспензий и одиночных клеток.

Рекомендуемая литература

Основная

1. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева и др.; под ред. В.С. Шевелухи. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш.шк., 2008. – 710с.
2. Калашникова Е.А. Практикум по сельскохозяйственной биотехнологии / Е.А. Калашникова, Е.З. Кочиева, О.Ю. Миронова. – М.: КолосС, 2006. – 144с.

Дополнительная

3. Абрамова З.И. Введение в генетическую инженерию: учебное пособие для самостоятельной внеаудиторной работы студентов по курсу «Генная инженерия» / З.И.Абрамова.- Казань: Казанский университет, 2008. – 169с.
4. Алексеев, В. В. Биотехнология в схемах и таблицах : учеб. пособие [для пед. вузов] / В. В. Алексеев. –Чебоксары : ЧГПУ, 2009. – 95 с.

5. Барсукова, Е. Н. Основные направления и результаты использования методов сельскохозяйственной биотехнологии в Приморском НИИСХ / Е. Н. Барсукова, П. П. Фисенко, Н. И. Хохлова // Достижения науки и техники АПК. – 2008. – № 6. – С. 5-6.
6. Бутенко Р.Г. Биотехнология растений: культура клеток / Р.Г. Бутенко. – М.: Агропромиздат, 1989. – 280с.
7. Бутенко Р.Г. Биотехнология сельскохозяйственных растений / Р.Г. Бутенко. – М.: Агропромиздат, 1987. – 301с.
8. Биотехнологические методы получения и оценки оздоровленного картофеля: рекомендации. – М.: Агропромиздат, 1988. – 34с.
9. Вестник биотехнологии [Электронный ресурс] : научный журнал / О-во биотехнологов России им. Ю. А. Овчинникова. - Электрон. журн. - М. - Режим доступа: <http://www.biorosinfo.ru/>. - Загл. с экрана. - (Дата обращения: 25.02.2010).
10. Жученко А.А. Генетика / А.А. Жученко, Ю.Л. Гужов, В.А. Пухальский. – М.: КолосС, – 2003. – 480с.
11. Основы биотехнологии растений. Культура клеток и тканей: учебное пособие / сост. И.К. Сорокина, Н.И. Старичкова, Т.Б. Решетникова, Н.А. Гринь. – Саратов, – 2002. – 34с.
12. Расторгуев, С. Л. Размножение растений малины в условиях *in vitro* : [с применением биотехнологических приемов (культура изолированных апексов, каллусной и листовой ткани)] / С. Л. Расторгуев // Аграрная наука. – 2007. – № 3. – С. 21-24.
13. Тимофеева О.А., Румянцева Н.И. Культура клеток и тканей растений: учебное пособие. – Казань: Казанский (Приволжский) Федеральный университет, – 2012. – 91с.
14. Шлык-Кернер О.В. Основы генетической инженерии: лабораторный практикум. Ижевск: Издательство «Удмуртский университет», – 2012. – 56 с.

Словарь терминов

Абиотические факторы - совокупность условий неорганической среды, влияющих на организмы. Они делятся на химические (химический состав атмосферы, морских и пресных вод, почвы или донных отложений) и физические, или климатические (температура, барометрическое давление, ветер, течения, радиационный режим и т. д.).

Адвентивные почки – почки на растениях, возникшие из клеток и тканей, обычно их не образующих.

Апекс - верхушка побега, основная часть которого представляет собой конус нарастания, в котором расположена апикальная меристема.

Апикальная меристема - меристема, закладывающаяся на верхушке побега и корня. Апикальные меристемы обеспечивают рост растения в длину.

Аттаргирующая способность – способность активировать транспорт питательных веществ к органу с наибольшей концентрацией фитогормонов-стимуляторов.

Акропетальный транспорт - транспорт веществ в растении по направлению к апикальным меристемам стебля.

Андрогенез – процесс возникновения растения из микроспоры или пыльцевого зерна через соматический эмбриогенез, либо через образование каллуса.

Ауксины – фитогормоны, стимулирующие образование корней у черенков (индолил-3-уксусная кислота, нафтилуксусная кислота)

Бактериофаги (фаги) – вирусы, способные инфицировать бактерии.

Биотические факторы - совокупность влияний, оказываемых на организмы жизнедеятельностью других организмов. Эти влияния носят самый разнообразный характер. Живые существа могут служить источником пищи для других организмов, являться средой обитания (например, организм-хозяин, в котором поселяются паразиты), способствовать их размножению

(например, деятельность животных-опылителей), оказывать химическое (токсины бактерий), механическое и другие воздействия.

Вариабельность – изменчивость (разнообразие) признаков среди представителей данного вида, также свойство потомков отличаться от родительских форм.

Вторичные метаболиты - молекулы, встречающиеся не во всех клетках и не у всех видов живых организмов.

Гаплоид – ядро, клетка, организм, характеризующиеся одинарным набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду (обозначают символом n).

Ген – единичная структура генетической информации, участок молекулы ДНК, кодирующий структуру одной или нескольких полипептидных цепей, или молекул РНК и имеющий определённое строение.

Генная инженерия – совокупность приёмов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных нуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с ними и введению их в другие организмы.

Геном – совокупность всех генов организма.

Гетерозис – повышение жизнеспособности гибридов первого поколения в результате скрещивания исходных родительских форм, отличающихся между собой по ряду признаков и свойств.

Гиббереллины – фитогормоны, активизирующие рост стеблей, вызывающие прорастание семян (гибберелловая кислота).

Гистоны - основной класс нуклеопротеинов, ядерных белков, необходимых для сборки и упаковки нитей ДНК в хромосомы.

Гиногенез – процесс развития растения из клеток зародышевого мешка.

Гипокотиль - самый нижний участок стебля растения — от места перехода стебля в корень (корневой шейки) до первых зародышевых листьев (семядолей).

Гомозиготность – отсутствие различий между идентичными генами родителей.

Гормональная система растений – регуляторный комплекс, состоящий из фитогормонов, их рецепторов и вторичных посредников.

Дедифференциация – переход специализированных, неделящихся клеток к образованию недифференцированных делящихся каллусных клеток.

Депонирование - процесс организованного хранения чего-либо.

Деструкция – разрушение вещества, сопровождаемое потерей его физиологической активности.

Детергент - вещество или смесь, помогающее отмывать что-либо от грязи, моющее средство. Наиболее распространены три вида смесей-детергентов: мыло, стиральный порошок и шампуни.

Детерминация развития – приобретение клеткой, тканью, органом или организмом состояния готовности к развитию по определённому пути, сопровождающееся одновременным ограничением возможностей развития в других направлениях.

Диплоид – ядро, клетка, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленных числом, характерным для данного вида (обозначают символом $2n$).

Диплоидный набор хромосом – два гаплоидных набора хромосом, содержащие хромосомы только одного или обоих родителей.

Дифференцировка клеток – процесс реализации генетически обусловленной программы формирования специализированного фенотипа клеток, отражающего их способность к тем или иным профильным функциям. Иными словами, фенотип клеток есть результат координированной экспрессии (то есть согласованной функциональной активности) определённого набора генов. Деление и дифференцировка — основные процессы, путем которых одиночная клетка (зигота) развивается в многоклеточный организм, содер-

жащий самые разнообразные виды клеток. Дифференцировка меняет функцию клетки, ее размер, форму и метаболическую активность.

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота, это один из двух типов нуклеиновых кислот, обеспечивающих хранение, передачу из поколения в поколение и реализацию генетической программы развития и функционирования живых организмов. Основная роль ДНК в клетках — долговременное хранение информации о структуре РНК и белков.

Зигота – оплодотворённая яйцеклетка.

Инвертированные повторы – две копии одной и той же последовательности ДНК в составе одной молекулы, находящиеся в противоположной ориентации.

Каллус – неорганизованная пролиферирующая ткань, состоящая из недифференцированных клеток.

Клеточная селекция – метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций в условиях *in vitro*.

Клон – популяция клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле.

Клональное микроразмножение – получение растений, генетически идентичных исходному растению, неполовым путём в условиях *in vitro*.

Клонирование – совокупность методов, приводящих к получению генетически идентичных популяций организмов.

Комплементарная цепь – одна из цепей ДНК, используемая в качестве матрицы.

Лигирование – образование фосфодиэфирной связи между двумя основаниями одной цепи ДНК, разделёнными разрывом.

Лизис клеток - растворение, разрушение клеток и их систем, в том числе микроорганизмов, под влиянием различных агентов, например ферментов, бактериолизин, бактериофагов, антибиотиков.

Мацерация - разъединение растительных или животных клеток в тканях.

Мезофилл (листовая паренхима) - мякоть, или основная ткань, листа растений.

Меристема – образовательные ткани с активно делящимися клетками.

Метаболизм – промежуточный обмен, превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов.

Митохондрия - двумембранная гранулярная или нитевидная органелла толщиной около 0,5 мкм. Характерна для большинства эукариотических клеток как аутотрофов (фотосинтезирующие растения), так и гетеротрофов (грибы, животные). Энергетическая станция клетки; основная функция — окисление органических соединений и использование освобождающейся при их распаде энергии в синтезе молекул АТФ, который происходит за счёт движения электрона по электронно-транспортной цепи белков внутренней мембраны.

Морфогенез – процесс формирования органов (органогенез), тканей (гистогенез) и клеток (цитогенез).

Мутагены – факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций в молекуле ДНК.

Мутация – спонтанное или индуцированное изменение в последовательности ДНК, которое в отдельных случаях может приводить к появлению новых признаков и сохранению их в следующих поколениях.

Нуклеиновые кислоты – высокомолекулярные природные соединения (полимеры), состоящие из нуклеотидов. Существует 2 типа нуклеиновых кислот: ДНК и РНК.

Нуклеопротеиды - устойчивые комплексы нуклеиновых кислот с белками, длительное время существующие в клетке в составе органелл или структурных элементов клетки в отличие от разнообразных короткоживущих промежуточных комплексов белок — нуклеиновая кислота (комплексы нук-

леиновых кислот с ферментами — синтетазами и гидролазами — при синтезе и деградации нуклеиновых кислот, комплексы нуклеиновых кислот с регуляторными белками и т. п.).

Нуклеотиды - соединения, из которых состоят нуклеиновые кислоты, многие коферменты и др. биологически активные соединения; каждый нуклеотид построен из азотистого основания (обычно пуринового или пиримидинового), углевода (рибозы или дезоксирибозы) и остатка фосфорной кислоты.

Онтогенез - индивидуальное развитие организма, совокупность последовательных морфологических, физиологических и биохимических преобразований, претерпеваемых организмом от момента его зарождения до конца жизни.

Органогенез – процесс возникновения в неорганизованно растущей массе каллусных клеток зачатков органов (корней и побегов).

Партеногенез – развитие особи с участием только материнских генов.

Плазмида – кольцевая внехромосомная молекула ДНК, обладающая способностью к автономной саморепликации.

Пластиды - органоиды эукариотических растений и некоторых фотосинтезирующих простейших(например у эвглены зеленой). Покрываются двойной мембраной и имеют в своём составе множество копий кольцевой ДНК. Совокупность пластид клетки образует пластидом. По окраске и выполняемой функции выделяют три основных типа пластид: лейкопласты, хромопласты и хлоропласты.

Полимеразная цепная реакция – реакция, основанная на многократной репликации выбранного фрагмента ДНК.

Примордии – листовые зачатки.

Пролиферация – новообразование клеток и тканей путём размножения.

Протеазы – ферменты, которые приводят к гидролизу белков. Используются при выделении нуклеиновых кислот для очистки от белков.

Протопласт – содержимое растительной клетки, лишённой клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Разрыв ДНК – отсутствие фосфодиэфирной связи между двумя соседними нуклеотидами в одной или в обеих цепях ДНК.

Регенерация - свойство всех живых организмов со временем восстанавливать поврежденные ткани, а иногда и целые потерянные органы. Регенерацией также называется восстановление целого организма из его искусственно отделенного фрагмента.

Рекомбинантная ДНК – ДНК, состоящая из фрагментов ДНК двух или более организмов.

Репликация (редупликация) ДНК – самоудвоение молекула ДНК путём образования её копии при помощи ДНК-полимераз.

Рестриктазы (рестрицирующие эндонуклеазы) – специфические бактериальные ферменты, способные расщеплять двуцепочечную молекулу ДНК в определённых местах.

РНК - рибонуклеиновые кислоты, это нуклеиновые кислоты, полимеры нуклеотидов, в состав которых входят остаток ортофосфорной кислоты, рибоза (в отличие от ДНК, содержащей дезоксирибозу) и азотистые основания — аденин, цитозин, гуанин и урацил (в отличие от ДНК, содержащей вместо урацила тимин). Эти молекулы содержатся в клетках всех живых организмов, а также в некоторых вирусах.

Синергизм – эффект взаимного усиления действия веществ, процессов и других факторов.

Соматональная изменчивость – частота колебаний в различии признаков у растений, регенерированных из культивируемых соматических клеток.

Соматоклоны – растения-регенеранты, полученные из соматических клеток и имеющие определённые отличия от исходных форм.

Соматический гибрид – растение-регенерант, полученное путём слияния (гибридизации) соматических клеток.

Соматические клетки - клетки, формирующие тело организма. К **соматическим клеткам** относятся все клетки тела, за исключением гамет.

Соматический эмбриогенез – процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) в культуре ткани и клеток.

Субкультивирование – перенос трансплантов в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

Суспензионная культура – суспензия клеток или их агрегатов во взвешенном состоянии в жидкой среде.

Тотипотентность – свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свою наследственную программу онтогенетического развития с образованием целого организма.

Трансгенные, генетически модифицированные организмы (ГМО) – растения, животные, микроорганизмы и вирусы с изменённой наследственностью, вызванной включением в их геном чужеродных генов с помощью генно-инженерных методов.

Транскрипция - процесс синтеза РНК с использованием ДНК в качестве матрицы, происходящий во всех живых клетках. Другими словами, это перенос генетической информации с ДНК на РНК.

Трансляция - называют осуществляемый рибосомой синтез белка из аминокислот на матрице информационной (или матричной) РНК (иРНК или мРНК).

Трансплант – часть каллусной (суспензионной) культуры, используемой для пересадки на свежую питательную среду.

Фиторегуляторы – природные препараты, вызывающие различные ростовые или формативные эффекты и не обладающие действием удобрений и гербицидов.

Хромосомы – генетические структурные образования клетки, состоящие из ДНК и белков. В хромосомах заключена наследственная информация организма.

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

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

Экстракция - метод извлечения вещества из раствора или сухой смеси с помощью подходящего растворителя (**экстрагента**). Для извлечения из раствора применяются растворители, не смешивающиеся с этим раствором, но в которых вещество растворяется лучше, чем в первом растворителе.

Экспрессия гена – проявление генетической информации, закодированной в гене посредством процессов транскрипции и трансляции.

Ювенильная фаза развития – период заложения, роста и развития вегетативных органов от прорастания семени или вегетативной почки до появления способности к образованию репродуктивных органов.

In vitro – выращивание живого материала, синтез веществ вне клетки (в пробирке, на искусственных питательных средах).

In vivo – выращивание живого материала в естественных условиях.

КИЯШКО НАТАЛЬЯ ВИКТОРОВНА

ОСНОВЫ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ

Учебное пособие

для студентов очной и заочной форм обучения направлений подготовки

35.03.04 Агрономия, 35.03.07 Технология производства и

переработки сельскохозяйственной продукции

Электронное издание

ФГБОУ ВПО «Приморская государственная сельскохозяйственная академия»

692510, г. Уссурийск, пр. Блюхера, 44.

