

С. К. ТУРАШЕВА
С. Б. ОРАЗОВА
Г. Ж. ВАЛИХАНОВА

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ
ДЛЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ
ПО ДИСЦИПЛИНЕ

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ: БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ



Алматы 201

УДК 663.1(075.8)

ББК 30.16

Т 80

*Рекомендовано к изданию Ученым советом факультета
биологии и биотехнологии и Редакционно-издательским
советом КазНУ им. аль-Фараби*

Рецензенты:

доктор биологических наук, профессор *Богуспаев К.К.*

кандидат биологических наук, *Бекманов Б.О.*

кандидат биологических наук, доцент *Асанова Д.К.*

Турашева С.К. и др.

Т 80 Учебно-методическое пособие для самостоятельной работы студентов по дисциплине «Основы биотехнологии: биотехнология растений» / С.К. Турашева, С.Б. Оразова, Г.Ж. Валиханова – Алматы: Казак университеті, 2014. – 258 с.

ISBN 978-601-04-0692-6

В учебно-методическом пособии рассматриваются теоретические и прикладные основы биотехнологии растений. Для проверки полученных теоретических знаний приводятся тестовые задания и вопросы для самоконтроля. Также даны практические задачи и обсуждаются пути и «алгоритм» решения задач, используемых в лабораторной практике и в исследовательских экспериментальных работах.

Предназначено студентам, магистрантам высших учебных заведений, для выполнения самостоятельных работ студентов и для молодых специалистов в области биологии и биотехнологии.

УДК 663.1(075.8)

ББК 30.16

© Турашева С.К., Оразова С.Б., Валиханова Г.Ж., 2014

© КазНУ им. аль-Фараби, 2014

ISBN 978-601-04-0692-6

Введение

Биотехнология (гр. Bios – жизнь, techne – изобретение, logos – слово, наука) – новая отрасль науки и производства, основанная на использовании биологических процессов и объектов для производства экономически важных веществ и создания высокопродуктивных сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов. Биотехнология растений является одним из направлений биотехнологии. Основными объектами в биотехнологии растений являются клетки, ткани, органы растений.

Возникновение биотехнологии тесно связано с научно-техническим развитием. Биотехнология растений возникла благодаря интеграции многих наук, поэтому ее развитие связано с достижением в области молекулярной биологии, биофизики, биохимии, клеточной и молекулярной биотехнологии и основывается на современных инженерных технологиях.

Для решения теоретических вопросов в биотехнологии растений применяются культивируемые *in vitro* клетки растений, а также клеточные линии растений и субклеточные макромолекулярные структуры. Однако для крупномасштабного производства биотехнологических продуктов необходимо знать не только технологию производства, теоретические основы промышленной биотехнологии, но и биологические особенности применяемых объектов, в частности закономерности физиологии развития как отдельных клеток, так и клеточных популяций, биохимические особенности биосинтеза, механизмы регуляции активности ферментов и т.д.

С применением в промышленности биотехнологических, биохимических, микробиологических методов стало возможным получение важных для человека продуктов (например, биологически активных веществ, витаминов, гликозидов, гормонов и т.д.). Более половины всех фармацевтических продуктов, реализуемых на мировом рынке, приходится на долю продуктов, производимых с помощью биотехнологических методов. К коммерческим продуктам относятся лекарственные препараты, фитопрепараты, растительные рекомбинантные вакцины, витамины, биосенсоры, препараты для профилактики заболеваний, диагностики. В настоящее время производство лекарственных препаратов, полученных генно-инженерными методами, составляют ведущий сектор фарминдустрии. Кроме того, посредством клеточной и генной инженерии создаются новые вещества, а также новые сорта растений, внедряемые в селекционные программы.

С помощью биотехнологических продуктов будут решаться стратегически важные вопросы в социально-экономической области, экологические и производственно-технологические проблемы.

Целью данного учебного пособия является изучение и освоение теоретических и практических основ биотехнологии растений. Особенностью этого учебного пособия является то, что в первой части учебного пособия помимо краткого содержания теоретических основ биотехнологии растений, также приведены тестовые задания и контрольные вопросы для самоконтроля знаний, практические задачи и задания, которые необходимы при проведении лабораторных экспериментов. Во второй части учебного пособия приведены правильные ответы (ключи к тестовым заданиям) и алгоритм решения практических задач. Данное учебное пособие будет весьма полезным для самостоятельной работы студентов, контроля полученных теоретических и практических знаний и навыков.

РАЗДЕЛ I

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ РАСТЕНИЙ.

Тестовые и практические задания,
предназначенные для контроля
самостоятельной работы студентов

Глава 1

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

Биотехнология является интегральной наукой, бурно развивающаяся вместе с биологическими, химическими и техническими науками. Ее теоретическую основу представляют биологические науки (цитология, физиология, генетика, биохимия и др.), а практической составляющей являются технологические производства.

Голландский ученый Е. Хаувинк историю развития и становления биотехнологии разделил на 5 периодов:

1. *Допастеровский период (1865 г.)* использования спиртового и молочнокислого брожения для получения пива, вина, сыра, хлебопекарных и пивных дрожжей, получение ферментированных продуктов и уксусной кислоты;

2. *Пастеровский период (1866-1940 гг.)* производства этилового, бутилового спиртов, ацетона, глицерина, органических кислот, вакцин, получение кормовых дрожжей из углеводов, аэробное очищение сточных вод;

3. *Период антибиотиков (1940-1960 гг.)* – синтез путем глубокой ферментации, культивирование растительных клеток, получение вирусных вакцин, микробиологическая трансформация стероидов;

4. *Период управляемого биосинтеза (1961-1975 гг.)* – производство аминокислот с помощью микробных мутантов, получение очищенных ферментных препаратов, использование иммобилизованных ферментов и клеток, анаэробной очистки сточных вод и получения биогаза, бактериальных полисахаридов.

5. Эра новой биотехнологии (с 1973 г.) с использованием клеточной и генетической инженерии в целях получения агентов биосинтеза, получение гибридом, продуцирующих моноклональные антитела, протопластных и меристематических гибридов, трансплантированных эмбрионов.

Впервые термин «Биотехнология» был введен в 1917 году венгерским ученым Карлом Эреки.

Метод культуры клеток и тканей растений был разработан в первой половине прошлого столетия. Однако определенные идеи и предположения, экспериментальные наработки в этом направлении были сделаны более 100 лет назад. В истории развития метода культивирования клеток и тканей растений можно выделить несколько этапов.

I этап (1878-1902 гг.) связан с именами таких немецких исследователей, как Габерландт, Фехтинг, Рехингер. В конце XIX – начале XX века они пытались культивировать изолированные из растений кусочки тканей, группы клеток, волоски. Не достигнув при этом значительных экспериментальных успехов, эти исследователи высказали ряд идей и гипотез, подтвержденных позже.

Фехтинг (1878) выявил наличие полярности у изолированных фрагментов стеблей, которые во влажных условиях формировали в апикальной части почки, а в базальной – каллус или корни. Он пришел к выводу, что полярность свойственна не только органам растения, но и отдельной клетке. Рехингер (1893) определил минимальные размеры эксплантов, способные продуцировать почки и даже регенерировать целые растения. Он изолировал фрагменты из почек тополя и ясеня, из корней свеклы и турнепса и культивировал их на поверхности сырого песка, наблюдая, как с уменьшением толщины экспланта до 1,5 мм, что соответствовало не более чем 21 клеточному слою, способность к регенерации переставала проявляться. Однако поскольку Рехингер выращивал кусочки тканей не на питательной среде, а в песке с применением водопроводной воды, т.е. без соблюдения условий асептики, то работы этого ученого не могут считаться началом применения метода культуры тканей на растительных объектах.

Принципы культивирования клеток (использование питательных сред и соблюдение асептических условий) впервые четко сформулировал Габерландт в 1902 г. Он пытался выращивать на питательных средах (раствор Кнопа с добавлением сахарозы, аспарагина и пептона) отдельные растительные клетки и выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой клетки растений. Однако ему не удалось экспериментально доказать свою гениальную догадку, так как он выбрал неудачные объекты: узкодифференцированные специализированные клетки, утратившие способность к активному делению и эмбриональному росту (тычиночные волоски традесканции, железистые волоски крапивы, замыкающие клетки устьиц лилейных).

II этап (1902-1922 гг.) ознаменовался созданием первых питательных сред для культивирования тканей животных. Гаррисон и Каррель разработали методику выращивания животных клеток на питательных средах природного происхождения (плазма крови, зародышевая жидкость, лимфа). Первые попытки выращивания растительных объектов на естественных питательных средах растительного происхождения – работы Чеха и Прата (1927) окончились неудачей. Учитывая эти трудности некоторые исследователи считали, что выращивание растительных клеток является безнадежным, и тем самым поставили под сомнение представление об их тотипотентности.

III этап (1922-1932 гг.). Новый подход к методам культивирования изолированных клеток и тканей растений был заложен в 1922 г. одновременно в Германии Котте и в США Робинсоном. Они постулировали необходимость использования для культивирования меристематических клеток, а также применения более сложных по составу культуральных сред.

IV этап (1932-1940 гг.). Начало успешному развитию метода культуры тканей и клеток высших растений положили работы двух исследователей – француза Готре и американца Уайта. Их считают родоначальниками современных методов культивирования изолированных тканей и органов растений.

Уайт занимался выращиванием изолированных корней томатов и показал, что корневая меристема может расти неограниченно долго во времени, если ее периодически пересаживать на свежую питательную среду. Культура некоторых его клонов поддерживалась около 30 лет. Он усовершенствовал состав питательной среды для культивирования растительных клеток. Среда Уайта, содержащая помимо минеральных элементов еще и витамины, широко используется в настоящее время для выращивания тканей многих растений. Также Уайт показал способность к неограниченному росту при субкультивировании растительных опухолей.

Основная заслуга Роже Готре заключается в том, что он ввел в культуру новые объекты – каллусные ткани древесных растений камбиального происхождения и каллусные ткани запасающей паренхимы. Он предложил ввести в состав питательной среды фитогормон ауксин. Наличие ауксинов в среде способствовало длительной пролиферации каллусных тканей. В работах Готре каллусная ткань, индуцированная из камбия, могла продолжать развитие в течение 18 месяцев. Р. Готре предложил заменить жидкую питательную среду на твердую – агаризованную.

Успех работ Уайта и Готре во многом был определен оптимальным сочетанием объектов культивирования и состава питательных сред. Они внесли неоценимый вклад в становление современного метода культуры тканей растений, и с этого времени начинается интенсивное развитие данного направления экспериментальной биологии растений.

V этап (1940-1960 гг.). В этот период ученики и последователи Уайта и Готре закрепляют успех. Увеличивается число видов растений, ткани которых культивируются *in vitro*. Разработаны составы ряда питательных сред, изучено значение макро- и микроэлементов, витаминов и стимуляторов роста растительного происхождения (эндосперм кокосового ореха, каштана, кукурузы, гидролизат дрожжей и т.п.). Это позволило получать длительные пересадочные культуры из разных органов и тканей растений. Их список, приведенный в классической монографии по культуре тканей, написанной Роже Готре (1959), включал уже 142 вида высших растений.

В 1955 г. Скуг и Миллер открыли новый класс стимуляторов роста растений – цитокинины – и показали их значение для пролиферации клеток *in vitro*. В зависимости от концентрации и соотношения ауксинов и цитокининов в питательной среде можно было стимулировать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез.

VI этап (1960-1975 гг.). Одним из наиболее важных достижений в этот период явилась разработка профессором Коккингем (1960) метода получения изолированных протопластов из корней и плодов томата ферментативным путем и культивирования их в контролируемых условиях. Позже, в 1970 г., Пауэром и сотр. было осуществлено искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию соматических гибридов. Это открытие явилось основой для развития таких важнейших направлений биотехнологии растений, как клеточная и генная инженерия.

В этот период был разработан метод микрклонального размножения, позволяющий быстро с высоким коэффициентом клононально размножать растения в асептических условиях (Морель, 1959; Бутенко Р.Г., 1960). Было показано, что растения, полученные из меристем, в ряде случаев освобождались от вирусных инфекций.

Большое фундаментальное и прикладное значение имело открытие индийскими исследователями Гуха, Магешвари (1964) индукции андрогенеза при культивировании изолированных пыльников и гиногенеза при культивировании клеток зародышевого мешка.

Одним из направлений совершенствования метода культуры тканей был поиск возможностей выращивания одиночных клеток, результатом которого явилась разработка метода получения и выращивания клеточных суспензий. Именно благодаря этому методу в 60-е гг. была экспериментально доказана идея Габерландта о тотипотентности растительной клетки. Так, в 1965 г. Вэзил и Хильдебрандт впервые продемонстрировали возможность получения из изолированной клетки табака нормально развивающегося и достигшего цветения растения. В 1971 г. впервые были

получены и изучены растения-регенеранты табака, представляющие соматклональные варианты исходной формы (П. Загорска и др.).

VII этап (1975 г. – по настоящее время). Этот период характеризуется быстрым развитием техники *in vitro*, изучением биологии культивируемых растительных объектов и созданием биотехнологий на их основе. Разработка методов электрослияния изолированных протопластов и разнообразных методов селекции гибридных клеток значительно облегчила гибридизацию соматических клеток растений (Ю. Глеба, О. Сидоров, 1980 г.). Методы мутагенеза и клеточной селекции, получение соматклональных вариантов и экспериментальных гаплоидов используются для создания новых форм и сортов сельскохозяйственных растений. С использованием изолированных протопластов и генетических векторов на основе Ti-плазмид, электропорации и баллистического введения генов в клетки и ткани реципиентов стало возможным получение трансгенных растений.

Характерной чертой настоящего времени является особая организация исследований для эффективного получения результатов. Как правило, формируются научные коллективы, включающие специалистов по разным проблемам. Так, в развитие биотехнологии растений в Казахстане и в создании отечественной школы биотехнологов большой вклад внесли такие ученые, как М.А. Айтхожин, И.Р. Рахимбаев, Г.Ж. Валиханова и др.

В целом, *биотехнология*, являясь отраслью науки и производства, основанная на использовании биологических процессов и объектов для производства экономически важных веществ и создания высокопродуктивных сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов, имеет следующие направления: *сельскохозяйственная биотехнология, медицинская биотехнология, геобиотехнология, биоэлектроника, биоэнергетика, экологическая биотехнология, бионанотехнология, космическая биотехнология* (рис. 1). Соответственно, основными объектами являются клетки и ткани растений, животных и микроорганизмы.

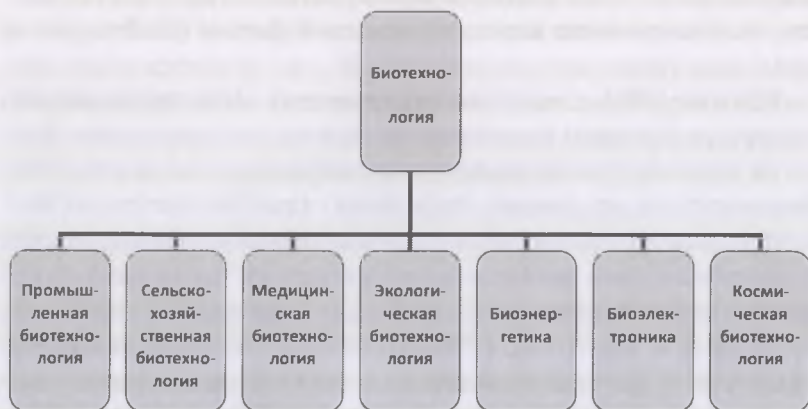


Рисунок 1. Основные направления и отрасли биотехнологии

Целями различных направлений биотехнологии являются:

– разработка и производство биофармацевтических препаратов (терапевтических белков, ферментов, антител, антибиотиков, вакцин, биологически активных веществ растительного и животного происхождения);

– получение ГМО-продуктов, создание генетически модифицированных растений и их внедрение в селекционный процесс;

– создание новых сортов сельскохозяйственных растений путем интеграции биотехнологических методов и традиционных (классических) методов селекции;

– производство экологически чистого биотоплива и получение альтернативных источников энергии с помощью биотехнологических методов (биоэнергетика);

– создание биоматериалов, используемых для различных целей в промышленности и народном хозяйстве;

– генотипирование и генетическая коррекция генома высших организмов;

– биологическая очистка окружающей среды (биоремедиация);

В соответствии с поставленными целями перед биотехнологами ставятся следующие задачи:

– создание и внедрение биологических препаратов для защиты от вредных насекомых, вирусных инфекций растений и животных, а также получение и введение в практику новых сортов растений, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам;

– получение и использование в медицине биологически активных веществ, лекарственных препаратов, проведение диагностики для лечения заболеваний;

– производство корма, пищевых добавок, обогащенных кормовым белком, незаменимыми аминокислотами лизином и метионином, для увеличения продуктивности животных и птиц;

– внедрение и использование новых технологий для переработки сельскохозяйственных, промышленных отходов, получение биоудобрений, биогаза, биоэтанола, биогенных углеводов (т.е. получение возобновляемых источников топлива и энергии);

Реализовать поставленные цели и задачи возможно с применением таких методов, как геновая и хромосомная инженерия, клеточная инженерия, инженерная энзимология (т.н. биоинженерные методы), клеточная селекция, методы криоконсервации.

Резюмируя вышесказанное, можно отметить, что в течение длительного времени эмпирический подход являлся практически единственным методом при работе с изолированными клетками и тканями растений и животных, микроорганизмов. Его невысокая эффективность привела исследователей к пониманию необходимости изучения биологии культивируемых объектов на всех уровнях – молекулярном, субклеточном, клеточном и тканевом, без чего невозможна разработка практически важных технологий.

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие основные этапы различают в истории развития биотехнологии?
2. Какие взаимосвязи существуют между биотехнологией и другими фундаментальными и прикладными науками?
3. Какие существуют основные направления и отрасли биотехнологии и в чем заключаются их задачи?
4. Какие методы используются в биотехнологии?

1.1 Тестовые задания к главе «ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ»

1. Кем впервые был введен термин «Биотехнология»:

- А) Ч. Дарвин;
- В) Э. Дженнер;
- С) К. Мильшгейн;
- Д) П. Эрлих;
- Е) К. Эреки.

2. С какими науками связана биотехнология?

- А) Генетика;
- В) Микробиология;
- С) Инженерия;
- Д) Физиология;
- Е) Все ответы правильные.

3. Какой из этапов в истории развития биотехнологии указан неправильно:

- А) период управляемого биосинтеза;
- В) Додарвиновский период;
- С) период антибиотиков;
- Д) эра новой биотехнологии;
- Е) Пастеровский период.

4. В чем заключается особенность нового периода биотехнологии?

- А) в использовании генетически модифицированных (рекомбинантных) микроорганизмов;
- В) в использовании специализированной аппаратуры;
- С) в крупных промышленных масштабах;
- Д) в преимущественном производстве пищевых продуктов;
- Е) в производстве органических кислот.

5. Основные объекты, используемые в биотехнологии:

- А) культура клеток растений;
- В) культура клеток животных;
- С) культура микроорганизмов;
- Д) вирусы;
- Е) все ответы правильные.

6. Какому термину соответствует данное определение: «Отрасль науки и производства, основанная на использовании биологических

процессов и объектов для производства экономически важных веществ и создания высокопродуктивных сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов»

- А) Физиология;
- В) Биотехнология;
- С) Инженерия;
- Д) Сельское хозяйство;
- Е) Биология.

7. Значение термина *In vivo*:

А) в переводе с латинского языка означает «в стекле», в искусственных условиях;

В) в переводе с латинского языка означает «в природных, естественных условиях, в неизменном виде, в организме хозяина»;

С) в переводе с греческого языка означает «новообразованный»;

Д) в переводе с латинского языка означает «применение, использование»;

Е) в переводе с латинского языка означает «слияние, соединение».

8. Каким критериям (требованиям) должны соответствовать биообъекты, применяемые в биотехнологии?

А) биосинтетическая способность клеток живых организмов должна быть достаточно высокой;

В) технологии культивирования клеток должны быть недорогими;

С) клетки должны обладать коротким клеточным циклом;

Д) клеточная биомасса должна быстро увеличиваться в течении небольшого промежутка времени культивирования;

Е) все ответы правильные.

9. К субклеточным структурам, используемым в биотехнологии в качестве одного из биообъектов относятся:

А) плазмиды;

В) ядерная ДНК;

С) макромолекулы;

Д) ферменты;

Е) все ответы правильные.

10. Ученый, объяснивший значение термина «Биотехнология»:

А) Х.Игг;

В) Ф.Сэнгер;

С) К.Эреки;

- D) Ф.Скуг;
- E) Т.Шван.

11. Значение термина *In vitro*:

- A) в переводе с латинского языка означает «в стекле», в пробирке, в искусственных условиях;
- B) в переводе с латинского языка означает «в природных, естественных условиях, в неизменном виде, в составе организма, в неизолированном состоянии»;
- C) в переводе с греческого языка означает «новообразованный»;
- D) в переводе с латинского языка означает «применение, использование»;
- E) в переводе с латинского языка означает «слияние, соединение».

12. К основному объекту, используемому в клеточной биотехнологии не относится:

- A) культура клеток растений;
- B) наночастицы;
- C) культура микроорганизмов;
- D) вирусы;
- E) культура клеток животных.

13. Задачи сельскохозяйственной биотехнологии:

- A) Создание и внедрение биологических препаратов для защиты от вредных насекомых, вирусных инфекций растений и животных, а также получение и введение в практику новых сортов растений, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам;
- B) Получение и использование в медицине биологически активных веществ, лекарственных препаратов, проведение диагностики для лечения заболеваний;
- C) Внедрение и использование новых технологий для переработки сельскохозяйственных, промышленных отходов, получение биоудобрений, биогаза, биоэтанола, биогенных углеводов (т.е. получение возобновляемых источников топлива и энергии);
- D) Производство корма, пищевых добавок, обогащенных кормовым белком, незаменимыми аминокислотами лизином и метионином, для увеличения продуктивности живых организмов;
- E) Все ответы правильные.

14. Какому периоду в истории развития биотехнологии соответствует данное определение: «Период использования генетической и клеточной инженерии с целью получения агентов биосинтеза. Период получения моноклональных антител, культуры про-

топластов, культуры меристем, период эмбриональной трансплантации»

- A) Допастеровский период;
- B) Пастеровский период;
- C) период управляемого биосинтеза;
- D) эра новой биотехнологии;
- E) период антибиотиков.

15. Отрасли биотехнологии:

- A) промышленная биотехнология;
- B) сельскохозяйственная биотехнология;
- C) медицинская биотехнология;
- D) экологическая биотехнология;
- E) все ответы правильные.

16. С какими фундаментальными и прикладными науками взаимосвязана биотехнология?

- A) Молекулярная биология;
- B) Микробиология и вирусология;
- C) Физика;
- D) Биохимия;
- E) Все ответы правильные.

17. Какой из периодов в истории развития биотехнологии указан неправильно:

- A) Пастеровский период;
- B) Допастеровский период;
- C) период производства вакцин;
- D) эра новой биотехнологии;
- E) период управляемого биосинтеза.

18. К биотехнологическим методам относится:

- A) генная инженерия;
- B) клеточная инженерия;
- C) инженерная энзимология;
- D) хромосомная инженерия;
- E) все ответы правильные.

19. К биоинженерным методам относится:

- A) генная инженерия;
- B) биометрия;
- C) криоконсервация;

- D) гаплоидная технология;
- E) эмбриокультура.

20. К биотехнологическим методам не относится:

- A) генная инженерия;
- B) клеточная инженерия;
- C) инженерная энзимология;
- D) спектрофотометрия;
- E) хромосомная инженерия.

21. Развитие биотехнологии растений связано с такими фундаментальными и прикладными науками, как:

- A) Генетика;
- B) Metallургия;
- C) География;
- D) Микробиология;
- E) Геология;
- F) Зоология;
- G) Физиология растений;
- H) Валеология.

22. К клеточным и субклеточным объектам биотехнологии растений относятся (укажите неверный (-ые) ответ (ы)):

- A) Культура клеток растений;
- B) Наночастицы;
- C) Ферменты и нуклеиновые кислоты;
- D) Плазмиды агробактерий;
- E) Культура тканей и органов растений;
- F) Культура микроорганизмов;
- G) Вирусы;
- H) Культура клеток животных.

23. Периоды развития биотехнологии (укажите неверный (-ые) ответ (ы)):

- A) Период управляемого синтеза;
- B) Додарвиновская эра;
- C) Период производства антибиотиков;
- D) Период современной биотехнологии;
- E) Пастеровский период;
- F) Период синтеза фитогормонов;
- G) Дарвиновский период;
- H) Допастеровская эра.

24. К субклеточным структурам, применяемым в биотехнологии растений в качестве биообъектов, относятся:

- А) Плазмиды;
- В) Ядерная ДНК;
- С) Ферменты;
- Д) Микромолекулы;
- Е) Бактерии;
- Ф) Клетки животных;
- Г) Дрожжи;
- Н) Клетки грибов.

25. Биотехнология растений взаимосвязана со следующими фундаментальными науками (укажите неверный ответ):

- А) Ботаника;
- В) Цитология и гистология;
- С) География;
- Д) Биофизика;
- Е) Математика;
- Ф) Химия;
- Г) Астрономия;
- Н) Геодезия.

1.2 Задания к главе «История развития биотехнологии»:

Вариант 1 (Т1)

Какое положение или аннотация, приведенные справа соответствуют терминам, определениям, приведенным слева? Соедините правильные ответы.

1.	1) Физиология растений	А) Наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных, микроорганизмов и вирусов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения
	2) Биотехнология	В) Наука о жизнедеятельности растительных организмов

	3) Белковая инженерия (инженерная энзимология)	С) Наука, основанная на достижениях в области генной инженерии, структурной биологии, компьютерной технологии
2.	4) In vitro	А) В переводе с латинского языка – в природных условиях, в живом организме, не изолированно в составе организма
	5) In vivo	В) В переводе с латинского языка – «в стекле», в пробирке, в искусственных условиях
	6) De novo	С) в переводе с гр. – отрицание какого-либо явления, чего-либо; гр. – заражение – в полностью обеззараженных, стерильных условиях
	7) Асептические условия	Д) В переводе с греческого языка – образованный вновь, заново
3.	8) Биотрансформация	А) Образование и получение каких-либо соединений (например, метана) из органических отходов
	9) Биоконверсия	В) Разрушение загрязняющих веществ, попавших в окружающую среду и восстановление экосистемы с помощью живых микроорганизмов, высших и низших растений
	10) Биоремедиация	С) Синтез биологически активных соединений из дешевых веществ-предшественников с участием ферментов клеток, культивируемых на питательной среде (превращение биологическим путем простого вещества в более сложное ценное вещество)
4.	11) Задачи сельскохозяйственной биотехнологии	А) Внедрение и использование новых технологий для переработки сельскохозяйственных, промышленных отходов, получение биоудобрений, биогаза, биоэтанола, биогенных углеводородов (т.е. получение возобновляемых источников топлива и энергии)
	12) Задачи медицинской биотехнологии:	В) Создание и внедрение биологических препаратов для защиты от вредных

		насекомых, вирусных инфекций растений и животных, а также получение и введение в практику новых сортов растений, устойчивых к биотическим и абиотическим факторам
	13) Задачи экобиотехнологии и биоэнергетики:	С) Производство корма, пищевых добавок, обогащенных кормовым белком, незаменимыми аминокислотами лизином и метионином, для увеличения продуктивности животных и птиц
		Д) Получение и использование в медицине биологически активных веществ, лекарственных препаратов, проведение диагностики для лечения заболеваний
5.	14) Период новой биотехнологии	А) Использование спиртового и молочнокислого брожения при получении пива, вина, хлебопекарных и пивных дрожжей, сыра. Получение ферментированных продуктов и уксуса
	15) Допастеровский период	В) Период использования генетической и клеточной инженерии с целью получения агентов биосинтеза. Период получения моноклональных антител, культуры протопластов, культуры меристем, период эмбриональной трансплантации
	16) Период антибиотиков	С) Производство аминокислот с помощью микробных мутантов. Получение очищенных ферментных препаратов. Промышленное использование иммобилизованных ферментов и клеток. Анаэробная очистка канализационных вод и получение биогаза. Производство бактериальных полисахаридов
	17) Пастеровский период	Д) Производство пенициллина и других антибиотиков путем глубоинной ферментации. Культивирование растительных клеток и получение вирусных вакцин. Микробиологическая трансформация стероидов

	18) Период управляемого биосинтеза	Е) Производство этанола, бутанола, ацетона, глицерина, органических кислот, вакцин. Аэробная очистка канализационных вод. Производство кормовых дрожжей из углеводов
--	---	--

Вариант 2 (Г1)

Какое положение или аннотация, приведенные справа соответствуют терминам, определениям, приведенным слева? Соедините правильные ответы.

1.	1) 1865 г.	А) Пастеровский период – производство этанола, бутанола, ацетона, глицерина, органических кислот, вакцин. Аэробная очистка канализационных вод. Производство кормовых дрожжей из углеводов
	2) 1866-1940 гг.	В) Допастеровский период – использование спиртового и молочнокислого брожения при получении пива, вина, хлебопекарных и пивных дрожжей, сыра. Получение ферментированных продуктов и уксуса
	3) 1961-1975 гг.	С) Период антибиотиков – производство пенициллина и других антибиотиков путем глубокой ферментации. Культивирование растительных клеток и получение вирусных вакцин. Микробиологическая трансформация стероидов
	4) 1940-1960 гг.	D) Период управляемого биосинтеза – производство аминокислот с помощью микробных мутантов. Получение очищенных ферментных препаратов. Промышленное использование иммобилизованных ферментов и клеток. Анаэробная очистка канализационных вод и получение биогаза. Производство бактериальных полисахаридов

	5) с 1975 г.	Е) Период новой биотехнологии – период использования генетической и клеточной инженерии с целью получения агентов биосинтеза. Период получения моноклональных антител, культуры протопластов, культуры меристем, период эмбриональной трансплантации
2.	6) Биообъекты, применяемые в биотехнологии: прокариоты	А) Вирусы, плазмиды, митохондриальная и хлоропластная ДНК, ядерная ДНК; макромолекулы (нуклеиновые кислоты, ферменты, белки, лектины)
	7) Биообъекты, применяемые в биотехнологии: эукариоты	В) Бактерии, микоплазмы, хламидии, риккетсии, сине-зеленые водоросли
	8) Биообъекты, применяемые в биотехнологии: субклеточные структуры	С) Животные, растения, простейшие, грибы, водоросли
3.	9) М. Шлейден Т. Шван	А) Термин «Биотехнология» был впервые предложен...
	10) К. Эреки	В) Клеточная теория была сформулирована....
	11) Г. Мендель	С) Материалистическую теорию эволюции живой природы сформулировал ...
	12) Ч. Дарвин	Д) Автор(ы) законов генетического наследования
4.	13) Задачи сельскохозяйственной биотехнологии	А) Очистка загрязненных сточных вод, очистка почвы от пестицидов, утилизация агропромышленных отходов. Использование биodeградации и биоконверсии (переработка органических отходов путем сбраживания с целью получения экономически ценных продуктов народного хозяйства) в результате которых: а) утилизируются отходы; б) получается биомасса с высоким содержанием белка; в) производится биогаз (метан).

	<p>14) Задачи медицинской биотехнологии</p>	<p>В) Получение трансгенных растений; Производство биопестицидов, бактериальных биоудобрений; рекультивация земель с помощью микроорганизмов; Производство ценных пищевых, технических и лекарственных препаратов и продуктов из растительной биомассы, увеличение производительности ценных пород животных эмбриогенетическим методом</p>
	<p>15) Задачи экологической биотехнологии</p>	<p>С) Производство биопрепаратов, моноклональных антител, диагностикумов, вакцин, антибиотиков и т.д. Развитие иммунобиотехнологии т.е. используя методы иммуноанализа диагностировать и лечить различные заболевания</p>
5.	<p>16) Продолжительность клеточного цикла растений</p>	<p>А) 1,5-2 ч.</p>
	<p>17) Продолжительность клеточного цикла бактерий (время деления)</p>	<p>В) 12-24 ч.</p>
	<p>18) Продолжительность клеточного цикла дрожжей</p>	<p>С) 20-60 мин.</p>

Глава 2

ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ IN VITRO

Культура клеток требует стерильности самих культивируемых эксплантов, питательных сред, посуды, инструментов и лабораторного помещения. Все манипуляции по изолированию клеток, тканей, органов (эксплантов) из интактного растения проводят в ламинар-боксе. При работе в ламинар-боксе необходимо соблюдать следующие правила:

- перед работой продезинфицировать рабочую поверхность ламинара 96% раствором этилового спирта. Затем разместить на столе необходимые для работы принадлежности, культуральные сосуды со средой и провести стерилизацию рабочего объема ламинар-бокса ультрафиолетом в течение 20-30 мин с помощью ртутно-кварцевой лампы. Приступить к работе сразу после стерилизации нельзя, следует дать 15-20 мин для удаления окисла азота, образующегося под влиянием ультрафиолета;

- непосредственно перед работой руки, а также рабочую поверхность стола протереть 70% раствором этилового спирта;

- инструменты обжечь над пламенем спиртовки (или простерилизовать в специально предназначенном для этого стерилизаторе для инструментов) и дать им остыть перед использованием.

Процесс изолирования растительных эксплантов, получение первичного каллуса и дальнейшее его культивирование требуют стерильности. Предварительно тщательно вымытый растительный материал подвергается стерилизации различными ве-

ществами, содержащими активный хлор (гипохлориты натрия и кальция, хлорамин, хлорная известь), ртуть (сулема, диоксид), а также диоксидом водорода, этанолом. Реже используют для этих целей бром, серную кислоту, фенол и в особых случаях антибиотиков. Вид стерилизующего средства, его концентрация и длительность воздействия зависят от растительного объекта, подвергаемого стерилизации. Стерилизующие вещества должны отвечать следующим требованиям:

- эффективно обеззараживать грибные и бактериальные споры на внешней поверхности растительных объектов без повреждения внутренних тканей;

- легко удаляться из ткани промыванием стерильной дистиллированной водой или подвергаться разложению.

Из простерилизованных различными способами и тщательно промытых в стерильной дистиллированной воде объектов изолируют нужные ткани и помещают их на предварительно проавтоклавированную питательную среду (твердую агаризованную или жидкую). Возможно культивирование любых тканей и органов растений. Успех в культивировании клеток, тканей и органов, прежде всего, определяется составом питательной среды.

Питательные среды для культивирования содержат минеральные соли, углеводы, витамины, регуляторы роста, аминокислоты. Клетки в культуре нуждаются в углеводах, потому что в этих условиях они питаются гетеротрофно. **Источник углерода** вводится в состав среды в виде сахарозы или глюкозы, обычно в концентрации 20-40 г/л. Другие углеводы, хотя и используются для некоторых видов растений в культуре, в целом являются менее пригодными.

Основой всех питательных сред для выращивания изолированных тканей растений является смесь минеральных солей, представленных как **макро-**, так и **микроэлементами**. Азот входит в среды в виде нитратной или аммонийной соли, фосфор – в виде фосфата, сера – в виде сульфата, железо вводится в виде неорганических солей и солей органических кислот и в форме хелата. Последний обеспечивает доступность железа при pH до

8,0 в течение всего периода роста культуры. В отсутствие хелатирующего агента недостаток железа может возникнуть очень быстро. Все среды содержат также ионы K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} и ряд микроэлементов: B^- , Mn^{2+} , I^- , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mo^+ , Co^{2+} . Обычно готовят маточный раствор (сток-раствор) макроэлементов согласно прописи. Для этого взвешивают 10 кратную навеску каждой соли, растворяют при слабом нагревании в небольшом объеме дистиллированной воды, охлаждают до комнатной температуры и доводят дистиллированной водой до 200 мл. Раствор хлористого кальция ($CaCl_2$) готовят и хранят отдельно. На 1 л среды берут 20 мл маточного раствора. Для приготовления маточного раствора микроэлементов взвешивают 100 кратную навеску каждой соли, растворяют при слабом нагревании в небольшом объеме дистиллированной воды, охлаждают до комнатной температуры и доводят дистиллированной водой до 200 мл. На 1 л среды берут 2 мл маточного раствора. На сосудах с маточными растворами обязательно указывают название среды, концентрацию раствора, дату приготовления. Все растворы хранят в течение месяца при температуре 4-7°C.

В состав большинства сред входят витамины. Особенно важны витамины группы В: тиамин (B_1), рибофлавин (B_2), пиридоксин (B_6). Многие культуры нуждаются также в никотиновой, фолиевой, пантотеновой кислотах, мезоинозите. Для приготовления маточных растворов витаминов ампулу (аптечную), содержащую 1 мл (1 или 5%) раствора витамина доводят до 100 мл дистиллированной водой. 1 мл раствора будет содержать соответственно 0,1 или 0,5 мг витамина.

Необходимым компонентом любой питательной среды являются **фитогормоны** – соединения, которые участвуют в регуляции физиологических процессов у растений. Для роста и дифференциации растительных клеток необходимы ауксины и цитокинины. Только культура тканей опухолей и культура «привыкших» тканей способны расти на средах без регуляторов роста. В качестве ауксинов для получения каллуса и его поддержания используются: β -индолилуксусная кислота (ИУК), α -нафтилук-

сусная кислота (НУК) и 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота (2,4-Д). Кинетин (6-фурфуриламинопурин) вводится в среду как обязательный компонент для индукции деления клеток. Некоторые другие адениновые производные могут быть более активны, например природный цитокинин – зеатин. Другой цитокинин – это широко применяемый 6-бензиламинопурин (БАП), который активнее кинетина на много порядков. Концентрированные растворы ауксинов готовят следующим образом: 100 мг вещества (ИУК, 2,4-Д, НУК, ИМК, пиклорам) растворяют в 1-2 мл этилового спирта (каждый в отдельности), подогревают, доводят дисводой до 100 мл, при этом 1 мл раствора будет содержать 1 мг вещества. Для приготовления концентрированных растворов цитокининов 100 мг вещества (кинетин, зеатин, БАП) растворяют в небольшом объеме 0,5-1N раствора NaOH (KOH) при слабом нагревании и доводят дисводой до 100 мл, при этом 1 мл раствора будет содержать 1 мг вещества.

Для образования первичного каллуса и реже с целью поддержания его роста в питательную среду вносят комплексные **органические добавки**. Это могут быть различные экстракты (солодовый экстракт, дрожжевой экстракт, картофельный экстракт, вытяжки из разных органов растений, из опухолевых тканей), соки (березовый, томатный, апельсиновый), незрелые эндоспермы кокосового ореха, кукурузы и других злаков, гидролизат казеина, смесь аминокислот. Наибольшим стимулирующим действием обладают незрелые эндоспермы ряда растений, особенно кокосового ореха, так называемое кокосовое молоко. Однако в последнее время таких добавок стараются избегать в связи с трудностями воспроизведения результатов и наличия в них неизвестных факторов роста.

По отношению к потребности и способности к самостоятельному синтезу необходимых метаболитов растительные клетки делятся на ауксотрофные и прототрофные. **Ауксотрофы** – это биохимические мутанты клеток, которые вследствие мутации утратили способность расти на обычной питательной среде и требуют добавления какого-либо вещества, синтез которого у них блоки-

рован мутацией. **Протофоты** способны самостоятельно синтезировать все необходимые для роста и развития вещества.

Важное значение для нормального роста и развития растений *in vitro* как на агаризованных, так и в жидких средах имеет ее рН. В нативных условиях растительная клетка функционирует в узких границах концентрации водородных ионов. От величины рН зависят структура и активность макромолекул, прежде всего белков-ферментов в самой ткани. Кроме того, рН влияет на устойчивость и усвояемость компонентов питательной среды, в первую очередь регуляторов роста и витаминов. При низких рН не желатинизируется агар, поэтому рН питательных растворов обязательно доводится до требуемого уровня путем добавления щелочей и кислот. Оптимальный рост культуры клеток растений обычно происходит на среде с начальными значениями рН от 5 до 6. Среда, содержащие такие неопределенные органические компоненты, как гидролизат казеина и дрожжевой экстракт, обычно хорошо забуферены, поэтому рН среды в процессе роста культуры меняется слабо.

В качестве гелеобразующего вещества для приготовления твердых питательных сред используется полисахарид агар-агар. Содержание агара в питательных средах колеблется в зависимости от требований культивируемой ткани (для твердых питательных сред используется 7-8 г/л агара, для полужидких питательных сред при платировании протопластов используется 1,2% агар). Первые успешные результаты по культивированию тканей растений были получены именно на агаризованных средах в 30-х годах нашего века Р. Готре во Франции и Ф. Уайтом в США.

Наиболее часто используемой средой по праву можно назвать среду Мурасиге и Скуга. Минеральная основа этой среды была подобрана авторами для каллусной ткани табака сорта «Висконсин», возникшей на экспланте – паренхиме стебля в средней его части. Эта среда содержит хорошо сбалансированный состав питательных веществ и отличается от других соотношением аммонийного и нитратного азота. Она подвергается разным модификациям, что реже относится к макро- и микроэлементам мине-

ральной основы и чаще касается набора витаминов, гормональных и других регуляторных факторов. Среда Мурасиге и Скуга дает хорошие результаты при каллусообразовании у большинства растений, хорошо поддерживает неорганизованный каллусный рост и вызывает индукцию морфогенеза у большинства двудольных.

Питательная среда Гамборга и Эвелеге В5 (среда В5) используется при культивировании клеток и тканей бобовых растений и злаков. Среда Уайта, Шенка-Хильдебрандта служит для укоренения побегов и нормального роста стеблевой части после регенерации. Питательная среда Нич рекомендуется для индукции андрогенеза в культуре пыльников, а также морфогенеза у злаков. Полужидкая среда Као и Михайлюка применяется для культивирования единичных (или с малой плотностью посева) изолированных протопластов и клеток.

От состава питательной среды в значительной мере зависит успех выращивания клеток, тканей, органов растений. Поэтому разработке и совершенствованию состава сред уделялось и уделяется много внимания. Поскольку клетки и ткани различных растений растут и функционируют в различных метаболических условиях, то, по-видимому, никогда не будет создана универсальная питательная среда. Скорее совершенствование питательных сред должно идти в направлении разработки их специфического состава по отношению к объекту, группе объектов или соответственно целям и задачам, стоящим перед исследователями. В настоящее время некоторые фирмы выпускают готовые среды Мурасиге-Скуга, Уайта, Хеллера в виде сухих порошков, содержащих все необходимые компоненты – за исключением регуляторов роста, сахарозы и агара.

Оптимизацию состава среды по многим компонентам целесообразно проводить с применением метода математического планирования эксперимента. Основным преимуществом метода математического планирования по сравнению с классическими методами исследований является возможность одновременного изучения большого числа факторов, действующих в системе. Это позволяет наряду с количественным учетом влияния каждого от-

дельного фактора установить наличие в системе межфакторных взаимодействий и оценить эффекты последних. Таким образом, метод математического планирования дает ответ не только на вопрос о том, какие компоненты питательной среды оказывают положительное влияние, но и показывает оптимальные соотношения этих компонентов (факторов).

Успех в культивировании клеток, тканей и органов растений определяется не только составом среды, но и условиями культивирования. К сожалению, их влияние на рост и развитие клеток *in vitro* изучено слабо и требует специальных исследований. Подтверждением сказанному является общепринятое представление о том, что для успешного культивирования клеток необходима постоянная температура в пределах $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Однако этот традиционный подход обусловлен ограниченностью сведений. Температура влияет на все процессы первичного и вторичного метаболизма растений. Очевидно, что подбор температурного оптимума должен осуществляться эмпирически для каждой культуры в зависимости от целей эксперимента. Однако постановка таких опытов – трудоемкая и длительная работа, поэтому обычно исследователи выращивают клетки при температуре около 25°C .

К внешним факторам, влияющим на культивирование клеток, относится также свет. До настоящего времени фотоавтотрофные культуры описаны только для 16 видов растений. Все остальные культуры не способны к фотоавтотрофному росту, поэтому их выращивают в темноте или на рассеянном свете. Действие света на ткани, лишенные хлорофилла, по-видимому, обусловлено фитохромной системой. Подбор условий освещения культуры является одной из задач при разработке клеточных технологий.

Важное значение для успешного выращивания клеток имеет аэрация. Суспензионная культура без аэрации вообще не может существовать. Что касается влияния компонентов газовой фазы (кислород, азот, двуокись углерода) на культуру клеток, то оно почти не изучено.

При разработке состава сред и выращивании клеток следует также учитывать влияние такого физического фактора, как осмо-

тическое давление питательной среды. Высокое осмотическое давление затрудняет усвоение питательных веществ. Особенно важно поддержание осмотических свойств в среде выделения и культивирования протопластов, лишенных клеточных стенок. Концентрация осмотика подбирается индивидуально для каждого вида растения и его физиологического состояния.

Фрагмент ткани или органа, так называемый *эксплант*, помещенный на подходящую по составу стерильную питательную среду, через некоторое время начинает расти и превращается в массу недифференцированных клеток – каллус. Этот процесс называется *каллусообразованием*, или *каллусогенезом*. **Каллус – ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток. Проллиферация – это новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.** Каллус – особый тип ткани, образующийся на целом растении в результате его ранения. Он защищает место травмы, накапливает питательные вещества и способствует регенерации специального защитного слоя или утраченного органа. Подобные клетки возникают и в культуре клеток и тканей. Образование и рост каллуса *in vitro* регулируется ауксинами и цитокининами. Эти гормоны индуцируют образование каллуса и у тех тканей растения, которые его не образуют в ответ на ранение.

Специализированные неделящиеся клетки возобновляют клеточные деления, то есть вновь возвращаются к меристематическому состоянию. Переход специализированных неделящихся клеток к пролиферации называется *дедифференциацией*. Дифференциация – это комплекс процессов, приводящих к различиям между материнскими и дочерними клетками, а также между дочерними клетками. В результате дифференциации клетки, казавшиеся до того сходными, приобретают морфологические различия и начинают выполнять разные физиологические функции. При дедифференциации и образовании каллуса наблюдается обратное: клетки теряют структуры, характерные для их специфических функций, и возвращаются к состоянию делящейся клетки, т.е. они как бы обезличиваются, становятся одинаковыми.

Возникшая каллусная ткань будет отличаться в зависимости от вида растения, его физиологического состояния в момент изолирования экспланта для культивирования (понятие «происхождение каллусной ткани» означает видовое, органное и тканевое происхождение). Образование каллуса происходит в области первичных или вторичных меристем, а также из паренхимы, прилегающей к этим меристемам или к вторичным сосудистым тканям. Этот процесс зависит также от размера экспланта и составляющих клеток. Чем крупнее эксплант, тем более сложен и разнообразен набор клеток. Быстрее образуют каллус молодые ткани, чем зрелые, поэтому чаще для получения каллуса используют ткани и органы проростков.

Каллусные ткани в условиях *in vitro* можно выращивать неопределенно долго, периодически пересаживая их на свежую питательную среду. Каллусные культуры выращивают в чашках Петри, пробирках, колбах, флаконах, маджентах. Каллусную ткань через 3-4 недели роста извлекают, нарезают на кусочки и пассируют (пересаживают) на свежую питательную среду, потому что ухудшаются питание и аэрация внутренних участков ткани, истощается питательная среда. Состав новой среды определяется целями эксперимента. Если нужно только поддерживать рост каллуса, то среда остается прежней.

Прирост сырой массы каллусной ткани определяют через 10 дней от начала пассирования, взвешивая и вычисляя по формуле:

$$W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \quad \text{где } W_t \text{ — конечный вес каллуса,} \\ W_0 \text{ — начальный вес каллуса.}$$

В некоторых опытах, учитывая взаимодействия клеток между собой, применяют специальные методы выращивания каллуса. Так, метод культуры «няньки», или «кормящего слоя», используется для стимуляции роста одного каллуса другим.

Таким образом, основным типом культивируемых клеток всех высших растений являются каллусные клетки. В зависимости от способности каллусной ткани к образованию морфогенных структур их разделяют на морфогенные, неморфогенные и эм-

тическое давление питательной среды. Высокое осмотическое давление затрудняет усвоение питательных веществ. Особенно важно поддержание осмотических свойств в среде выделения и культивирования протопластов, лишенных клеточных стенок. Концентрация осмотика подбирается индивидуально для каждого вида растения и его физиологического состояния.

Фрагмент ткани или органа, так называемый *эксплант*, помещенный на подходящую по составу стерильную питательную среду, через некоторое время начинает расти и превращается в массу недифференцированных клеток – каллус. Этот процесс называется *каллусообразованием*, или *каллусогенезом*. *Каллус* – ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток. *Пролиферация* – это новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих. Каллус – особый тип ткани, образующийся на целом растении в результате его ранения. Он защищает место травмы, накапливает питательные вещества и способствует регенерации специального защитного слоя или утраченного органа. Подобные клетки возникают и в культуре клеток и тканей. Образование и рост каллуса *in vitro* регулируется ауксинами и цитокининами. Эти гормоны индуцируют образование каллуса и у тех тканей растения, которые его не образуют в ответ на ранение.

Специализированные неделящиеся клетки возобновляют клеточные деления, то есть вновь возвращаются к меристематическому состоянию. Переход специализированных неделящихся клеток к пролиферации называется *дедифференциацией*. Дифференциация – это комплекс процессов, приводящих к различиям между материнскими и дочерними клетками, а также между дочерними клетками. В результате дифференциации клетки, казавшиеся до того сходными, приобретают морфологические различия и начинают выполнять разные физиологические функции. При дедифференциации и образовании каллуса наблюдается обратное: клетки теряют структуры, характерные для их специфических функций, и возвращаются к состоянию делящейся клетки, т.е. они как бы обезличиваются, становятся одинаковыми.

Возникшая каллусная ткань будет отличаться в зависимости от вида растения, его физиологического состояния в момент изолирования экспланта для культивирования (понятие «происхождение каллусной ткани» означает видовое, органное и тканевое происхождение). Образование каллуса происходит в области первичных или вторичных меристем, а также из паренхимы, прилегающей к этим меристемам или к вторичным сосудистым тканям. Этот процесс зависит также от размера экспланта и составляющих клеток. Чем крупнее эксплант, тем более сложен и разнообразен набор клеток. Быстрее образуют каллус молодые ткани, чем зрелые, поэтому чаще для получения каллуса используют ткани и органы проростков.

Каллусные ткани в условиях *in vitro* можно выращивать неопределенно долго, периодически пересаживая их на свежую питательную среду. Каллусные культуры выращивают в чашках Петри, пробирках, колбах, флаконах, маджентах. Каллусную ткань через 3-4 недели роста извлекают, нарезают на кусочки и пассируют (пересаживают) на свежую питательную среду, потому что ухудшаются питание и аэрация внутренних участков ткани, истощается питательная среда. Состав новой среды определяется целями эксперимента. Если нужно только поддерживать рост каллуса, то среда остается прежней.

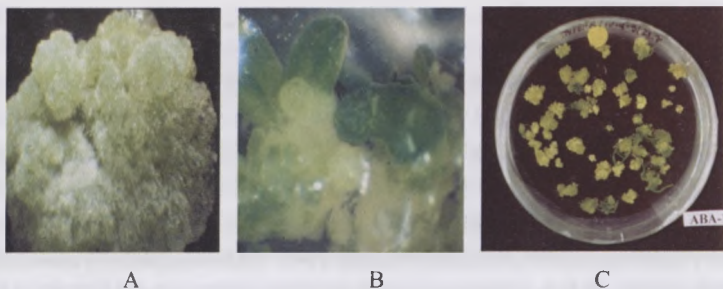
Прирост сырой массы каллусной ткани определяют через 10 дней от начала пассирования, взвешивая и вычисляя по формуле:

$$W = \frac{W_t - W_0}{W_0} \quad \text{где } W_t \text{ — конечный вес каллуса,} \\ W_0 \text{ — начальный вес каллуса.}$$

В некоторых опытах, учитывая взаимодействия клеток между собой, применяют специальные методы выращивания каллуса. Так, метод культуры «няньки», или «кормящего слоя», используется для стимуляции роста одного каллуса другим.

Таким образом, основным типом культивируемых клеток всех высших растений являются каллусные клетки. В зависимости от способности каллусной ткани к образованию морфогенных структур их разделяют на морфогенные, неморфогенные и эм-

бриогенные каллусы (рис. 2). Изменяя состав питательной среды, можно получить целое растение даже из одной клетки, в этом проявляется уникальное свойство растительной клетки – тотипотентность.



А – неморфогенные каллусы, В – морфогенные каллусы, С – эмбриогенные каллусы.
Рисунок 2. Каллусные ткани, различающиеся по способности к морфогенезу

Культуру клеток растений, выращиваемую в жидкой среде, называют *суспензионной культурой*. Для поддержания клеток во взвешенном состоянии при глубинном культивировании их перемешивают разными аппаратами. Аэрация клеток обеспечивается либо путем непрерывного вращения или качания среды, либо путем продувания жидкой среды стерильным воздухом. Состав питательной среды, в принципе, тот же, что и при поверхностном культивировании клеток.

Клетки в суспензии имеют ряд преимуществ по сравнению с клетками, выращиваемыми статическим способом на агаризованной поверхности. Клетки популяции находятся в однородных условиях питания, аэрации и удаления токсических метаболитов клеточного окружения: у них легче проследить влияние на рост и метаболизм различных экзогенных факторов; они удобнее для биохимических и молекулярно-биологических исследований; на них реальнее возможность получения стабильной клеточной популяции. Основным способом получения суспензионных культур является культивирование рыхлого недифференцирован-

ного каллуса в жидкой среде на качалке. При этом каллус легко распадается на отдельные клетки и клеточные агрегаты. Рыхлый оводненный каллус выращивают специально для этих целей на среде с 2,4-Д и с уменьшенным содержанием или даже с исключением цитокининов и Ca^{2+} . Часть каллусной ткани в жидкой среде при ее перемешивании распадается на клетки и небольшие клеточные агрегаты, образуя первичную суспензию. Для избавления от крупных плотных остатков каллуса, от больших клеточных агрегатов ее фильтруют через 1-2 слоя марли, нейлон либо отбирают одиночные клетки и мелкие агрегаты путем осаждения крупных агрегатов при отстаивании суспензии в течение нескольких минут. Несмотря на все усилия, суспензия никогда не бывает однородной, состоящей только из одиночных клеток. В лучшем случае последние составляют 50-60%, остальное приходится на долю групп из 2-10 клеток и многоклеточные агрегаты. С целью получения высокодиспергированной суспензионной культуры чаще всего пытаются контролировать состав питательной среды. Условия, благоприятствующие растяжению клеток и тормозящие их деление, способствуют максимальной диссоциации суспензионных клеток. Оптимальная плотность клеток в суспензии, обеспечивающая хороший рост, составляет 10^5 - 10^6 на 1 мл среды. Клетки подсчитывают в камере Горяева. Плотность суспензии рассчитывают по формуле:

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

где X – число клеток, M – среднее число клеток в камере, n – разведение.

Суспензионные культуры пересевают чаще, чем каллусные, из которых они были получены. **Инокулюм** – это часть суспензионной культуры, используемая для пересадки на свежую среду. Инокулюм отбирают стерильными пипетками, шприцами или просто переливают определенную часть суспензии.

Культивирование клеток в жидкой среде осуществляется несколькими способами. Наиболее простым и распространенным является **накопительное или периодическое культивирование**. Клетки растут в постоянном объеме питательной среды на установках качельного или роллерного типа. Такая система закрыта для всего, кроме газов и летучих продуктов метаболизма. **Цикл выращивания** – это период от помещения инокулюма в свежую среду до следующего субкультивирования. Для накопительных культур чаще всего используются конические широкогорлые колбы разных размеров на платформенных качалках кругового или полукругового типа со скоростью вращения 60-120 оборотов в минуту. Накопительные культуры можно выращивать в лабораторных ферментерах рабочим объемом 0,5-10 л. На культуру клеток в ферментерах (биореакторах) можно в любой момент воздействовать различными факторами (температура, свет, газовый режим, физиологически активные вещества, рН и др.) и отбирать пробы клеток для определения динамики роста и метаболизма популяции в цикле выращивания. Наличие вакуоли и целлюлозно-пектиновой оболочки, придающей клеткам не только прочность, но и хрупкость, обуславливает их подверженность механическому стрессу при перемешивании и аэрации. Опасность механического стресса усиливается на стадии растяжения клеток.

Способ, при котором клетки выращиваются в проточном режиме, называется **непрерывным культивированием**. В основу создания проточных систем легли опыты, в которых было обнаружено, что добавление в суспензию в фазу экспоненциального роста культуры порций свежей питательной среды позволяет долго поддерживать деление клеток. Непрерывное культивирование может осуществляться в закрытой проточной, полупроточной и открытой проточной системах.

В закрытой проточной системе суспензионная культура непрерывно снабжается свежей средой, приток которой сбалансирован оттоком равного количества использованной среды. В такой системе хорошо изучать влияние различных факторов на метаболизм клеток.

При полупроточном режиме выращивания определенная часть суспензии время от времени отбирается, и оставшаяся часть разбавляется свежей средой. Применяется для получения большой биомассы с целью ее биохимического исследования.

Открытая проточная система устроена так, что обеспечивает баланс между притоком свежей питательной среды и удалением равного объема клеточной суспензии. Скорость удаления части клеток из системы должна соответствовать скорости образования новых клеток в результате деления, это создает равновесное состояние между ростом клеток (постоянством скорости клеточного деления) и биосинтезом (постоянством состава и метаболической активности).

В открытой проточной системе исследуются взаимосвязи между процессами роста и метаболизма, те изменения, которые происходят при переходе клеток от одного состояния к другому, а также условия оптимального режима культивирования для получения максимального количества вторичных метаболитов. В основу непрерывного культивирования могут быть положены принципы **хеостата** и **турбидостата**, разработанные при культивировании микроорганизмов. В хеостатном режиме непрерывное культивирование идет под воздействием лимитирующего рост фактора. Хеостатная культура представляет собой перемешиваемую суспензию, в которую с постоянной скоростью подается свежая среда с заданной концентрацией какого-то лимитирующего рост компонента и с такой же скоростью отбирается часть культуры. Общий объем суспензии остается постоянным. Принцип турбидостата предусматривает непрерывное культивирование без внешнего лимитирования, рост клеток популяции поддерживается на определенном уровне регулированием оптической плотности культуры. Для этого подходят суспензии с низкой плотностью клеток и высокой удельной скоростью роста, т. е. популяции в начальные фазы роста. Турбидостат представляет собой хеостат, дополненный фотоэлектрическим элементом, чувствительным к мутности культуры. Рост клеточной популяции

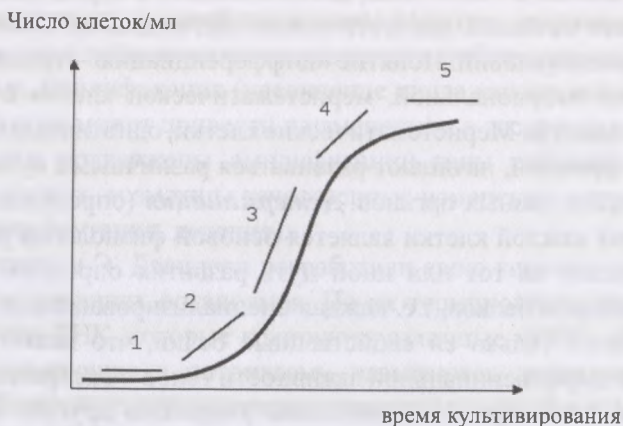
поддерживается на заданном уровне автоматически с помощью фотометрической регуляции подачи среды.

Рост изолированных и каллусных клеток, как и целых растений, описывается S-образной кривой. Она получается, если число клеток в культуре или их массу представить как функцию времени, прошедшего с момента их посева (рис. 3). Эта кривая характерна для популяции клеток, культивируемых как поверхностным способом, так и в жидкой среде. Она состоит из следующих фаз: 1) латентная фаза, или лаг-фаза, во время которой отсутствует видимый рост, но идет активный процесс поглощения воды, питательных веществ и подготовки клеток к делению; 2) фаза ускорения роста – клетки начинают делиться; 3) экспоненциальная, или логарифмическая, фаза роста, в которой по любому принятому критерию возрастает удельная скорость роста; 4) фаза замедления роста, в которой скорость роста уменьшается; 5) стационарная фаза, в которой по любому принятому критерию рост постоянен; 6) фаза гибели клетки. Однако форма реальных ростовых кривых может значительно отличаться от моделей продолжительностью фаз. Это зависит как от генотипа (вид растения), так и от условий выращивания и количества инокулюма и транспланта.

Переход клеток из одной фазы в другую контролируется как внутренними, так и внешними факторами. Внутренние факторы: пролиферативный пул, а также продолжительность растяжения, состояние клетки. Внешние факторы: состав питательной среды, уровень pH, содержание кислорода, температура, плотность посева и т. д. **Пролиферативный пул** – это отношение числа делящихся клеток к общему числу клеток в культуре. Это отношение, выраженное в процентах, называется **митотическим индексом**.

В процессе культивирования делятся не все клетки, что приводит к снижению пролиферативного пула. Это может объясняться следующими причинами: 1) необратимая дифференцировка; 2) вступление клеток G (фаза покоя, или клетки «вне цикла»); 3) гибель клеток. Рост можно регулировать различными факторами и кон-

тролировать по следующим показателям: размер, объем, масса, число клеток, количество белка и ДНК.



Фазы роста: 1-латентная; 2-логарифмическая; 3-линейная; 4-замедления; 5-стационарная.

Рисунок 3. Модельная кривая ростового цикла.

В суспензионной культуре одиночные клетки зачастую начинают делиться после кондиционирования среды, т.е. добавления той питательной среды, в которой ранее культивировались делящиеся клетки.

Возникновение физиологических и структурных различий между клетками и тканями растений, связанное с их функциональной специализацией, называют **процессом дифференциации**. В основе этого процесса, как и при дифференциации клеток в интактном растении, лежит дифференциальная активность генов. Структура и функции клеток определяются активностью генов, и если клетки различаются по своей структуре и функциям, то это обусловлено различиями в экспрессии их генов, то есть специализация обеспечивается «включением» разных генов в разных клетках. Обычно активна небольшая часть (5%) всего пула генов, свойственных данному виду. В этот состав активных генов

входят, кроме видоспецифичных и обязательных для поддержания клеточного метаболизма, гены, активные только в данном органе, ткани, клетке, а также гены, активные лишь в определенном возрасте или начавшие работать только под влиянием изменившихся внешних условий. Понятие «дифференциация» отражает превращение эмбриональной, меристематической клетки в специализированную. Меристематические клетки, однотипные по структуре и функции, начинают развиваться различными путями, создавая ткани разных органов. *Детерминация* (определение) пути развития каждой клетки является основой физиологии развития. Вступление на тот или иной путь развития определяется особым набором белков, т.е. каждая специализированная клетка вырабатывает только ей свойственные белки, что является следствием дифференциальной активности генов – экспрессии одной группы генов при одновременной репрессии других. Свойства клетки обусловлены действием ферментов и других белков, структура которых определяется иРНК, образующимися в процессе транскрипции. В то время как структура и метаболизм клетки меняется при дифференциации, набор генов клетки остается неизменным на протяжении всего развития организма. Изменения затрагивают лишь степень активности генов.

В процессе развития регуляция белкового синтеза может осуществляться на любом уровне. В принципе, можно выделить шесть таких уровней: 1) на уровне синтеза, или репликации ДНК; 2) на уровне синтеза иРНК, или транскрипции (время и характер образования первичного РНК-транскрипта); 3) на уровне процессинга (характер процессинга первичного РНК-транскрипта); 4) на уровне транспорта иРНК из ядра в цитоплазму (отбор в ядре зрелых иРНК, предназначенных для экспорта в цитоплазму); 5) на уровне трансляции на рибосомах; 6) на уровне деградации иРНК в цитоплазме.

Установлены три типа устойчивых изменений ДНК, влияющих на активность генов. Во-первых, изменения взаимного расположения генов в хромосомах могут влиять на их функцию. При транслокации или инверсии ген перемещается и вновь

встраивается в другой участок ДНК. Это приводит к снижению или, наоборот, к резкому усилению активности генов. Транспозоны, или мобильные диспергированные генетические элементы, могут перемещаться из одной хромосомы в другую, вызывая сверхмутабельность генов или активацию ранее ингибированных генов. Во-вторых, амплификация (увеличение числа какого-либо гена в геноме) также может привести к изменениям в экспрессии генов. Чаще всего подвержены амплификации гены рибосомальных РНК. В-третьих, возможны качественные изменения в структуре самого гена (мутация, делеция).

Р. Бриттен и Э. Дэвидсон разработали свою гипотезу регуляции генов у высших организмов. По их терминологии последовательности ДНК, которые кодируют различные мРНК, рРНК и тРНК, попадающие в цитоплазму, называются *генами-продюсерами*. Каждый из этих генов регулируется соседней последовательностью ДНК – *геном-рецептором*. Гены-рецепторы активируются при взаимодействии с РНК определенного типа, называемой *активаторной РНК*. Активаторная РНК синтезируется на последовательности ДНК, называемой *геном-интегратором*. Предполагается, что активаторная РНК может действовать на несколько разных генов-рецепторов. Таким образом, один интегратор может вызвать синтез целой группы разных ферментов. Ген-интегратор контролируется соседним *сенсорным геном*. Он представляет собой последовательность ДНК, с которой взаимодействуют внешние агенты, то есть индуцирующие факторы. Гену-продюсеру могут соответствовать различные гены-рецепторы. Это означает, что один ген-продюсер может реагировать на различные индукторы через разные сенсорные и интеграторные гены. Это объясняет факт, как один фермент может быть индуцирован различными стимулирующими веществами. Сложность регуляции синтеза белка также увеличивается за счет того, что одному сенсорному гену может соответствовать несколько генов-интеграторов. Модель регуляции экспрессии генов Р. Бриттена и Э. Дэвидсона хорошо объясняет, как один индуцирующий фактор может вызвать множество различных реакций и в то же время как

одинаковые реакции вызываются различными индуцирующими факторами. Трансляция специфических иРНК начинается не сразу после их перехода из ядра в цитоплазму.

Таким образом, дифференциация у растений определяется различиями в экспрессии генов в тех или иных частях растения или на тех или иных стадиях его жизненного цикла. В образовании каллуса на экспланте принимают участие клетки тканей разных типов, процесс дедифференциации у них, по-видимому, идет порозному, и возникающие из них каллусные клетки также будут отличаться. Обязательным условием дедифференцировки клетки и ее превращения в каллусную клетку является присутствие в питательной среде фитогормонов. Превращению любой клетки в каллусную предшествует процесс глубокой биохимической и структурной перестройки. Способность клетки воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития называется *компетенцией*. Индуцирующее воздействие могут оказывать различные факторы: гормоны, продукты жизнедеятельности соседних клеток, других тканей, электрофизиологические сигналы и т. д.

Детерминация – приобретение клеткой состояния готовности к реализации определенных наследственных свойств. Детерминация приводит к развитию по определенному пути с одновременным ограничением возможности развития в других направлениях. Детерминация компетентной клетки может начинаться сразу же после деления в начале роста протоплазмы. Детерминированная определенным образом клетка приобретает узкую специализацию, то есть дифференцируется и превращается в клетку какой-либо ткани.

При длительном пассировании ткани некоторых растений приобретают способность к синтезу достаточно больших количеств ауксина, а также цитокинина, т.е. становятся *прототрофными* в отношении этих гормонов. Такие культуры каллуса называют *«привыкшими»*. Причина возникновения гормоннезависимых штаммов неясна. Они могут быть как результатом мутации, так и дерепрессирования генов. Гормоннезависимыми в культуре являются также опухолевые клетки.

Основным типом культивируемых клеток являются каллусные. В цикле выращивания каллусные клетки после ряда делений проходят обычный для клетки растения онтогенез, т. е. приступают к росту растяжением, затем дифференцируются как зрелые каллусные клетки, стареют и гибнут. Дифференцированные каллусные клетки специализируются на синтезе видоспецифических вторичных соединений. Эти клетки подобны паренхимным клеткам растения. В растущем каллусе делению подвергаются не все клетки, это функция меристемоподобных клеток с густой плотной цитоплазмой и без вакуолей.

Каллусные клетки отличаются не только по морфологии, но и по биохимическим свойствам, по физиологическому состоянию и генетически. Каллусные клетки отличаются от клеток исходной ткани и между собой размерами и формой, в них варьирует число и форма ядер. Полиморфизм культивируемых клеток можно объяснить видовыми и возрастными особенностями, уровнем пloidности, влиянием состава питательной среды и условий культивирования, отсутствием коррелятивных связей. Последний фактор, ведущий к нарушению жесткой регуляции, существовавшей в целом растении, видимо, является основной причиной спонтанной изменчивости клеток *in vitro*. Физиологическая гетерогенность состоит в том, что клетки в популяции находятся в разном физиологическом состоянии, т.е. делятся, растут, стареют, погибают. Такая культура называется асинхронной. Заставить популяцию клеток высших растений проходить фазы клеточного цикла одновременно, т. е. синхронизировать их, почти невозможно. Потому что та часть клеток, которая способна в данный момент к делению, составляет 2-4%. В лучших случаях синхронизация может быть достигнута у 10-30% клеток, но при последующих делениях популяция опять быстро утрачивает синхронность.

Гетерогенность культивируемых клеток обусловлена генетической, эпигенетической и модификационной изменчивостью. Генетические, или мутационные, изменения приводят к изменению генотипа, которое может быть унаследовано. Мутации

(изменения количества или структуры ДНК) происходят на геномном, хромосомном и геномном уровнях. Причины генетической изменчивости многообразны: 1) нарушение коррелятивных связей при выделении первичного экспланта из растения, т. е. отсутствие организменного контроля; 2) действие компонентов среды; 3) влияние продуктов метаболизма, накапливающихся в среде; 4) гетерогенность исходного материала и селекция клеток определенного типа. Гетерогенность клеток *in vitro* возрастает с увеличением продолжительности их культивирования.

Морфогенез и регенерация. Неорганизованно растущие каллусные клетки, характеризующиеся монотонным размножением и ростом, благодаря процессам вторичной дифференцировки могут образовывать ткани (гистогенез), органы (органогенез) и зародышеподобные структуры – эмбриоиды (эмбриоидогенез, или соматический эмбриогенез).

Сначала каллус растет, набирает какую-то определенную критическую массу, потом переходит к морфогенезу. Однако только единичные клетки изменяют свою программу развития. Это говорит о том, что для перехода к морфогенезу необходимо строго определенное сочетание действия внешних факторов, в первую очередь индуктора, с состоянием детерминированности клетки, т. е. с ее готовностью под действием этого индуктора реализовать свои наследственные свойства. Редифференцировка клетки, связанная с перепрограммированием экспрессии генома, – сложный процесс, регулируемый внутренними и внешними факторами. Главной причиной, вызывающей дифференцировку клеток и их переход к гистогенезу с последующим формированием органогенных структур, можно считать действие фитогормонов. При этом основным фактором, определяющим тот или иной тип морфогенеза, выступает соотношение ауксинов и цитокининов в питательной среде. Эта закономерность впервые была обнаружена Скугом и Миллером в 1957 году, а затем подтверждена многочисленными экспериментами. При среднем отношении ауксин/цитокинин регенерационных процессов в каллусной ткани табака не наблюдается, а происходит лишь пролиферация

клеток. Высокое отношение ауксин/цитокинин вызывает корнеобразование (ризогенез). Низкое отношение ауксин/цитокинин способствует формированию почек (геммогенез). Тип образующейся меристемы зависит от соотношения между ауксином и цитокинином. Однако у целого ряда растений не всегда удается изменением баланса фитогормонов регенерировать почки или корни. На взаимодействие гормонов при регуляции дифференцировки почек или корней могут влиять и другие факторы, например содержание сахаров и фосфатов, источник азота и другие компоненты среды, в частности пурины.

Открытие Скугом и Миллером того факта, что баланс экзогенных фитогормонов регулирует регенерацию почек и корней в тканях каллуса табака, сыграло важную роль в изучении морфогенеза *in vitro*, но механизм явления на клеточном и молекулярном уровнях остается до сих пор неясным. Для злаков и некоторых бобовых растений не найдены нужные концентрации гормонов для индукции морфогенеза и получения растений-регенерантов из клеток и изолированных протопластов. Таким образом, гормональная концепция регуляции дифференциации и морфогенеза *in vitro* не может рассматриваться как универсальная. Способность культивируемых тканей к морфогенезу зависит от генотипа исходного растения, его физиологического состояния, органа, из которого изолирован эксплант, времени года и других химических и физических факторов. Роль генотипа в проявлении морфогенной способности культивируемых тканей была показана на разных сортах табака, моркови, цветной капусты, бегонии, женьшеня, а также представителей злаков. Орган, из которого изолирован эксплант, также имеет значение. Эти данные говорят о роли первичной клеточной дифференциации в явлениях органогенеза *in vitro*. Существует прямая связь между цитогенетической стабильностью культивируемых клеток и способностью к морфогенезу. Клетки, способные воспринимать сигнал индуктора, детерминируются к выполнению программы развития очень рано. Клетки на стадии детерминации перестают делиться, обособляются от окружающих их каллусных клеток, образуя

утолщенную клеточную стенку. В этот период они накапливают субстраты и энергию для последующих быстрых делений.

Клетки-инициали, возникшие в массе паренхимных каллусных клеток, отличаются морфологически. У них увеличивается ядро и, соответственно, ядерно-плазменное отношение, возрастает число рибосом, митохондрий, в пластидах накапливается крахмал. Таким образом, как и в случае дедифференцировки исходной клетки экспланта, каллусная клетка, превращаясь в меристематическую, полностью реорганизует свою внутреннюю структуру. Через некоторое время эти клетки начинают быстро делиться по типу дробления, образуя сферическую массу мелких клеток меристематического типа. Далее эта масса клеток либо превращается в *меристематический очаг*, в котором формируются зачатки стеблей или корней, либо становится биполярным глобулярным проэмбрио, из которого развивается эмбрионид – зародышеподобная структура.

Фактором, определяющим дальнейший характер развития, становится полярность. В культуре каллуса клеточные деления происходят беспорядочно, во всех направлениях и возникает неорганизованная масса ткани, т. е. в каллусе нет определенных осей полярности, тогда как в меристемах побега, корня, в зародыше характер деления клеток строго упорядочен. В меристематическом очаге и в проэмбрио метаболические процессы протекают очень интенсивно, и они становятся аттрагирующими центрами, куда устремляются питательные и регуляторные вещества. Эти клетки связаны между собой многочисленными плазмодесмами в отличие от каллусных клеток, в которых транспорт веществ в основном осуществляется по апопласту. Процесс, в котором каллусная клетка имитирует зиготу и дает начало биполярной эмбрионидной структуре, носит название *соматического эмбриогенеза*, или *эмбриоидогенеза*. Эмбриоидогенез может осуществляться разными путями. Т.Б. Батыгина с коллегами на основе литературных и собственных данных обобщили способы образования эмбрионидов *in vitro*. В основе этих способов лежат два пути: образование эмбрионидов непосредственно из одиночной

изолированной клетки (1-й способ) и из эмбрионального клеточного комплекса (2, 3, 4-й способы). **Эмбриональный клеточный комплекс (ЭКК)** — это комплекс разнородных клеток, который возникает путем деления одной или нескольких изолированных клеток и в дальнейшем может инициировать эмбриониды.

Факторами, индуцирующими соматический эмбриогенез, являются фитогормоны. Для экспериментальной индукции эмбрионидов необходимо последовательно менять питательную среду, особенно важно контролировать соотношение азота и ауксина. Частота образования эмбрионидов зависит также от формы азота в питательной среде, хороший эффект, например, оказывала замена части аммонийного азота на глютамин и аланин. Наиболее эффективен ауксин 2,4-Д, однако он необходим только для детерминации клеток, для начальной стадии образования эмбриональных клеток. Развивающиеся эмбриониды не нуждаются в гормонах, так как начинают вырабатывать их сами. Присутствие гормонов в питательной среде нарушает нормальный эмбрионидогенез. Длительное пребывание проэмбрио в среде, содержащей ауксин, приводит к пролиферации клеток, составляющих эмбриональный комплекс, и к прекращению дифференциации эмбрионидов, то есть они снова превращаются в каллусные клетки. Эмбриогенный каллус, пересаженный на среду без ауксина или с пониженным его содержанием, образует эмбриониды. Эмбриониды, перенесенные на безгормональную среду, дают проростки. Таким образом, процесс соматического эмбриогенеза протекает в две стадии: 1) индукция клеток с эмбриогенной компетенцией (обозначаемых как ЭКК) в присутствии высоких концентраций ауксина; 2) развитие этих эмбриогенных масс в эмбрионид при отсутствии ауксина или при пониженном его содержании. Сформировавшийся эмбрионид становится автотрофным в полном смысле, он отделяется от рыхло связанных клеток и легко вычленяется из каллуса. Тогда как стебли и корни, тоже возникшие из меристематического очага, тесно связаны с каллусной тканью проводящей системой. В случае культуры клеток и тканей **регенерация** — это регенерация почек

(геммогенез) и корней (ризогенез) или эмбриоидов (эмбриоидогенез). Органогенез и эмбриоидогенез одновременно в одной культуре наблюдаются крайне редко. Эмбриоиды при переносе на питательную среду без гормонов легко регенерируют целое растение. Увеличив содержание ауксина в среде, можно укоренить почку и тоже получить растение-регенерант. Имеют место случаи одновременной закладки в каллусе апикальных меристем побега и корня (гемо-ризогенез), что также приводит к регенерации целого растения *in vivo*. Генетическая детерминированность морфогенетических процессов означает, что на молекулярном уровне они могут быть представлены как процесс скоординированной в пространстве и времени смены синтезируемых в клетке иРНК и белков.

Вопросы для контроля:

1. Какие условия необходимы для культивирования клеток?
2. Какие компоненты входят в состав питательной среды?
3. Какие химические вещества используют для стерилизации растительного материала.
4. Что регулирует образование и рост каллуса?
5. Что такое дифференциация и дедифференциация?
6. Как получают суспензионную культуру?
7. Преимущества суспензионной культуры по сравнению с поверхностным культивированием клеток.
8. Какие существуют способы культивирования клеток в жидкой среде?
9. Что такое компетенция и детерминация?
10. Как регулируется активность генов?
11. Какие виды изменчивости наблюдаются у культивируемых клеток?
12. Чем обусловлена гетерогенность клеток *in vitro*?
13. Что такое меристематический очаг, эмбриональный клеточный комплекс? Как они возникают?
14. Пути морфогенеза *in vitro*.
15. Способы формирования эмбриоидов.
16. Факторы, влияющие на морфогенез и регенерацию растений.

2.1 Тестовые задания к главе «Принципы и методы культивирования растительных клеток *in vitro*»

1. Детерминация клеток – это:

- А) Качественные изменения у клеток в процессе развития;
- В) Способность клетки воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением своего развития;
- С) Переход специализированных неделящихся клеток к пролиферации;
- Д) Развитие клетки в процессе онтогенеза;
- Е) Приобретение клеткой состояния готовности к развитию по определенному пути, сопровождающееся одновременным ограничением возможностей развития в других направлениях;
- Ф) Предопределенное развитие клетки в одном направлении;
- Г) Развитие клетки в одном определенном направлении;
- Н) Увеличение линейных размеров клеток и органов.

2. Рост растений – это:

- А) Увеличение линейных размеров клеток и органов;
- В) Необратимое увеличение массы клеток и органов растения;
- С) Необратимое увеличение размеров и массы клеток, тканей и органов растения, связанное с новообразованием элементов их структур;
- Д) Качественные изменения в структуре и функциональной активности растения в процессе онтогенеза;
- Е) Качественные изменения клеток, органов и всего организма растения;
- Ф) Образование новых структур в процессе необратимого увеличения линейных размеров клеток, тканей, органов растения;
- Г) Количественные изменения линейных параметров клеток и тканей, связанное с новообразованием элементов их структур;
- Н) Приобретение клеткой состояния готовности к развитию по определенному пути, сопровождающееся одновременным ограничением возможностей развития в других направлениях.

3. Эмбрионд – это:

- А) Зародыш, образовавшийся из половых клеток;
- В) Зародыш, образовавшийся из зиготы;
- С) Зародыш, образовавшийся из оплодотворенной яйцеклетки;
- Д) Зародыш, образовавшийся из спермия;
- Е) Зародыш, образовавшийся из соматической клетки;
- Ф) Зародышеподобная структура, образующаяся *in vitro*;
- Г) Зона роста корня;
- Н) Зародыш, образовавшийся из культивируемых *in vitro* клеток.

4. Эмбриональный клеточный комплекс – это:

- А) Комплекс клеток, из которого в дальнейшем образуются эмбриониды;
- В) Комплекс клеток, из которого в дальнейшем образуются зиготические зародыши;
- С) Комплекс клеток, который образуется из эмбрионидов;
- Д) Комплекс клеток, из которого образуются семена;
- Е) Комплекс клеток, из которого образуются протокормы;
- Ф) Комплекс клеток, из которого в дальнейшем образуются морфогенные каллусы;
- Г) Комплекс клеток, из которого *in vitro* образуются зародыши;
- Н) Клеточный комплекс, дающий начало биполярному зародышу.

5. Прототрофами называются организмы:

- А) Питающиеся органическими веществами;
- В) Не требующие специальных питательных веществ;
- С) Питающиеся неорганическими веществами;
- Д) Требующие специальных питательных веществ;
- Е) Питающиеся веществами почвенных коллоидов;
- Ф) Способные сами синтезировать необходимые для роста и развития вещества;
- Г) Растущие на простых питательных средах;
- Н) Растущие на обогащенных сложных по составу питательных средах.

6. Ученые, внесшие большой вклад в развитие биотехнологии растений:

- А) Мурасиге С., Скуг Ф.;
- В) Пастер Л., Мечников В.;
- С) Рахимбаев И.Р., Валиханова Г.Ж.;
- Д) Мичурин С., Кребс М.;
- Е) Бутенко Р.Г., Айтхожин М.Ә.;
- Ф) Келлер Д., Мильштейн Ц.;
- Г) Кох Э., Хильдербрант С.;
- Н) Роукс Е., Ленинджер Дж.

7. Отметьте название питательных сред, применяемых для культивирования клеток растений:

- А) Питательная среда Гамборга-Эвелега В5;
- В) Питательная среда Дюльбека;
- С) Питательная среда Игла;
- Д) Питательная среда Мурасиге-Скуга;

- Е) Питательная среда ВМ;
- Ф) Питательная среда Уайта;
- Г) Питательная среда Эрла;
- Н) Питательная среда Эрлиха.

8. Ученые, которые ввели понятие «Морфогенез и регенерация растений» в биотехнологию растений:

- А) П. Опарин;
- В) Ф. Сэнгер;
- С) К. Эрки;
- Д) Ф. Скуг;
- Е) Т. Шван;
- Ф) С. Мурасиге;
- Г) Р. Готре;
- Н) Д. Дженнер.

9. Каллусная ткань появляется в результате процесса:

- А) Ризогенез;
- В) Дифференциации;
- С) Органогенез;
- Д) Дедифференциации;
- Е) Геммогенез;
- Ф) Деление неспециализированных клеток;
- Г) Деспециализация дифференцированных клеток;
- Н) Эмбриогенеза.

10. Скорость роста каллусной ткани определяют при помощи следующих показателей:

- А) Увеличение плотности;
- В) Увеличение содержания воды;
- С) Интенсивно растущая каллусная ткань имеет ярко-желтый цвет;
- Д) Увеличение массы;
- Е) Увеличение количества растений на поверхности каллусной ткани;
- Ф) Увеличение клеточной биомассы;
- Г) Увеличение объема каллуса;
- Н) Изменение консистенции каллуса.

11. Геммо-ризогенез – это:

- А) Образование в каллусе почек и корней;
- В) Образование в каллусе корней;
- С) Образование в каллусе почек;
- Д) Образование в каллусе эмбриоидов;

- Е) Образование в каллусе элементов ксилемы;
- Ф) Образование *in vitro* побегов и корней;
- Г) Клеточный комплекс, дающий начало образованию семян;
- Н) Образование адвентивных почек и ризоидов.

12. Отметьте бактерицидное вещество

- А) Этилендиаминтетрауксусная кислота;
- В) Хлорамфеникол;
- С) Хлоралгидрат;
- Д) Хлорамин;
- Е) Пиридоксин;
- Ф) Ca^{2+} -гипохлорид;
- Г) Зеатин;
- Н) Этанол.

13. Отметьте ауксины

- А) НУК, 2,4-Д;
- В) БАП, ИУК;
- С) ИМК, БАП;
- Д) ФЕП, 2,4-Д;
- Е) НУК, ДНК;
- Ф) ИУК, НУК;
- Г) ИУК, ФЭП;
- Н) ИУК, 2,4-Д.

14. Отметьте макроэлементы, входящие в состав питательной среды МС (Мурасиге-Скуга)

- А) Cu, Ca, Co;
- В) C, N, I;
- С) C, Ca, S;
- Д) B, O, S;
- Е) C, N, Cu;
- Ф) P, I, Mo;
- Г) N, Ca, Mg;
- Н) S, Mg, K.

15. Отметьте микроэлементы, входящие в состав питательной среды МС

- А) I, Co, Cu;
- В) Na, Zn, Co;
- С) B, O, H;
- Д) B, Zn, Co;

- Е) Р, I, Мо;
- Ф) С, N, I;
- Г) Cu, Zn, В;
- Н) N, Ca, Mg.

16. Отметьте витамины, входящие в стандартный состав питательной среды МС

- А) В₁ витамин;
- В) В₆ витамин;
- С) Никотиновая кислота;
- Д) С витамин;
- Е) Д витамин;
- Ф) Е витамин;
- Г) Ca²⁺-пантотенат;
- Н) K⁺-аспаргат.

17. Следующие фитогормоны относятся к классу ауксинов:

- А) 2,4-Д;
- В) БАП;
- С) НУК;
- Д) Кинетин;
- Е) ИУК;
- Ф) Зеатин;
- Г) Гиббереллин;
- Н) Абсцизин.

18. Как называется аппарат, предназначенный для промышленной ферментации?

- А) биореактор;
- В) автоклав;
- С) азротенк;
- Д) мадженты;
- Е) реактор.

19. Кем были введены принципы асептики в биотехнологическом производстве?

- А) Л. Пастер;
- В) А. ван Левенгук;
- С) К.А. Тимирязев;
- Д) Т. Шванн;
- Е) С.Н. Виноградский.

20. Что понимают под стерилизацией материалов в биотехнологии?

- A) Уничтожение грибов;
- B) Уничтожение бактерий;
- C) Уничтожение вирусов;
- D) Уничтожение всех микроорганизмов;
- E) Уничтожение макроорганизмов.

21. Как стерилизуют ламинар-бокс?

- A) Ультрафиолетовым излучением и этиловым спиртом;
- B) Рентгеновскими лучами и уксусной кислотой;
- C) Инфракрасным излучением и ксилолом;
- D) Кварцеванием и изоамиловым спиртом;
- E) Ультрафиолетовым излучением и метанолом.

22. Каким способом стерилизуют растворы неустойчивых к нагреванию компонентов среды?

- A) Пастеризацией;
- B) УФ-лучами;
- C) Дробной стерилизацией;
- D) Фильтрованием через бактериальные фильтры;
- E) Тиндализацией.

23. Каким способом стерилизуют растительный материал?

- A) Рентгеновским излучением;
- B) УФ излучением;
- C) Химическим способом;
- D) Пастеризацией;
- E) Автоклавированием.

24. Каким способом стерилизуют питательную среду?

- A) В сушильном шкафу;
- B) В ламинар-боксе;
- C) В автоклаве;
- D) Пастеризацией;
- E) Рентгеновским излучением.

25. В какой форме добавляется азот в среду Мурасиге-Скуга?

- A) NH_4NO_3 ;
- B) KNO_3 ;
- C) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, HNO_3 ;
- D) $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, KNO_3 ;
- E) NH_4NO_3 , KNO_3 .

26. Отметьте органогенные элементы:

- A) Mo, Mg, Mn;
- B) C, Co, Cu;
- C) N, P, Se;
- D) P, Pb, Cs;
- E) C, O, H.

27. Условия, необходимые для культивирования клеток растений:

- A) Стерильность;
- B) Давление 1 атмосфер;
- C) pH=2;
- D) Абсолютная температура;
- E) Вакуум.

28. Компоненты питательной среды для культивирования клеток растений (укажите неверный ответ):

- A) Минеральные соли;
- B) Витамины;
- C) Стерилизующие вещества;
- D) Фитогормоны;
- E) Сахароза.

29. Инокулюм – это:

- A) Вторичный метаболит;
- B) Биологически активное вещество;
- C) Часть суспензионной культуры, предназначенное для пересадки;
- D) Культура эндосперма *in vitro*;
- E) Фаза развития зародыша.

30. Отметьте оптимальное значение pH питательной среды:

- A) 3-4;
- B) 11-14;
- C) 8-10;
- D) 5-6;
- E) 4-5.

31. К каким веществам относится агар?

- A) Белок;
- B) Полисахарид;
- C) Терпеноид;
- D) Жирная кислота;
- E) Липид.

32. Какие фитогормоны чаще всего используют при приготовлении питательной среды?

- А) Ауксин и гиббереллины;
- В) Ауксины и цитокинины;
- С) Цитокинины и гиббереллины;
- Д) Ауксины и абсцизовая кислота;
- Е) Зеатин и этилен.

33. К какому классу фитогормонов относится 2,4 -дихлорфенокси-уксусная кислота и индолилмасляная кислота?

- А) Цитокининам;
- В) Ауксинам;
- С) Абсцизинам;
- Д) Гиббериллинам;
- Е) Не относится ни к одному из перечисленных выше классов.

34. Какие гормоны называются эндогенными?

- А) Фитогормоны, входящие в состав питательной среды;
- В) Только фитогормоны, образовавшиеся в точке роста стебля;
- С) Только фитогормоны, образовавшиеся в точке роста корня;
- Д) Только фитогормоны, образовавшиеся в листовой пластинке;
- Е) Все гормоны, синтезированные в самом растительном организме.

35. Какие гормоны называются экзогенными?

- А) Фитогормоны, входящие в состав питательной среды;
- В) Только фитогормоны, образовавшиеся в точке роста стебля;
- С) Только фитогормоны, образовавшиеся в точке роста корня;
- Д) Только фитогормоны, образовавшиеся в листовой пластинке;
- Е) Все гормоны, синтезированные в самом растительном организме.

36. К какому классу соединений относятся ауксины?

- А) Алкалоиды;
- В) Фитогормоны;
- С) Ферменты;
- Д) Липиды;
- Е) Витамины.

37. К каким веществам относится зеатин?

- А) Фосфолипидам;
- В) Гликолипидам;
- С) Абсцизинам;
- Д) Ауксинам;
- Е) Цитокининам.

38. Чем объясняется необходимость добавления углеводов в питательную среду для культивирования растительных тканей *in vitro*?

- A) Автотрофностью;
- B) Компетенцией;
- C) Ауксотрофностью по аминокислотам;
- D) Появлением «привыкшей» ткани;
- E) Гетеротрофностью.

39. Отметьте фитогормоны:

- A) Глутамин, рибофлавин, кинетин;
- B) Зеатин, этилен, бензиламинопурин;
- C) Аспарагин, путресцин, кинетин;
- D) Кадаверин, абсцизовая кислота, триптофан;
- E) Тирозин, аланин, тимин.

40. Какое из перечисленных веществ не относится к ауксинам?

- A) НУК;
- B) ИУК;
- C) ИМК;
- D) 2,4-Д;
- E) БАП.

41. Какое вещество не относится к цитокининам?

- A) Зеатин;
- B) Бензиламинопурин;
- C) 6-фурфуриламинопурин;
- D) Кинетин;
- E) 2, 4, 5-Т.

42. Какие фитогормоны в питательной среде, согласно концепции Скуга и Миллера, индуцируют геммогенез в каллусах табака?

- A) Абсцизовая кислота;
- B) Высокое отношение ауксин/ цитокинин;
- C) Низкое отношение ауксин/ цитокинин;
- D) Среднее отношение ауксин/ цитокинин;
- E) Гиббереллин.

43. Какие фитогормоны в питательной среде, согласно концепции Скуга и Миллера, индуцируют ризогенез в каллусах табака?

- A) Этилен;
- B) Высокое отношение ауксин/ цитокинин;
- C) Низкое отношение ауксин/ цитокинин;

- Д) Среднее отношение ауксин/ цитокинин;
- Е) Гибберелловая кислота.

44. Что такое органогенез?

- А) Образование тканей;
- В) Образование каллуса;
- С) Образование органов;
- Д) Образование флоремы в каллусной ткани;
- Е) Образование ксилемы в каллусной ткани.

45. Что такое морфогенез *in vitro*?

- А) Образование структур, обеспечивающих развитие организма *in vitro*;
- В) Образование каллусной ткани на месте поранения растения;
- С) Образование элементов ксилемы в каллусной ткани;
- Д) Образование элементов флоремы в каллусной ткани;
- Е) Правильного ответа нет.

46. Как называется вещество, имеющую формулу C_5H_8 и какова его роль в растении?

- А) Глицерин, участвует в построении биологической мембраны;
- В) Серин, используется в биосинтезе белка;
- С) Этилен, ускоряет созревание плодов;
- Д) Этиловый спирт, образуется при брожении;
- Е) Глицин, используется в биосинтезе белка.

47. Что такое эмбриокультура?

- А) Зародышеподобные структуры, образующиеся на поверхности каллуса;
- В) Эмбриониды, образующиеся на листовых эксплантах;
- С) Эмбриониды, образующиеся на корневых эксплантах;
- Д) Культура изолированных зародышей на искусственной питательной среде;
- Е) Эмбриоды, образовавшиеся на стеблевых эксплантах.

48. Геммогенез *in vitro* – это:

- А) Образование зародышеподобных структур в культуре клеток растений;
- В) Образование цветов в культуре клеток растений;
- С) Образование почек в культуре клеток растений;
- Д) Образование корней в культуре клеток растений;
- Е) Образование каллуса в культуре клеток растений.

49. В чём проявляется тотипотентность соматических клеток растений?

- А) Способность к органогенезу;
- В) Способность к гиногенезу;
- С) Способность к регенерации целых растений;
- Д) Способность к ризогенезу;
- Е) Способность к каллусогенезу.

50. Что такое ризогенез?

- А) Образование стеблей;
- В) Образование вегетативных почек;
- С) Образование генеративных почек;
- Д) Образование корней;
- Е) Образование тканей.

51. Что такое гистогенез?

- А) Образование корней;
- В) Образование листьев;
- С) Образование каллусов;
- Д) Образование почек;
- Е) Образование тканей.

52. Что такое регенерант?

- А) Ткань, появляющаяся у растений на месте повреждения;
- В) Растение, появившееся в условиях *in vivo*;
- С) Клубень, появившийся на микрочеренке растения картофеля;
- Д) Растение, появившееся из клеток, культивировавшихся в условиях *in vitro*;
- Е) Корень, появившийся на поверхности каллусной ткани.

53. Что такое культура клеток растений?

- А) Клетки растений, культивируемые на питательной среде в стерильных условиях;
- В) Клетки, ткани и органы растений, культивируемые на питательной среде в нестерильных условиях;
- С) Культивирование клеток, тканей и органов растений в полустерильных условиях;
- Д) Выращивание растений в нестерильном песке;
- Е) Правильного ответа нет.

54. Каллус – это:

- А) Колония микробных клеток;

- В) Особая ткань растений;
- С) Скопление животных клеток;
- Д) Образовательная ткань растений;
- Е) Проводящая ткань растений.

55. Эксплант – это:

- А) Опухолевая клетка;
- В) Фрагмент ткани для культивирования;
- С) Неспециализированная ткань, образовавшаяся из растительных клеток;
- Д) Клетка, не содержащая ядра;
- Е) Вещество, добавляемое в питательную среду.

56. Тотипотентность – это:

- А) Свойство соматической клетки полностью реализовать свой потенциал развития;
- В) Способность каллусов расти бесконечно долго;
- С) Свойство растений синтезировать *in vitro* вторичные метаболиты;
- Д) Способность каллуса расти как на твердой, так и в жидкой среде;
- Е) Детерминация клеток каллуса.

57. Факторы, влияющие на регенерацию растений *in vitro* (укажите неверный ответ):

- А) Состав питательной среды;
- В) Происхождение экспланта;
- С) Генотип растения;
- Д) Интенсивность фотосинтеза;
- Е) Условия культивирования.

58. Что такое дифференциация?

- А) Качественные изменения у растений;
- В) Возникновение структурных и функциональных различий между клетками в процессе развития;
- С) Морфогенез в процессе онтогенеза;
- Д) Развитие растений в процессе онтогенеза;
- Е) Определение пути развития каждой клетки.

59. Что такое дедифференциация?

- А) Качественные изменения у растений;
- В) Определение пути развития каждой клетки;
- С) Морфогенез в процессе онтогенеза;
- Д) Развитие растений в процессе онтогенеза;
- Е) Переход специализированных неделящихся клеток к пролиферации.

60. Какую форму имеет кривая роста клеток в хорошо растущей суспензионной культуре?

- А) Форму параболы;
- В) Форму гиперболы;
- С) S-образную форму;
- Д) Форму прямой, параллельной абсциссе;
- Е) Форму прямой, направленной сверху вниз под углом 45°.

61. Ученые, внесшие большой вклад в развитие биотехнологии растений:

- А) Бутенко Р.Г., Готре Р.;
- В) Михаэлис К., Мечников В.;
- С) Глеба Ю., Сидоров О.;
- Д) Дж. Нельсон, Е. Гриффин;
- Е) Мурасиге С., Скуг Ф.;
- Ф) Полевой В., Мильштейн Ц.;
- Г) Рубин М., Хильдербрант С.;
- Н) Кребс М., Ленинджер Дж.

62. Как можно охарактеризовать латентную фазу (лаг-фазу) роста клеток в суспензионной культуре?

- А) Происходит поглощение клетками воды и питательных веществ, а также подготовка к делению;
- В) Происходит интенсивное деление клеток;
- С) Удельная скорость роста культуры в этой фазе постоянна;
- Д) Скорость роста снижается, увеличивается гетерогенность клеток, синтезируются вторичные соединения;
- Е) В связи с истощением питательной среды происходит гибель клеток.

63. Как можно охарактеризовать экспоненциальную фазу роста клеток в суспензионной культуре?

- А) Происходит поглощение клетками воды и питательных веществ, а также подготовка к делению;
- В) Происходит интенсивное деление клеток;
- С) Увеличение размеров клеток культуры одинаковое;
- Д) Скорость роста снижается, увеличивается гетерогенность клеток, синтезируются вторичные соединения;
- Е) Количество мертвых клеток постепенно увеличивается.

64. Как можно охарактеризовать стационарную фазу роста клеток в суспензионной культуре?

- А) Происходит адаптация клеток к новым условиям среды, поглощение клетками воды и питательных веществ;

- В) Происходит интенсивная пролиферация клеток;
- С) Увеличение размеров клеток культуры одинаковое;
- Д) Скорость роста снижается, увеличивается гетерогенность клеток, синтезируются вторичные соединения;
- Е) Фаза, в которой рост культуры постоянен.

65. Как можно охарактеризовать фазу гибели клеток суспензионной культуры?

- А) Происходит поглощение клетками воды и питательных веществ, а также подготовка к делению;
- В) Клетки интенсивно делятся, количество новых клеток преобладает над количеством мертвых клеток;
- С) Удельная скорость роста культуры в этой фазе постоянна;
- Д) Скорость роста снижается, увеличивается гетерогенность клеток, синтезируются вторичные соединения;
- Е) В связи с истощением питательной среды происходит гибель клеток.

2.2 Практические задания к главе 2 «Принципы и методы культивирования клеток растений *in vitro*»

Задание 1

Рассчитайте какое количество (в мл) макроэлементов необходимо взять из сток-раствора (макроэлементы в 10-кратно увеличенной концентрации растворены в объеме 500 мл бидист. воды) для приготовления 2 л питательной среды МС. Расчеты можно произвести по нитрату калия KNO_3 , концентрация которого по прописи составляет 1900 мг/л.

Задание 2

Рассчитайте какое количество (в мл) микроэлементов необходимо взять из сток-раствора (микроэлементы в 100-кратно увеличенной концентрации растворены в объеме 300 мл бидист. воды) для приготовления 1 л питательной среды Гамборга-Эвелега В5. Расчеты можно произвести по сульфату марганца $\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, концентрация которого по прописи составляет 10 мг/л.

Задание 3

Определите молярную и эквивалентную концентрацию карбоната натрия, если известно, что плотность 10% раствора карбоната натрия составляет 1,102 кг/л.

Глава 3

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА И БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

В растениях содержится огромное разнообразие веществ вторичного происхождения. Несмотря на такое название, они играют важную роль в обмене веществ растений. Многие из них широко используются в медицине и технике, пищевой и парфюмерной промышленности, сельском хозяйстве.

Первыми среди вторичных веществ в культуре ткани привлекли внимание исследователей алкалоиды. Анализ каллусных культур барвинка розового, раувольфии змеиной, белены черной, дурмана и др. показал, что они содержат алкалоиды. Культивируемые клетки растений сохраняют присущую исходному виду растения способность синтезировать широкий спектр веществ вторичного метаболизма: *алкалоиды, терпеноиды, гликозиды, полифенолы, полисахариды, эфирные масла, необычные пептиды и специализированные белки, натуральные красители, стероиды, пряности, инсектициды, воски, витамины.*

Промышленное выращивание клеток и тканей – продуцентов экономически важных веществ – новое направление биотехнологии. Если традиционные биотехнологии для получения ценных биологически активных веществ использовали целые организмы: микроорганизмы, растения, животных, то современная биотехнология нацелена на клеточные технологии, основанные на культивировании свободных и иммобилизованных клеток.

Доказана возможность культуры клеток осуществлять **биотрансформацию**, то есть синтезировать некоторые биологически активные вещества из дешевых и доступных их предшественников. Эти «полупродукты» вторичных веществ не могут быть преобразованы химическим или микробиологическим путем, и только благодаря ферментам клеток в культуре происходит их химическое превращение в ценный конечный продукт.

Культура клеток, для того чтобы стать объектом промышленного выращивания, должна выдержать конкуренцию с дикорастущими и культурными лекарственными, техническими растениями, а также с микробиологическим производством и химическим синтезом. По сравнению с традиционным растительным сырьем клеточные культуры обладают следующими *преимуществами*: 1) независимость от влияния различных факторов окружающей среды (климат, сезон, погода, почвенные условия, вредители); 2) более высокий выход и качество продукта благодаря оптимизации и стандартизации условий выращивания; 3) экономия посевных площадей.

Клетки *in vitro* – это новая, экспериментально созданная биологическая система, особенности которой, в том числе и функции вторичных соединений, еще мало изучены. Показано, что иногда у культивируемых клеток в специализированном обмене проявляются особенности, характерные для филогенетически ранних групп растений или ювенильной стадии развития растения. Недостаток фундаментальных знаний очень тормозит развитие технологии культивируемых клеток.

Популяция клеток *in vitro* проходит определенный онтогенез: размножение (деление) – растяжение – дифференцировка – старение – смерть клеток. Соотношение клеток, находящихся на разных стадиях развития, меняется в зависимости от того, какой процесс преобладает. При изменении условий культивирования равновесие смещается в ту или иную сторону. Дифференцировка каллусной клетки, вышедшей из цикла деления, заключается в ее специализации на синтезе видоспецифичных вторичных соединений.

Факторы, влияющие на накопление вторичных метаболитов в культуре клеток растений:

Генотип родительского растения, то есть донора экспланта для введения в культуру, существенно влияет на биосинтетический потенциал культивируемых клеток. М. Ценк с сотрудниками для получения культуры барвинка розового (*Catharantus roseus*) собрал 184 образца семян из различных мест произрастания. Из проростков этих семян были отобраны несколько наиболее богатых гипотензивными индольными алкалоидами серпентином и аймалицином (более 0,7% на сухую массу), из которых были получены каллусные культуры, содержавшие искомым алкалоидов в 4-5 раз больше, чем каллусы, полученные из низкопродуктивных растений.

Однако это вовсе не значит, что в качестве экспланта используется только ткань, богатая искомым веществом, поскольку высокая концентрация вещества может отражать накопление его в ткани путем направленного транспорта, а не как продукт синтеза по месту локализации. Поэтому выбор органа растения для введения его в культуру имеет немаловажное значение. Так, например, содержание стероида диосгенина в культуре клеток диоскореи (*Dioscorea floribinda*), полученной из клубня, было на порядок выше, чем в культуре клеток из побега. Но зачастую клетки *in vitro* тотипотентны в отношении синтеза вторичных соединений, то есть любая клетка при создании соответствующих условий культивирования может продуцировать вещества, характерные для исходного растения.

Следует подчеркнуть, что гены, ответственные за регуляцию биосинтеза вторичных метаболитов, присутствуют и в других клетках, обычно их не продуцирующих. В некоторых случаях биосинтетические способности культуры клеток восстанавливались при регенерации растений. Таким образом, генетическая информация в клетках сохраняется, но для ее реализации требуются специфические условия.

Предполагается, что культивируемые клетки, изолированные из высокопродуктивных растений и тканей, содержат необхо-

димую генетическую информацию для биосинтеза этих метаболитов.

Гетерогенность культивируемых клеток. В культивируемых *in vitro* клетках могут происходить значительные изменения вторичного метаболизма по сравнению с интактными растениями. Неорганизованно пролиферирующие каллусные клетки в основном характеризуются низким содержанием искомого вещества. В то же время у некоторых растений клетки *in vitro* продуцируют повышенное количество алкалоидов, например у амми зубной (*Ammi visnaga*) и некоторых видов дурмана. Не уступает целому растению по содержанию активных веществ и культура клеток женьшеня (*Panax ginseng*). У отдельных растений в культуре клеток синтезируются вещества, не обнаруженные *in vivo*, например, эдулинин и рутакультин у руты душистой (*Ruta graveolens*) и ароморин у стефании (*Stephania cepharantha*). У живокости аяксовой (*Delphinium ajacis*) в составе стеринов у культивируемых клеток было обнаружено больше компонентов, чем у растения-донора. У *Andrographis paniculata* культивируемые клетки содержали иные сесквитерпены, чем у интактного растения. Спектр стероидных сапонинов и стеринов в клеточной культуре, полученной из корневищ диоскореи дельтовидной (*Dioscorea deltoidea*), значительно отличался от состава стероидов исходной ткани.

Клетки растений *in vitro* характеризуются генетической гетерогенностью, что тоже может быть причиной изменения вторичного метаболизма. Вместе с тем гетерогенность клеточной популяции может играть положительную роль, позволяя отбирать линии клеток с сильно измененными свойствами, в частности с повышенным синтезом искомого продукта или синтезирующие совершенно новые вещества.

Изменения генома культивируемых клеток могут быть вызваны путем индуцированного мутагенеза. Биохимические мутанты могут быть получены при обработке культуры мутагенами либо антиметаболитами. Так, в результате химического индуцированного мутагенеза и селекции на клеточном уровне в Институте физиологии растений АН СССР были отобраны мутантные

клеточные линии раувольфии змеиной, содержащей в 10 раз больше антиаритмического алкалоида аймалина, и диоскореи дельтовидной, продуцирующей диосгенин – ценное соединение для фармацевтической промышленности – в тех же количествах, что и корневище интактного растения. В дальнейшем, благодаря применению метода экспериментального мутагенеза и клонирования, штамм диоскореи дельтовидной дал еще более продуктивные клеточные линии.

В Карагандинском научно-производственном центре «Фитохимия» на основе культуры клеток эндемика полыни гладкой (*Artemisia glabella*) в промышленных масштабах производится противоопухолевый лекарственный препарат «Арглабин». Академиком С.М. Адекеновым с сотрудниками получены клеточные линии-продуценты терпеноида арглабина, составляющего основу данного препарата, характеризующиеся высокой биосинтетической способностью. Из экстракта эндемичных растений Казахстана *Salsola collina* Pall, *Saussurea salsa* Pall были выделены рутин и сесквитерпеновый лактон цинаропикрин – биологически активные вещества, проявляющие гепатопротекторное действие и, известные в медицине как препараты «Салсоколлин», «Саусалин», применяемые для лечения таких заболеваний, как трихоманоз, описторхоз, лямблиоз.

Химические и физические факторы культивирования. Решающими факторами питательной среды, эффективно регулирующими и первичный, и вторичный обмен клеток, являются фитогормоны. В большом количестве работ, посвященных изучению действия фитогормонов, показано, что оно зависит от вида растения, от природы вторичного соединения, от клеточного штамма и т.д. Поэтому результаты экспериментов по влиянию фитогормонов на синтез вторичных метаболитов крайне противоречивы.

Важнейшим фактором среды, влияющим на накопление биомассы, являются углеводы. Поскольку в основном клетки *in vitro* гетеротрофны, то обычно в качестве источника углерода используется сахароза. Конкурировать с сахарозой может и глюкоза,

но все-таки, за редким исключением, рост и высокий уровень биосинтеза в культуре обеспечивает именно сахароза. В то же время увеличение содержания сахара в среде удорожает производство, поэтому поиск дешевых углеводных добавок остается актуальным.

Большое влияние на синтез вторичных соединений оказывает минеральный состав среды. При этом наиболее значимыми являются азот, фосфор и калий. Однако их влияние очень специфично как в отношении вида растения, так и в отношении того или иного продукта, о чем свидетельствуют следующие примеры. Так, если у одних культур органические формы азота – пептон, дрожжевой экстракт, гидролизат казеина – тормозят накопление вторичных соединений, то у других – повышают их синтез. Соотношение аммонийного и нитратного азота в питательной среде также имеет значение. Например, увеличение нитратного азота в среде приводило к повышению синтеза диосгенина культурой клеток диоскореи. В культуре клеток табака усиливается синтез никотина с уменьшением в среде сахарозы, нитрата и фосфора. Бесфосфатная среда способствовала образованию алкалоидов и других вторичных метаболитов в каллусной культуре гармалы. Недостаток фосфора стимулирует синтез вторичных соединений и у некоторых других культур, но имеются данные и противоположного свойства. Безнитратная среда способствовала увеличению синтеза капсаицина каллусной культурой перца кустарникового. Среди трофических факторов положительное значение для биосинтеза вторичных веществ имеют некоторые предшественники самих искомым соединений.

Органические добавки неопределенного состава, такие как гидролизат казеина и кокосовое молоко, могут оказывать буферное действие. Буферная емкость сред очень низкая, поэтому величина исходного рН (5-6) при культивировании быстро сдвигается на несколько единиц, а это, в свою очередь, сказывается на биосинтетических свойствах и способности к накоплению продукта культивируемых клеток.

Таким образом, оптимизация питательной среды является ключевым моментом в повышении выхода продукта. Результатом

подобных исследований являются так называемые продукционные среды, на которых культивируемые клетки при незначительном или полном отсутствии деления клеток синтезируют значительные количества вторичных метаболитов.

Физическими факторами, влияющими на накопление вторичных метаболитов клетками, являются свет, температура, аэрация и режим перемешивания в случае суспензии, газовый состав в колбах. Стимулирующее действие света на образование вторичных соединений в культуре клеток показано на примере каротиноидов, эфирных масел, коричных масел, флаваноидов, плагстохинонов, антоцианов, катехинов, алкалоидов, витаминов. Свет активировал ферменты фенольного метаболизма, не влияя при этом на ферменты углеводного и липидного обмена. Имеет значение качество света. Данных о влиянии температуры на рост и биосинтезы клеточных культур очень мало. Однако тот факт, что температура оказывает действие на вторичный метаболизм интактных растений, говорит о необходимости исследований в этом направлении. Тем более, что температурные оптимумы для роста культуры клеток и биосинтезов не всегда совпадают. Так, например, наилучший рост каллусов гармалы наблюдался при 30°C, а максимум образования алкалоидов достигался при 25°C.

Накопление клетками вторичных продуктов метаболизма является результатом динамического равновесия между биосинтетическим, биотрансформационным и биодеградационным процессами. Влияние внешних и внутренних факторов на каждый из этих процессов сложно и из-за отсутствия фундаментальных знаний не поддается контролю. Поэтому следует признать оправданным тот эмпирический подход при изучении влияния факторов культивирования на накопление вторичных веществ, который распространен в настоящее время. Очень большое значение для роста и биосинтеза клеток *in vitro* имеют технические характеристики систем культивирования. Биотехнологическое производство вторичных метаболитов растений основано преимущественно на суспензионной культуре. В лабораториях при исследовании вторичного метаболизма *in vitro* суспензия обычно культивируется в колбах в небольших объемах (40-200 мл) и

перемешивается на круговых качалках. Скорость вращения сосудов (обычно 90-120 об/мин) может значительно влиять на рост и накопление метаболитов.

При масштабировании от небольших по объему культур в колбах до больших многолитровых ферментеров меняются многие параметры культивирования, в частности аэрация и перемешиваемость. Для культивирования суспензий в производственных масштабах применяется аппаратура, разработанная для микробиологической промышленности, однако исследования последних лет показали, что растительные клетки в силу своих специфических особенностей требуют особых сосудов для культивирования.

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

В микробиологических системах изучена взаимозависимость роста биомассы, выхода искомого продукта и снабжения кислородом. Для растений таких данных нет. На рост клеток, кроме кислорода, могут влиять и другие газы. Например, углекислый газ может существенно влиять на длину лаг-фазы. Высокая степень аэрации может оказывать негативное действие на рост и синтез продуктов вторичного метаболизма, поскольку удаляются углекислый газ и летучие соединения. Клетки растений *in vitro* по сравнению с микроорганизмами имеют низкую интенсивность дыхания, что тоже должно учитываться при конструировании сосуда для культивирования.

Отличительная особенность суспензионных культур клеток растений – высокая плотность, необходимая для роста. Поэтому

другим осложнением при культивировании клеток растений является увеличение вязкости, сопровождающее рост биомассы. Это ведет к адгезии. Адгезия (прилипание) клеток друг к другу, на поверхностях культурального сосуда и погруженных в него мешалок и датчиков вызывает затруднения. В верхней части сосуда постепенно может образовываться пена, состоящая из выделяемых клетками белков и полисахаридов. В процессе культивирования клетки слипаются и часть из них скапливается в этой пене, образуя «корку», или «безе». С увеличением биомассы клеток увеличивается и эта «корка», снижая интенсивность перемешивания, что, в конце концов, может привести культуру к гибели.

Клетки растений обладают меньшей физиологической и метаболической активностью по сравнению с микроорганизмами. Время генерации (интервал времени между двумя последовательными клеточными делениями) растительной клетки в 60-100 раз превосходит время генерации микробной клетки. Пул пролиферирующих клеток не превышает 50-60%, многие клетки быстро прекращают деление и переходят в фазу покоя. Периодическое или накопительное культивирование – это самый простой способ выращивания клеток, являющийся пока традиционным. Все изложенные специфические особенности растительных клеток затрудняют возможности крупномасштабного культивирования в непрерывном режиме, хотя в перспективе, видимо, переход к нему произойдет. Особенно для тех культур, у которых синтез четко коррелирует с ростом: на первой стадии культивирования идет накопление биомассы, на второй – синтез продукта, ради получения которого и проводится культивирование.

Иммобилизованные клетки.

Каллусные культуры при поверхностном культивировании накапливают вторичных метаболитов больше, чем клетки, растущие в жидкой среде. Показано, что у многих видов растений компактные, медленно растущие каллусные ткани на агаризованной среде накапливают алкалоидов больше, чем рыхлые и быстро растущие культуры, т. е. для нормального метаболизма

необходима какая-то пространственная организация клеток. Положение клетки внутри организма является одним из факторов, определяющим степень и тип ее дифференциации. Клетки, растущие изолированно друг от друга и в виде агрегатов, имеют совершенно различные условия окружения и, как следствие этого, различные пути метаболизма. Можно предположить, что чем ближе клетка или группа клеток по уровню организации к целому растению, тем более вероятно, что в них будут реализовываться метаболические пути, характерные для целого организма. Имеющиеся в литературе данные о положительной корреляции между накоплением вторичных метаболитов и степенью дифференцировки в культурах клеток подтверждают это. В связи с этим в последнее время усилился интерес к иммобилизованным клеткам.

Иммобилизация (создание неподвижности) клеток обеспечивает условия, приводящие к дифференциации, и способствует увеличению выхода вторичных веществ. Метод иммобилизации позволяет клеткам расти в тесном физическом контакте друг с другом. Когда клетки контактируют между собой, в их массе, как в интактном организме, устанавливаются определенные химические и физические градиенты, регулирующие метаболизм и процессы дифференциации. Это градиенты регуляторов роста, питательных веществ, кислорода, углекислоты.

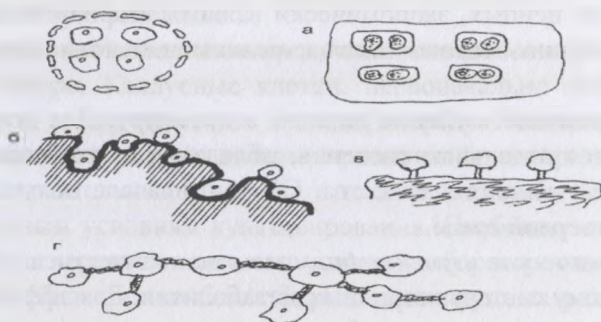
Клетки могут быть иммобилизованы 4 способами:

- 1) иммобилизация в инертном субстрате, т. е. обволакивание клеток одной из различных цементирующих сред (альгинат, агар, полиакриламид, коллаген или комбинация гелей);
- 2) адсорбция клеток на инертный субстрат;
- 3) адсорбция клеток на инертный субстрат с помощью биологических макромолекул (лектины);
- 4) ковалентное связывание клеток с каким-либо инертным субстратом типа карбоксиметилцеллюлозы (рис.4).

Чаще применяются первые два способа. Клетки, прикрепленные к биологически инертному субстрату, сохраняют жизнеспособность. Вокруг физически неподвижных иммобилизован-

ных клеток могут циркулировать большие объемы питательной среды, регулируя состав которой, замедляют рост клеток и тем самым повышают выход вторичных продуктов.

Поскольку клетки в иммобилизованном виде культивируются длительное время, то для этого используются клетки, которые сами, естественным путем, секретируют необходимые метаболиты в питательную среду или могут быть индуцированы к такой секреции какими-либо приемами, например, воздействием низких температур и растворителей. Клетки, которые накапливают искомый продукт внутри, например, в вакуолях или пластидах, непригодны для иммобилизации. Извлечение продукта из омывающего клетки раствора – тоже нелегкая проблема с точки зрения экономичности производства.



а – погружение клеток в инертный субстрат; б – прикрепление клеток путем адсорбции в инертный субстрат; в – связывание клеток с помощью биомакромолекул; г – присоединение клеток путем ковалентных связей.

Рисунок 4. Способы иммобилизации клеток растений

Иммобилизованные клетки могут быть использованы не только для синтеза, но и для биотрансформации различных соединений.

Итак, следует подчеркнуть те преимущества, которые имеют иммобилизованные клетки по сравнению с суспензионными культурами:

- многократное использование биомассы путем сохранения клеток в биореакторе и выделения продукта из среды;
- физическое отделение клеток от среды;
- культивирование большого количества биомассы в сосудах небольшого объема;
- длительность культивирования;
- возможность эффективной биотрансформации веществ.

Этапы технологии получения вторичных веществ растительного происхождения

1. *Экономически обоснованный выбор объекта.* Растения, выбранные для введения в культуру, должны содержать значительное количество ценных, экономически важных вторичных соединений. Особенно это относится к редким и исчезающим видам растений.

2. *Первичное введение тканей в культуру.* Для этих целей отбираются отдельные растения, обладающие наибольшим содержанием искомого вещества. Обычно вначале получают каллусы на твердой среде.

3. *Химическое изучение биомассы* по количественному и качественному составу вторичных метаболитов. Для эффективного химического контроля за биомассой нужны экспресс-методы оценки веществ. Определение очень низких концентраций метаболитов в медленно растущих клетках представляет большую трудность. Поэтому в качестве экспресс-методов оценки каллусных культур в последнее время применяют радиоиммунохимический и иммуноферментный методы. Последний имеет преимущества благодаря более высокой скорости проведения анализов и возможности их автоматизации.

4. *Оптимизация сред и параметров выращивания.* Для реализации генетической информации, относящейся ко вторичному обмену, требуются специфические условия. Поскольку нет твердой уверенности в том, что используемые питательные среды

полностью отвечают потребностям клеток, в каждом конкретном случае приходится подбирать среду и другие факторы, опираясь на опыт других исследователей. Эта работа еще более усложняется при переводе культуры в жидкую среду, так как при этом следует учитывать влияние факторов аэрации и перемешивания.

5. Создание продуктивных штаммов клеток. Получение гомогенной популяции клеток с высоким содержанием тех или иных вторичных веществ – сложная задача, так как популяции длительно культивируемых клеток, даже полученные клонированием одной высокопродуктивной клетки, могут терять способность к синтезу ценного соединения. Для поддержания на высоком уровне способности клеток к видоспецифическим биосинтезам, помимо оптимизации условий выращивания, требуются значительные усилия, включая генетические манипуляции с ними и клеточную селекцию.

6. Первичное использование лучших штаммов в суспензионной культуре. Каллусные клетки, первоначально полученные на твердой среде, переводят в жидкую среду. Изменение режима культивирования не должно приводить к потере штаммом своих положительных качеств, т. е. штамм должен быть устойчив к стрессовым условиям культивирования. Особенно это касается момента переноса клеток из условий лабораторного эксперимента в небольших колбах в ферментеры крупных размеров. В биотехнологических производствах центральная роль принадлежит ферментерам с автоматической регуляцией различных факторов (температуры, газового состава, освещенности, кислотности, содержания физиологически активных веществ) на любом этапе развития культуры.

7. Выращивание продуктивного и устойчивого штамма в условиях, приближающихся к производственным, в ферментерах с последовательным увеличением их емкости. Если в этих полупромышленных условиях культивируемые клетки сохраняют высокие скорости роста и биосинтеза искомого вещества, накапливают его без деградации и в значительных количествах выделяют в среду, то такой штамм пригоден для организации

крупнопромышленного производства. Важным качеством штамма является его генетическая стабильность,

8. *Составление технического регламента на производство* биомассы и ее оценка. Производственная технология требует соответствующей аппаратуры, которой располагает, в частности, Япония. Так, в 20000-литровом ферментере в непрерывной культуре в течение трех месяцев выращивались клетки табака, продуцировавшие убихинон с продуктивностью по биомассе 5,582 г/л в день.

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

Вопросы для контроля:

1. Назовите основные классы соединений, относящихся к экономически важным метаболитам культивируемых клеток.
2. Какими преимуществами обладают культивируемые клетки по сравнению с растительным сырьем?
3. Какие факторы влияют на накопление вторичных метаболитов в культивируемых клетках?
4. Какие особенности растительных клеток затрудняют биотехнологическое производство?
5. Что такое иммобилизованные клетки и как их получают?
6. Каковы преимущества иммобилизованных клеток по сравнению с суспензионной культурой?
7. Назовите этапы разработки клеточных технологий.
8. Как создаются продуктивные линии клеток?

3.1 Тестовые и практические задания к главе 3 «Биологически активные вещества и биотехнологии для получения продуктов растительного происхождения»

1. Способы иммобилизации клеток (укажите неверный ответ)

- А) Обволакивание клеток инертным субстратом;
- В) Адсорбция клеток на инертный субстрат;
- С) Адсорбция клеток на инертный субстрат с помощью биологических макромолекул;
- Д) Адсорбция клеток на стенках сосуда с помощью клея;
- Е) Ковалентное связывание клеток с инертным субстратом;
- Ф) Адгезия клеток с помощью ПААГ;
- Г) Связывание клеток с субстратом с помощью ионной связи;
- Н) Обволакивание клеток инертным гелем.

2. Этапы работы по получению вторичных метаболитов (укажите неверный ответ)

- А) Химический анализ клеток;
- В) Введение клеток в культуру *in vitro*;
- С) Применение ингибиторов роста клеток;
- Д) Оптимизация условий культивирования;
- Е) Получение высокопродуктивных линий клеток;
- Ф) Получение низкопродуктивных линий клеток;
- Г) Создание селективных условий;
- Н) Введение в питательную среду предшественников синтеза вторичных метаболитов.

3. К вторичным метаболитам растительного происхождения относятся:

- А) моносахариды;
- В) алкалоиды;
- С) гликозид;
- Д) эфирные масла;
- Е) ДНК;
- Ф) РНК;
- Г) аминокислоты;
- Н) нуклеотиды.

4. Иммобилизованные ферменты должны соответствовать следующим требованиям:

- А) химически высокоустойчивые;
- В) обладать высокой биологической активностью;

- С) способны легко отделяться от реакционной среды;
- Д) высокогидрофобны;
- Е) высоколипофильны;
- Ф) не должны связываться с субстратом;
- Г) обладать низкой биоактивностью;
- Н) независимы от рН питательной среды.

5. Преимущества иммобилизованных ферментов (по сравнению со свободными нативными ферментами):

- А) возможность регулирования скорости катализируемой реакции;
- В) возможность непрерывного проведения биохимических процессов в биотехнологических системах, т.к. ферментные препараты можно использовать многократно;
- С) трудно отделяется от реакционной среды;
- Д) возможность остановки реакции в любое время и отделение конечного продукта от катализатора и примесей;
- Е) возможность однократного применения ферментативного препарата;
- Ф) химически неустойчив;
- Г) низкая биологическая активность;
- Н) обладает высокой гидрофобностью.

6. Факторы, влияющие на накопление вторичных метаболитов:

- А) высокая плотность клеток в суспензии;
- В) рост клеток;
- С) количество O_2 ;
- Д) оптимальная для роста клеток температура;
- Е) низкая скорость оборотов в биореакторе;
- Ф) режим стерилизации;
- Г) количество воды в составе питательной среды;
- Н) накопление пены в верхней части культурального сосуда.

7. В каких целях используют иммобилизованные клетки?

- А) получение конечного продукта в больших количествах;
- В) длительное культивирование клеток;
- С) долговременное использование клеточной биомассы;
- Д) в целях гибридизации клеток;
- Е) для индуцирования денатурации;
- Ф) для ингибирования роста клеток;
- Г) для увеличения плотности клеток;
- Н) для предотвращения витрификации.

8. Вещества, не выделяемые из культивируемых растительных клеток:

- А) пигменты;
- В) гликозиды;
- С) эфирные масла;
- Д) витамины;
- Е) алкалоиды;
- Ф) интерфероны;
- Г) интерлейкины;
- Н) цитокины.

9. Имобилизованные клетки – это:

- А) интенсивно делящиеся клетки;
- В) неподвижные клетки;
- С) клетки, возникшие в результате беспорядочного деления;
- Д) клетки, возникшие в результате деления одной клетки;
- Е) клетки, способные воспринимать индуцирующие сигналы;

10. Какому термину соответствует следующее определение: «Процесс биологического превращения (биосинтез веществ с участием ферментов клеток) одних веществ в другие сложные экономически ценные вещества?»

- А) биоремедиация;
- В) генная трансформация;
- С) биотрансформация;
- Д) биоконверсия;
- Е) фиторемедиация.

11. Что означает биотрансформация *in vitro*?

- А) процесс переноса чужеродных генов;
- В) процесс получения ценных биологически активных веществ из дешевых источников (простых веществ);
- С) утилизация продуктов – отходов производства;
- Д) регенерация поврежденных клеток и тканей, восстановление утраченных органов;
- Е) все ответы правильные.

12. Какому термину соответствует определение: «Белок, поверхностно связанный с природным или синтетическим субстратом либо в целях ограничения подвижности погруженный в полимерный гель?»

- А) иммобилизованные ферменты;

- В) гистонные белки в хромосоме;
- С) денатурированные белки;
- Д) коферменты;
- Е) все ответы правильные.

13. Какие особенности растительных клеток затрудняют биотехнологическое производство? (укажите неверный ответ)

- А) адгезия клеток;
- В) различные размеры клеток;
- С) быстрое деление клеток;
- Д) крупная вакуоль;
- Е) образование пены в верхней части культурального сосуда.

14. Этапы технологии получения вторичных метаболитов (укажите неверный ответ):

- А) физический анализ клеток;
- В) введение клеток в культуру *in vitro*;
- С) получение высокопродуктивных линий клеток;
- Д) применение ингибиторов роста клеток;
- Е) оптимизация условий культивирования клеток.

15. Преимущества использования клеточных технологий (укажите неверный ответ)

- А) независимость от влияния климатических факторов;
- В) высокорентабельное производство всех вторичных метаболитов растений;
- С) возможность получения принципиально нового продукта;
- Д) получение экологически нечистого продукта;
- Е) экономия посевных площадей.

16. Отметьте витамины, синтезируемые в растительных клетках:

- А) Феруловая кислота, лимонная кислота;
- В) Аскорбиновая кислота, яблочная кислота;
- С) Тиамин-НСI, аскорбиновая кислота;
- Д) Пиридоксин-НСI, кетоглутаровая кислота;
- Е) Щавелевоуксусная кислота, никотиновая кислота.

17. Отметьте витамины, входящие в состав питательной среды:

- А) Аскорбиновая кислота, молочная кислота;
- В) Стеариновая кислота, тиамин-НСI;
- С) Фолиевая кислота, никотиновая кислота;

- D) Пальмитиновая кислота, никотиновая кислота;
- E) Олеиновая кислота, фолиевая кислота.

18. Отметьте витамины, входящие в состав питательной среды:

- A) Оксалоацетат, пируват;
- B) Хелат железа, пантотенат кальция;
- C) Тиамин, пиридоксин гидрохлорид;
- D) Аскорбиновая кислота, аспарат;
- E) Фолиевая кислота, фосфоенолпируват.

19. Отметьте витамины, синтезируемые в растительных клетках:

- A) Тиамин, фосфоглицерат;
- B) Кетоглутарат, пантотенат кальция;
- C) Рибофлавин, цистеин;
- D) Пурин, цитозин;
- E) Никотиновая кислота, аскорбиновая кислота.

20. Что означает термин «суспензионное культивирование»?

- A) глубинное культивирование одиночных клеток и мелких клеточных агрегатов в перемешиваемой жидкой среде;
- B) поверхностное культивирование клеток на твердой среде;
- C) культивирование клеток в микрокамере;
- D) культивирование клеток в микрокапле;
- E) культивирование клеток с использованием «культуры-няньки».

21. Какие признаки используются для характеристики суспензионных культур?

- A) Жизнеспособность, степень агрегированности и скорость роста;
- B) Размеры и морфология;
- C) Цитогенетическая гетерогенность клеток;
- D) Тотипотентность клеток;
- E) Форма клеток.

22. Какой показатель используют для определения скорости роста суспензионной культуры?

- A) Плотность клеточной культуры;
- B) Жизнеспособность культуры;
- C) Степень агрегированности суспензионной культуры;
- D) Тотипотентность;
- E) Поглощение клетками молекул витальных красителей.

23. Плотность суспензионной культуры – это:

- A) Сырая масса клеток в 100 мл суспензии;
- B) Количество клеток в 1 мл суспензии;
- C) Сухая масса клеток в 100 мл суспензии;
- D) Скорость оседания отдельных клеток на дно пробирки;
- E) Интенсивность света после прохождения через слой суспензии толщиной 1 см.

24. Как определяют жизнеспособность клеток в суспензионной культуре?

- A) Окрашиванием клеток ацетокармином после их предварительной мацерации и фиксации;
- B) Подсчётом живых клеток под микроскопом после предварительного окрашивания бромидом этидия;
- C) Подсчётом окрашенных раствором йода клеток;
- D) Окрашиванием клеток витальными красителями;
- E) Воздействием на клетки метилоранжем.

25. Что такое «привыкшие» ткани?

- A) Опухолевые ткани, появляющиеся на месте внедрения *Agrobacterium tumefaciens*;
- B) Ткани, способные расти на среде, лишенной органогенных элементов;
- C) Культура корней, растущая на жидкой питательной среде;
- D) Каллусные культуры, способные расти на питательной среде, лишенной фитогормонов;
- E) Каллусные ткани, способные расти на питательной среде, лишенной микроэлементов.

3.2 Практические задания и задачи к главе 3 «Биологически активные вещества и биотехнологии для получения продуктов растительного происхождения»

Задание 1

По какой формуле рассчитывают прирост сырой биомассы каллусной ткани растений? Рассчитайте прирост сырой биомассы каллусной ткани, если известно, что сырой вес каллуса моркови, пассируемого и культивируемого в течение одного месяца составлял 2400 мг, при этом начальный вес сырой каллусной ткани моркови составлял 200 мг, в пос-

ледующие 7, 10, 14, 18, 21, 25 дней культивирования вес каллуса был равен 650 мг, 840 мг, 1050 мг, 1 630 мг, 1960 мг, 2100 мг, соответственно.

Задание 2

Расчитайте плотность в хорошо растущей каллусной суспензионной культуре картофеля.

В камере Фукса-Розенталя (камере Горяева) был произведен подсчет количества клеток, т.е. из колбы был взят инокулят объемом 10 мл, затем 1 мл суспензии был перемешан с 2 мл 8% раствора оксида хрома (для дезагрегирования крупных клеточных агрегатов). После инкубации смеси в термостате, было подсчитано количество клеток, которое составило в среднем – 576 клеток.

Задание 3

Сколько граммов хлорида натрия растворится в 2 л воды при температуре 25°C? Коэффициент растворимости соли $a^{25} = 360$ г/л.

Задание 4

Определите прирост сырой каллусной биомассы пшеницы, если известно, что начальная сырая биомасса составляла 0,550 грамм, а после 14 дней культивирования сырая масса каллуса увеличилась до 2,374 граммов.

Задание 5

Определите плотность суспензии табака если известно, что степень разведения суспензии равна 10, а среднее количество клеток, подсчитанных в камере Горяева составляло 493.

Глава 4

ТЕХНОЛОГИЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ И ОЗДОРОВЛЕНИЯ РАСТЕНИЙ

Способность отдельных клеток восстановить целый организм, обладающий всеми признаками исходного растения, успешно используется для клонального размножения.

Клон (от греч. *clon* – отпрыск, ветвь) – растение, полученное путем бесполого, т. е. вегетативного размножения. Клоны идентичны материнскому растению и между собой. **Клональное микроразмножение** – это массовое бесполое размножение в культуре тканей и клеток, при котором возникшие растения генетически идентичны исходному экземпляру.

Клональное микроразмножение имеет ряд преимуществ по сравнению с обычными методами вегетативного размножения:

1. Высокий коэффициент размножения. Так, из одного растения герберы, земляники, хризантемы, розы при размножении их посредством культуры тканей можно получить в год свыше 1 млн. растений. Из одной почки яблони за 8 месяцев культуры можно получить до 60 тыс. побегов. При культивировании меристемы куста малины *in vitro* удастся получить до 50 тыс. растений в год. Культура меристемы персикового миндаля, который служит подвоем для прививок и с большим трудом размножается при использовании традиционных методов, позволяет получить 1 млн. растений в год.

2. Одновременно с микроразмножением происходит оздоровление растения от вирусов и патогенных микроорганизмов.

3. Ускорение селекционного процесса. Сроки получения товарной продукции новых сортов сокращаются до 2-3 лет вместо 10-12.

4. Методом культуры тканей возможно размножение растений, которые с трудом или совсем не размножаются вегетативно, например пальмы. Так, методом клонального микроразмножения в промышленных масштабах размножается масличная пальма.

5. Экономичность. При микроразмножении экономятся площади теплиц.

6. Получение молодых растений (омоложение старых особей).

7. Можно поддерживать рост круглый год, что важно для растений, имеющих в цикле развития периоды покоя.

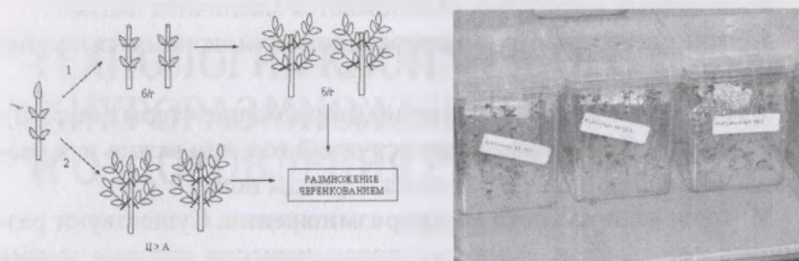
Методы клонального микроразмножения. Существуют различные методы клонального микроразмножения, которые разные авторы классифицируют в зависимости от характера морфогенетических процессов, реализуемых эксплантами в культуре тканей. Н.В. Катаева и Р.Г. Бутенко предлагают принципиально новую классификацию методов, которая отличается от других тем, что в ее основу положены различия между растениями, образовавшимися в культуре из предсуществовавших и вновь возникших инициалей.

Первый тип растений получается в результате активации существовавших в интактном растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля). Эти растения, возникшие из меристем, генетически полностью идентичны родительским формам, так как апексы в условиях культуры в большинстве случаев генетически стабильны.

Второй тип растений получается в результате индукции возникновения почек или эмбриоидов. Эти растения, полученные из специализированных каллусных клеток, характеризующихся генетической изменчивостью в культуре, могут несколько отличаться от родительских. Таким образом, этот метод можно применять только к тем растениям, у которых каллус отличается генетической стабильностью или вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости.

Почки или эмбриоиды могут возникать: 1) непосредственно из специализированных тканей экспланта (тканей репродуктивных

органов, эпидермиса, субэпидермальных тканей, мезофилла листа и т. д.); 2) из первичного каллуса, образованного клетками экспланта; 3) из пересадочной каллусной ткани или клеток, растущих в суспензионной культуре (рис. 5).



Обозначения: б/г – безгормональная среда, Ц – цитокинины, А – ауксины
1 – индукция развития пазушных меристем; 2 – активация уже существующих меристем.

Рисунок 5. Методы клонального микроразмножения

Индукция развития пазушных меристем. Активация роста пазушных почек и использование пазушных побегов – наиболее распространенный способ микроразмножения растения. На целом растении рост пазушных почек тормозится (апикальное доминирование). Рост пазушных меристем стимулируется удалением верхушки стебля, либо обработкой цитокининами. Введение в питательную среду цитокининов пробуждает боковые почки и индуцирует развитие многочисленных пазушных побегов. Образуется быстро растущий пучок побегов, который можно разделить на более мелкие пучки с общей корневой системой или на отдельные побеги, способные образовывать при выращивании на свежей среде такие же пучки побегов. Избыточное количество ауксина в среде может индуцировать развитие каллуса. Каллус подавляет рост меристематической ткани или способствует развитию добавочных стеблевых апексов, генетически отличающихся от ис-

ходного растения. В таких случаях исключают ауксин из среды или сводят его содержание к минимуму.

Таким образом, культивируя ткани стебля с пазушными почками на питательной среде, можно получить нормальный побег, который, будучи перенесен на среду для укоренения, даст целое растение. Для ускорения размножения первый побег после формирования 5-7 листьев можно расчеренковать так, чтобы каждый черенок был высотой 1-1,5 см и имел один лист и посадить в пробирки с аналогичной питательной средой. Метод микрочеренкования разработан для винограда, картофеля и других культур. Показано, что большое число циклов размножения без укоренения нежелательно, следует чередовать два-три цикла размножения с циклом укоренения.

Методом индукции пазушных почек в культуре ткани размножают плодово-ягодные и декоративные культуры, капусту, картофель и многие другие. Следует подчеркнуть, что микроразмножение путем индукции пролиферации меристем гарантирует максимальную генетическую однородность растений-регенерантов. Организованные меристемы генетически наиболее стабильны, и побеги, развивающиеся из них, обладают значительной генетической устойчивостью.

Образование придаточных побегов непосредственно из культивируемых эксплантов. У многих растений наблюдается возникновение побегов непосредственно из специализированных тканей экспланта. Отдельные клетки изолированных из растений тканей могут дедифференцироваться из-за нарушения корреляционных взаимоотношений и образовывать меристематические очаги, в которых затем закладываются стеблевые почки. Укоренение таких адвентивных побегов ведет к образованию целых растений.

Этот метод регенерации растений особенно пригоден для травянистых растений при использовании листьев, луковиц, клубне-луковиц, стеблей, корневищ и клубней. Эксплант помещают на питательную среду, содержащую небольшие количества ауксинов и цитокининов. Образующийся пучок побегов расщепляют и высаживают в отдельные сосуды для получения такого же пучка

побегов. Многие виды луковичных растений в природе размножаются очень медленно. Метод культуры тканей позволяет значительно увеличить коэффициент их размножения путем индуцирования придаточных побегов из различных тканей луковицы. Используя очень маленькие экспланты, из одной луковицы можно получить множество однородных растений-регенерантов (рис. 6). Таким способом в культуре тканей размножают фиалку, фрезью, амариллис, лилию, петунию, цикорий, каланхое, цикламены и др.

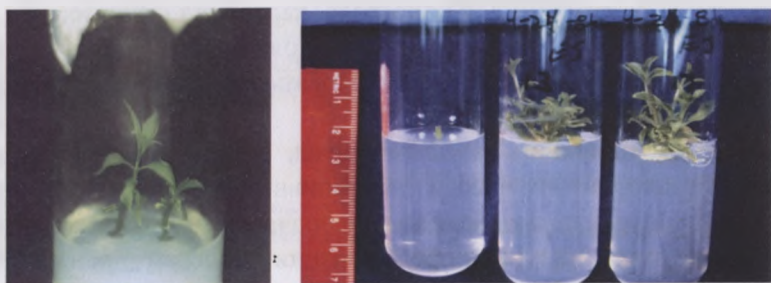


Рисунок 6. Микрочеренкование растений-регенерантов.

Регенерация растений из каллуса. Другим распространенным методом микроразмножения является индукция органогеनेза или соматического эмбриогенеза в недифференцированной каллусной ткани или суспензионной культуре клеток. Переход к морфогенезу контролируется соотношением фитогормонов в питательной среде. К сожалению, закономерность, установленная Скугом и Миллером, не всегда распространяется на такие важнейшие сельскохозяйственные культуры, как зерновые и бобовые, и некоторые другие растения. Следовательно, выявляется влияние генотипа на регенерационную активность каллуса. На морфогенетический потенциал каллусной ткани оказывают влияние и другие факторы: возраст и физиологическое состояние растения, из которого изолирован эксплант, происхождение экспланта, возраст каллусной ткани и условия ее культивирования. При благо-

приятных условиях каллус начинает активно делиться, формирует меристематические очаги и дает начало либо почке, либо эмбриоиду. Укорененный побег, развившийся из почки, может быть подвергнут микрочеренкованию, что значительно повышает коэффициент размножения. Укорененный побег – обязательное условие регенерации целого растения.

Генетическая стабильность растений-регенерантов, полученных из каллусов путем образования эмбриоидов и органогенеза, вызывает сомнения. По мере культивирования каллусов в них возрастает число полиплоидных, анеуплоидных и других генетически абберантных клеток и, следовательно, вероятность образования из каллуса растений, отличающихся от исходной родительской формы. Поэтому при микроразмножении растений период неорганизованного роста каллуса должен быть как можно короче. Лучше использовать первичный каллус. Кроме того, при длительном культивировании каллусные ткани постепенно утрачивают способность к морфогенезу. Особенно быстро теряет способность к органогенезу каллусная ткань злаковых растений, тогда как у каллуса табака она сохраняется годами.

В настоящее время для микроразмножения растений в производственных масштабах регенерация растений из соматических зародышей используется мало, ограничиваясь представителями семейства орхидных и рутовых, в частности цитрусовых, а также гвинейской, или масличной пальмы. Хорошие результаты по размножению ячменно-ржаных и ячменно-пшеничных гибридов были достигнуты также через каллусогенез. Получен ряд интересных гибридных форм ячменя, которые рассматриваются как исходный материал для селекции. Однако трудность работы с гибридами ячменя связана с тем, что завязываемость семян очень низка и в результате выращенные из этих семян гибридные растения единичны, стерильны и не всегда клонируются обычным способом. Тогда как каллусная ткань, возникающая в культуре молодых колосьев, отличается высокой тотипотентностью и при периодическом пассировании сохраняет способность к регенерации до года. Регенеранты, достигшие колошения,

содержали число хромосом, характерное для родительских гибридов, т.е. были идентичны им. Таким образом, культура каллусной ткани, полученная из меристематических тканей соцветий, может быть использована для клонального размножения гибридов злаков. Кроме того, у злаков регенеранты из эмбриоидов, как правило, генетически стабильны, что очень важно при клональном размножении. Таким образом, оба способа регенерации растений из недифференцированных клеток каллуса – путем образования эмбриоидов и органогенеза – являются эффективными и в ряде случаев единственно возможными способами микроразмножения растений.

Есть еще один аспект использования эмбриоидов для размножения растений. Это так называемые искусственные семена. *Искусственными семенами* называют эмбриоиды одинаковой стадии развития, заключенные в полимерную оболочку. Однако на практике синхронизировать развитие эмбриоидов сложно. Для получения однородных по размеру и плотности эмбриоидов можно фильтровать их через сита с определенными порами или разделять в градиенте плотности сахарозы. Сейчас разработаны лабораторные методы массового получения эмбриоидов одинаковой, строго определенной стадии развития у моркови, люцерны, пшеницы, риса, сельдерея. Но для того, чтобы они служили семенами, их надо заключить в оболочку, способную защитить от всех неблагоприятных воздействий и сохранить жизнеспособность длительное время. Кроме того, эта оболочка должна удерживать воду и обеспечивать поддержание стерильности внутри капсулы в начале прорастания эмбриоида. Целесообразно в капсулу заключить также питательные вещества для начального развития соматического эмбриоида, например углеводы и минеральные соли. Пока подобные «семена» получают в лабораторных условиях в небольших количествах и применяют их для научно-исследовательской и селекционной работы. Биотехнология должна обеспечить массовое их производство.

Оценивая методы клонального микроразмножения, следует обратить особое внимание на то, что растения-регенеранты, воз-

никшие из меристемы, обеспечивающей им генетическую идентичность родительским формам, принципиально отличаются от растений, образовавшихся из специализированных и каллусных клеток. У последних всегда имеется возможность мутаций генома. Таким образом, наиболее надежным для получения генетически однородных проростков считается размножение пазушными побегами, хотя это и занимает больше времени.

Этапы технологии клонального микроразмножения растений

I этап. Введение экспланта в культуру. На этом этапе необходимо получить свободную от инфекции культуру, добиться выживания ее на питательной среде и быстрого роста экспланта. Успех зависит от правильного выбора экспланта с учетом условий выращивания и фазы развития донорного растения.

II этап. Собственно микроразмножение. Образование побегов и увеличение их числа.

III этап. Укоренение размноженных побегов и их хранение (депонирование). Необходимо обеспечить развитие нормальной корневой системы. Для этого в питательную среду добавляют ризогенный фактор – ауксины. После появления корней растения либо подготавливают к высадке в почву, либо помещают на хранение при пониженных температурах (депонирование). Это задерживает развитие растений и позволяет сохранить их длительное время, используя затем по мере надобности.

IV этап. Высадка растений в почву. Растения подготавливают к высадке в грунт, повышая влажность воздуха и увеличивая интенсивность освещения. Растения с гетеротрофного питания переходят на автотрофное. Это очень важный этап, который требует тщательности и обеспечивает успех всей работы, вместе с тем именно здесь бывают большие потери.

Факторы, влияющие на процесс клонального микроразмножения растений:

Генотип растения во многом определяет успех работы по микроразмножению, так как скорость регенерации растений *in vitro* зависит от вида. Так, двудольные травянистые растения

обладают более выраженной способностью к регенерации, чем однодольные и древесные растения. Для каждого вида растения подбирается наиболее эффективный метод регенерации. Растения, из которых изолируют экспланты, должны быть здоровыми, их выращивают в теплицах при невысокой влажности воздуха, с ограниченным поливом, избегая забрызгивания листьев. Лучше всего изолировать экспланты из асептических проростков, выращенных в стерильных сосудах.

Выбор экспланта играет очень важную роль. Лучше всего использовать меристематически активные ткани и органы: верхушки побегов, пазушные почки, меристемы. Они хорошо выживают в культуре, обладают высокой скоростью роста и тотипотентностью.

В принципе, любой вид растения при использовании определенных приемов может быть регенерирован из каллусной ткани. Чем моложе растение-источник экспланта, тем выше регенерационная способность каллуса, полученного из него. Наибольший морфогенетический потенциал наблюдается у каллусной ткани, сформировавшейся из экспланта, выделенного из растений ювенильного возраста, т.е. проростков. *Физиологический возраст экспланта* сказывается не только на скорости развития, но и на его морфогенетической реакции, в смысле реализации возможного пути морфогенеза *in vitro*. Орган, из которого изолируется эксплант, тоже имеет немаловажное значение для микроразмножения растений. Морфогенная способность экспланта зависит также от его *размеров*. Чем меньше эксплант, тем слабее проявляется в каллусе способность к органогенезу. Чем крупнее эксплант, тем выше генетическая стабильность, но, зато возрастает возможность сохранения в его клетках вирусов.

Важное значение для микроразмножения растений имеет *питательная среда*, состав которой для каждого вида определяется эмпирически. Среда Мурасиге и Скуга, наиболее часто используемая для микроразмножения, благоприятна для индукции и роста каллуса, то есть подходит в основном для первого этапа работы. Развитие каллуса нежелательно при размножении рас-

тений путем пролиферации почек, поэтому для этого метода лучше подходят среды в меньшей степени поддерживающие рост каллуса.

Очень ответственным является последний этап работы – пересадка растений в грунт. Иногда укорененные растения пересаживают на жидкую питательную среду для лучшего образования корневых волосков. Через неделю их высаживают в автоклавированную почвенную смесь и накрывают стеклянными сосудами для поддержания высокой влажности, которые снимают через 7-10 дней. Если позволяют условия, то высаженные из пробирок растения первое время выращивают в камерах с повышенной влажностью. Но не для всех культур описанные процедуры являются обязательными. Растения картофеля, земляники, малины, смородины, яблони, вишни, сирени и др. вполне удовлетворительно переносят пересадку из пробирок в стерильный (и даже нестерильный) субстрат, состоящий из смеси почвы, торфа и песка, и выращивание в условиях теплицы.

Из физических факторов наиболее важными являются *свет и температура*. Для процессов морфогенеза не требуется интенсивного освещения: 1000-3000 лк с фотопериодом 14-16 часов. Когда растения подготавливают к пересадке в почву, их освещают светом до 10000 лк, так они проходят адаптацию к свету. Оптимальная температура для большинства растений примерно равна 25°C. Однако следует учитывать температурные требования, характерные для данного вида растений в природе.

Очень важное значение для получения *in vitro* полноценных растений имеет *водный режим*. С нарушением водного обмена растений связано такое явление, как **витрификация**, также называемое «стекловидность», «впитывание». У растений клетки разбухают, утолщаются стебли, удлиняются и искривляются листья, они становятся прозрачными. Эти морфологические изменения сопровождаются снижением сухой массы листьев, уменьшением содержания белка, хлорофилла, целлюлозы, лигнина и увеличением содержания калия. В листьях увеличивается водное пространство и снижается газовое свободное пространство. Посте-

пенно витрифицированные растения погибают. Особенно часто витрификация наблюдается у растений, культивируемых на жидкой среде. Х. Геринг с сотрудниками показали, что, если снизить относительную влажность воздуха в культуральных сосудах, у растений восстанавливается транспирация и сильно уменьшается витрификация.

Таким образом, эффективность клонального микроразмножения растений может ограничиваться различными факторами, отрицательное влияние которых можно снизить путем совершенствования метода.

Метод клонального микроразмножения имеет большие преимущества, вместе с тем он является трудоемкой и дорогостоящей процедурой, поэтому в настоящее время его применение в промышленных масштабах ограничено. Метод в основном используется для растений, с трудом размножаемых обычными методами, а также для решения задач, связанных с селекцией или с фундаментальными исследованиями, а именно:

1. Быстрое эффективное размножение отдельных генотипов или новых перспективных сортов.
2. Получение и эффективное размножение линий для производства гетерозисных гибридных семян.
3. Размножение ценных элитных растений с целью получения генетически идентичного потомства, например единичных гаплоидных растений или сконструированных методами клеточной и генной инженерии.
4. Быстрое получение и дальнейшее размножение свободного от вирусов и патогенных микроорганизмов посадочного материала плодовоовощных, полевых и декоративных культур.
5. Сохранение редких и исчезающих видов растений. Так, академик И.Р. Рахимбаев с сотрудниками разработали приемы вегетативного размножения редких видов шафрана, унгернии, иксилириона, луков, а также лилии, гладиолуса, гиппеаструма, нарцисса. Это способствует сохранению и воспроизводству фонда редких и исчезающих видов и позволяет быстро размножить уникальные сорта декоративных растений.

6. Размножение ценных культурных и дикорастущих пород с низким коэффициентом размножения, семенное потомство которых расщепляется, а вегетативное размножение обычными способами происходит очень медленно (хвойные) или вообще невозможно (пальма). Разведение и селекция древесных видов растений осуществляется медленно вследствие длительности процесса полового размножения. Кроме того, существует много экономически важных видов деревьев, являющихся стерильными, для которых улучшение признаков не может быть получено обычными методами селекции. Однодольные пальмы и некоторые породы лесных деревьев не поддаются вегетативному размножению.

7. Метод клонального размножения может быть также применен для массового получения «искусственных семян». Кстати, именно эмбриониды, получаемые в суспензионной культуре, могут оказаться более удобными при автоматизации процессов микроразмножения, чем культивируемые побеги или регенеранты.

Многие полезные растения настолько инфицированы вирусными, бактериальными и грибными болезнями, что это приводит ежегодно к резкому снижению урожая и ухудшению качества продукции. Клональное микроразмножение растений, осуществляемое стерильными эксплантами в асептических условиях, приводит к оздоровлению от бактериальных и грибных патогенов, однако от вирусной инфекции поверхностной стерилизацией материала освободиться нельзя. Борьба с вирусными болезнями привычными химическими методами невозможно, так как жизнедеятельность вирусов тесно связана с метаболизмом клетки растения-хозяина.

Культура апикальной меристемы. Основной путь борьбы с вирусными болезнями – получение здорового посадочного материала. В последнее время для получения безвирусных растений картофеля и многих других вегетативно размножаемых культур успешно применяется метод культуры апикальных меристем в сочетании с термообработкой, хемотерапией и тестированием на наличие вирусов. Нет единого мнения о причинах слабой

репродукции вирусов в меристемных тканях. При тепловой обработке размножение вирусов в развивающейся верхушке побегов так сильно тормозится, что при дифференциации меристемы возможно появление клеток, свободных от вирусов. Для успеха тепловой обработки необходимо выдерживать донорные растения при высокой температуре (34-40°C) в оптимальном для роста состоянии как можно дольше, чтобы получить прирост, свободный от вирусов. Однако не все растения выдерживают длительную тепловую обработку, что приводит к отставанию в росте и другим нарушениям у меристемных растений. У полевых и плодо-овощных культур оздоровление проводится при комплексном применении термообработки, культуры меристемы и отбора на основе вирусных тестов.

Диагностика заражения растений. Поскольку не всегда удается получать безвирусный материал тепловой обработкой и культурой меристемы, важное место в этой работе принадлежит эффективному тестированию. Применяются разные методы оценки на наличие вирусов: растения-индикаторы, серологические методы, электронно-микроскопический и иммуноферментный анализ.

В основе *метода растений-индикаторов* лежит способность растений отдельных видов отвечать специфической реакцией при нанесении на них сока из тканей большого растения. Это трудоемкий и длительный метод. Требуются специальные растения, условия и площади для их выращивания. Кроме того, чувствительность метода зависит от многих факторов, ответная реакция проявляется через длительное время.

То же самое можно сказать и в отношении трудоемкого и дорогостоящего *электронно-микроскопического* метода, который используется при фундаментальных исследованиях, например при контроле во время препаративного выделения вирусов, при первичной идентификации новых вирусных заболеваний.

В сельскохозяйственной практике обычно применяются *серологические методы*, основанные на реакции антигенов с антителами вне организма. При капельном методе серодиагностики капля неочищенного сока растения смешивается с каплей анти-

сыворотки на предметном стекле. Вирусные частицы, адсорбированные на клеточных органоидах, вовлекают их в серологическую реакцию, образуя заметный агглютинат. Однако этот метод обладает слабой чувствительностью и может применяться только для выявления вирусов, накапливающихся в листьях в высокой концентрации. Кроме того, у миниатюрных растений-регенерантов, полученных из апикальной меристемы, вирусы присутствуют в концентрациях, лежащих за пределами чувствительности серологического метода.

Наиболее чувствительным методом тестирования является *метод иммуноферментного анализа* в различных вариантах. Помимо высокой чувствительности и быстроты анализа, преимуществом метода является то, что для индикации требуется минимальное количество растительного материала из любых органов растений. ИФА метод основан на реакции преципитации – образования комплекса антиген-антитело, который можно количественно определить, если маркировать антитела с помощью флуоресцентных меток, радиоизотопами, ферментами, связывающимися с субстратом с образованием окрашиваемого продукта.

В настоящее время разработан неиммунологический метод диагностики вирусов на основе применения *молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот*. Если в исследуемом растительном материале ДНК-образец диагностируемого вируса комплементарно связывается с ДНК-зондом (ДНК-чипом), то это доказывает наличие вируса в растительном образце. Если же комплементарного взаимодействия не произошло, то это подтверждает предположение, что растительный материал не поражен вирусной инфекцией. Широкое внедрение системы безвирусного растениеводства в практику предполагает тестирование на зараженность разными вирусами миллионов растений различных культур, для этого требуются не только экспресс-методы диагностики, но и автоматические приборы для их проведения.

Получение безвирусного посадочного материала картофеля. Технология производства безвирусного картофеля начинается с термообработки клубней. По общепринятой гипотезе

размножение вирусов при температуре 34-40°C тормозится вследствие перестройки обмена веществ. Тепловая обработка может длиться от 7 дней до 7 недель в зависимости от типа вируса. Клубни также обрабатываются ингибиторами вирусов и стимуляторами роста растений. Для вычленения меристем используют этиолированные или светло-зеленые ростки длиной 3-5 см. После поверхностной стерилизации и промывки ростков в стерильном боксе из них вычлениают верхушечные меристемы.

Апексы, помещенные на агаризованную питательную среду, развиваются и образуют проростки длиной 0,3-0,5 см. Затем их пересаживают в свежую питательную среду для стимуляции корнеобразования и роста стебля. После появления 5-7 листьев эти растеньица расчеренковывают и каждый черенок сажают в пробирку с питательной средой того же состава. Один черенок используют для проверки на наличие вирусов. Здоровые растения становятся родоначальниками безвирусных линий. Ускорение размножения здоровых линий достигается методом последовательного микрочеренкования. Растения из черенков развиваются значительно быстрее, чем из меристемы, дают более сильную корневую систему и большее количество листьев. Метод черенкования растений в пробирках позволяет получить до 2-3 тыс. растений за 2-3 месяца. Далее эти миниатюрные растеньица (супер-суперэлита) либо депонируются, либо пересаживаются в почву теплиц (рис.7). В благоприятных условиях для оздоровления сорта в среднем достаточно вычленив 40 меристем и можно *in vitro* за 7-8 месяцев от них получить 30-40 тыс. клубней. Эффективность оздоровления в большей мере зависит от сортовых особенностей, исходной зараженности вирусами, сезонных влияний и т. д. Растения, размноженные в изолированных условиях – в теплице, являются суперэлитой и размножаются затем в суперэлитных маточниках. Полученные элитные растения размножаются в производственных питомниках, и полученные от них клубни (семенной материал) передаются в хозяйства для промышленного производства оздоровленного посадочного материала.

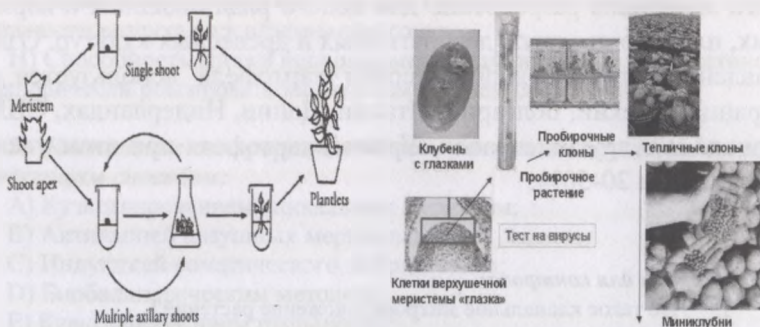


Рисунок 7. Схема получения безвирусного посадочного материала картофеля

Нужно учесть, что через 5-6 лет сорт вновь заражается и требуется новый, оздоровленный посадочный материал. В целях более эффективного использования меристемных растений разработана технология ускоренного размножения картофеля микроклубнями. Растения черенкуют, и черенки высаживают на среду, способствующую образованию клубней. Для стимуляции их образования растения подвергают воздействию низких температур ($10-15^{\circ}\text{C}$). При этом микроклубни зачастую образуются в пазухах листьев. Микроклубни лучше хранятся и очень удобны для последующего размножения, тогда как высаживание в грунт пробирочных растений сопровождается потерями.

Степень успеха в получении свободного от вирусов материала зависит от следующих предпосылок: 1) возможность термической обработки материала; 2) возможность культуры меристемы; 3) наличие отработанного теста с высокой точностью выявления вирусов; 4) высокий коэффициент разложения здорового растения; 5) организация размножения оздоровленного исходного материала в условиях полной изоляции, чтобы избежать повторного заражения; 6) объем культуры, который позволит обеспечить возможность ежегодного обновления исходного материала. Получение свободного от фитопатогенной инфекции посадоч-

ного материала разработано для целого ряда овощных и кормовых, плодово-ягодных, декоративных и древесных культур. Оздоровленный посадочный материал картофеля используется во Франции, Чехии, Болгарии, Италии, Дании, Нидерландах, США, Канаде и в других странах. Урожай картофеля при этом увеличивается на 20-50%.

Вопросы для контроля:

1. Что такое клональное микроразмножение растений?
2. Каковы преимущества клонального микроразмножения?
3. Какие морфогенетические процессы приводят к регенерации растений?
4. Почему индукция развития пазушных меристем считается более подходящей для клонального размножения?
5. Что такое «искусственные семена»?
6. Из каких этапов складывается работа по клональному микроразмножению растений?
7. Какие факторы влияют на клональное микроразмножение растений?
8. В каких случаях целесообразно применение этого метода?
9. Каковы достижения и перспективы этого метода?
10. Почему для борьбы с вирусными болезнями используется культура апикальной меристемы?
11. С какой целью применяется термообработка?
12. Какие существуют методы диагностики заражения растения вирусом?
13. Как размножают безвирусный посадочный материал?

4.1 Тестовые задания к главе 4

«Технология клонального микроразмножения и оздоровления растений»

1. Витрификация – это:

- A) Нарушение азотного обмена растения;
- B) Нарушение водного режима растений *in vitro*;
- C) Нарушение обмена серы в растении;
- D) Накопление полифенолов в растении;
- E) Накопление алкалоидов в растении;
- F) Нарушение водного баланса культивируемых клеток растений *in vitro*;

Г) Явление «остекленения» клеток, в результате повышенной влажности воздуха в культуральном сосуде;

Н) Способность клетки воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением своего развития.

2. Клональное микроразмножение растений осуществляется следующим способом:

А) Культивированием апикальных меристем;

В) Активацией пазушных меристем;

С) Индукцией соматического эмбриогенеза;

Д) Биобаллистическим методом;

Е) Культивированием пыльников;

Ф) Культивированием микроспор;

Г) Культивированием завязей;

Н) Воздействием электрическим током.

3. Клональное микроразмножение растений предпочтительнее проводить методом активации пазушных меристем, так как:

А) Процесс размножения проходит эффективно;

В) Полученные от них растения свободны от вирусов;

С) Клетки пазушной меристемы свободны от бактерий;

Д) Клетки пазушной меристемы генетически стабильны;

Е) Из пазушных меристем получают генетические копии донорных растений;

Ф) Клетки пазушной меристемы свободны от микроскопических грибов;

Г) В клетках пазушной меристемы низкая степень генетической variability;

Н) Клетки пазушной меристемы генетически нестабильны.

4. Какие факторы не влияют на клональное микроразмножение растений?

А) Генотип растения;

В) Тканевое происхождение экспланта;

С) Компоненты питательной среды;

Д) Условия культивирования;

Е) способы иммобилизации клеток;

Ф) Скорость аэрации;

Г) Стадия развития семяпочки;

Н) Физиологическое состояние экспланта.

5. Клеточный клон – это:

А) Группа клеток в суспензионной культуре;

- В) Элементы ксилемы, образующиеся в каллусной ткани;
- С) Клетки, образовавшиеся на питательной среде из одной клетки;
- Д) Элементы флоэмы, появившиеся в каллусной ткани;
- Е) Зародышеподобные структуры, образовавшиеся на поверхности каллусной ткани;
- Ф) Генетическая копия донорной клетки;
- Г) Аналог зиготы;
- Н) Растение, размножаемое половым способом.

6. Какой из способов микроклонального размножения растений является эффективным?

- А) Активация пазушной меристемы;
- В) Соматический эмбриоидогенез;
- С) размножение путем пролиферации каллусной ткани;
- Д) размножение посредством первичного каллуса;
- Е) размножение посредством адвентивных почек;
- Ф) метод культуры апикальной меристемы;
- Г) метод культуры микроспор;
- Н) метод культуры мегаспор.

7. Какие факторы не влияют на клональное микроразмножение растений?

- А) Физиологическое состояние и генотип донорного растения;
- В) Фитогормональный состав питательной среды;
- С) Размер экспланта;
- Д) Физические факторы;
- Е) Интенсивность освещения;
- Ф) Плотность и консистенция каллуса
- Г) Сроки микрочеренкования;
- Н) Размер микрочеренков.

8. Какой из методов применяется для диагностики вирусных болезней растений (укажите неправильный ответ)?

- А) Метод растений-индикаторов;
- В) Электронно-микроскопический метод;
- С) Серологический метод;
- Д) Иммуноферментный анализ;
- Е) ДНК гибридизация
- Ф) Масс-спектрометрия
- Г) Рентгеноструктурный метод;
- Н) Хроматографический метод.

9. Почему для получения безвирусных растений применяют культуру апикальных меристем? (укажите неправильный ответ)

- A) В апикальной меристеме вирусов мало или практически не бывает;
- B) Меристематические клетки генетически нестабильны;
- C) Меристематические клетки, относясь к образовательной ткани, имеют высокую способность к делению;
- D) свободную от инфекции меристему нельзя сохранить методом криоконсервации;
- E) В апексе побега нет проводящей системы;
- F) Диаметр плазмодесм очень большой;
- G) В апексе побега интенсивность ДНК репарации высокая;
- H) Вследствие особенностей метаболизма в клетках апикальной меристемы размножение вирусов ингибируется.

10. Каким клеткам свойственна генетическая стабильность?

- A) Каллусным клеткам;
- B) Меристематическим клеткам;
- C) Клеткам ксилемы;
- D) Генеративным клеткам;
- E) «Привыкшим» клеткам;
- F) Клеткам апикальной меристемы побегов;
- G) Клеткам пазушной меристемы;
- H) Клеткам флоэмы.

11. При использовании какого метода наряду с клональным микроразмножением имеет место оздоровление растений от вирусов?

- A) При использовании культуры апикальных меристем;
- B) При использовании метода активации пазушных меристем;
- C) При размножении с помощью адвентивных почек;
- D) При размножении посредством пролиферации каллусной ткани;
- E) При индукции соматического эмбриогенеза.

12. Что такое соматический эмбриогенез?

- A) Образование вегетативных органов на эксплантах генеративных органов;
- B) Образование корней на листовых эксплантах;
- C) Образование цветочных почек на корневых эксплантах;
- D) Образование зародышей из соматических клеток экспланта;
- E) Образование элементов проводящей ткани в толще каллусной ткани.

13. Какой этап в развитии зародыша является оптимальным для эмбриокультуры *in vitro*?

- A) На уровне зиготы;
- B) После перехода на автономное развитие;
- C) На самых ранних этапах формирования зародыша;
- D) Полностью сформировавшийся зародыш;
- E) Фаза развития зародыша не имеет значения.

14. Что такое апикальное доминирование?

- A) Подавление апикальной меристемой стебля роста пазушных меристем;
- B) Подавление верхушечной меристемой образования придаточных корней;
- C) Подавление вышерасположенной пазушной меристемой деления клеток нижерасположенных пазушных меристем;
- D) Подавление апикальной меристемой стебля деления клеток верхушечной меристемы корня;
- E) Подавление апикальной меристемой корня деления клеток апикальной меристемы стебля.

15. Что такое адвентивные почки, появившиеся *in vitro*?

- A) Почки, образовавшиеся на эмбриоиде;
- B) Почки, образовавшиеся из апикальной меристемы;
- C) Почки, образовавшиеся на каллусной ткани;
- D) Придаточные почки, возникающие из клеток и тканей, обычно их не образующих;
- E) Почки, образовавшиеся в пазухе листьев.

16. Искусственные семена – это:

- A) Семена в культуре *In vitro*;
- B) Эмбриоиды, заключенные в капсулы;
- C) Эмбриоиды, полученные в массовом количестве;
- D) Семена растений — регенерантов;
- E) Семена мутантных растений.

17. В чем значение метода термотерапии?

- A) Ингибируется размножение вирусов в растительной ткани;
- B) Размножение вирусов в тканях растений происходит интенсивно;
- C) Рост клеток в растительной ткани происходит интенсивно;
- D) В тканях растений развитие эндогенной микрофлоры происходит интенсивно;
- E) Все ответы правильные.

18. При какой температуре проводят термотерапию (для растений, относящихся к экогруппе мезофитов)?

- A) 0°-10° C;
- B) 10°-20° C;
- C) 25°-30° C;
- D) 35°-40° C;
- E) 45°-50° C.

19. Что такое иммуноферментный анализ (ИФА)?

- A) Метод, с помощью которого определяют активность фермента каталазы;
- B) Метод, с помощью которого определяют активность фермента нитрогеназы;
- C) Метод, с помощью которого определяют активность фермента рестриктазы;
- D) Метод, с помощью которого определяют активность фермента эндонуклеазы;
- E) Метод, основанный на определении ферментативной активности комплекса антиген-антитело.

20. В чем особенность клонального микроразмножения растений через культуру апикальных меристем?

- A) Пробиорочные растения, полученные из апексов, быстро растут;
- B) Одновременно с размножением происходит очищение от вирусов;
- C) Растения, полученные из апексов, не содержат сапрофитной микрофлоры;
- D) Из апексов можно получить много побегов;
- E) Из апексов можно получить интенсивно растущую каллусную ткань.

21. Какой из приведенных методов диагностики вирусов в растениях-регенерантах имеет низкую чувствительность?

- A) Метод растений-индикаторов;
- B) Серологический метод;
- C) Метод электронной микроскопии;
- D) Метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот;
- E) Иммуноферментный анализ.

22. В каких случаях возможно получение безвирусных пробиорочных растений-регенерантов?

- A) В случае изолирования апекса очень маленького размера (100-200 мкм);

- В) В случае выделения экспланта маленького размера и одновременного применения химиотерапии;
- С) В случае выделения экспланта маленького размера и одновременного применения термотерапии;
- Д) В случае отделения листовых зачатков, расположенных вблизи с апексом стебля;
- Е) Все ответы правильные.

23. Что используют в качестве экспланта для получения безвирусных растений?

- А) Пазушную меристему;
- В) Протопласты;
- С) Апикальную меристему корня;
- Д) Микрочеренки;
- Е) Апикальную меристему стебля.

24. Оздоровленные растения *in vitro* получают:

- А) Культивируя апикальную меристему;
- В) Обработывая растения фунгицидами;
- С) Обработывая растения антибиотиками;
- Д) Культивируя пазушные почки;
- Е) Культивируя эмбриониды.

25. Оздоровление растений – это:

- А) Культивирование растений в стерильных условиях;
- В) Стерилизация растений;
- С) Обработка растений антибиотиками;
- Д) Очищение растений *in vitro* от бактериальных, грибных, вирусных патогенов;
- Е) Обработка растений пестицидами.

4.2 Практические задания и задачи к главе 4 «Технология клонального микроразмножения и оздоровления растений»

Задание 1

Рассчитайте какое количество (в мл) из 1% сток-раствора ИУК необходимо взять для приготовления 1,5 л питательной среды Мурасиге-Скуга с целью индукции образования каллусов табака, если известно, что 2 мг/л ИУК стимулирует каллусообразование.

Задание 2

Рассчитайте какое количество (в мл) из 1% сток-растворов ИУК (индолилуксусной кислоты) и кинетина необходимо взять для приготовления 2 л питательной среды Гамборга Эвелега (B5) с целью индукции геммо-ризогенеза в каллусной культуре картофеля, если учесть, что модификация среды с ИУК 1 мг/л и 3 мг/л кинетина стимулирует процесс морфогенеза.

Задание 3

По какой формуле определяется митотический индекс? Чему равен митотический индекс (митотическая активность) пролиферирующей каллусной ткани табака, если известны следующие результаты цитогенетического анализа исследованных 1000 клеток каллусной ткани табака:

Повторность	Число клеток в стадии				
	И	П	М	А	Т
1	65	130	375	280	150
2	86	153	420	178	163
3	78	145	510	140	127

Где И-интерфаза, П-профаза, М-метафаза, А-анафаза, Т-телофаза

Задание 4

Рассчитайте прирост сырой каллусной биомассы риса, если известно, что начальная сырая масса каллуса риса составляла 0,356 грамм, а на 10-ый день культивирования сырая масса каллуса составляла 1720 мг.

Глава 5

ГАПЛОИДНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ

Гаплоиды – организмы, в соматических клетках которых содержится одинарный набор хромосом (n), представляющий половину полного набора ($2n$), свойственного виду. Экспериментальное получение гаплоидов традиционными методами селекции (внутривидовое и межвидовое опыление, облучение рентгеновскими лучами и воздействие другими стрессовыми факторами) малоэффективно и требует много времени. Использование таких приемов, как культивирование *in vitro* мужского и женского гаметофита, намного ускоряет получение гаплоидов и облегчает селекционный процесс. Экспериментальную гаплоидию можно рассматривать как форму апомиксиса. **Апомиксис** – размножение организмов, не сопровождающееся половым процессом.

Индуктирование гаплоидов в культуре мужского гаметофита (пыльники, пыльца) называется **андрогенезом**, а в культуре женского гаметофита (семяпочки) – **гиногенезом**. Кроме того, гаплоиды можно вырастить, культивируя гибридный зародыш, в котором происходит элиминация хромосом одного из родителей. Иногда гаплоидное растение образуется в процессе псевдогамии – ложного оплодотворения, в результате чего зародыш развивается из неоплодотворенной яйцеклетки.

Получение гаплоидов в культуре пыльников и пыльцы. Впервые гаплоидные растения при культивировании пыльников дурмана были получены С. Гуха и С. Махешвари в Индии в 1964 году. Затем эти опыты повторил на табаке французский ученый К.

Нич в 1967 году. С тех пор этим способом получены гаплоидные растения многих видов, в том числе пшеницы, ячменя, ржи, риса, картофеля, рапса и других сельскохозяйственных культур. Микроспоры проходят очень сложный путь, формируя либо каллус, либо эмбриониды и далее растения-регенеранты. Нормальное развитие микроспор *in vivo* складывается из следующих стадий: 1) двукратный мейоз, в результате чего из материнской клетки пыльцы образуются тетрады микроспор; 2) освобождение микроспор из утолщенной стенки тетрады; 3) развитие микроспоры с последующим образованием зрелого пыльцевого зерна, сопровождаемое двумя митозами. В культуре отклонение от нормального развития может идти на любой стадии развития микроспоры.

Развитие микроспор *in vitro* и регенерация растений.

Микроспоры (незрелая пыльца) *in vitro* ведут себя по-разному. Н. Сандерланд исследовал первые этапы развития изолированных микроспор дурмана в культуре и показал, что они отличаются от нормального развития микроспор. Единицы из них переходят с гаметофитного пути развития на спорофитный и формируют эмбрионид. Другие дедифференцируются и образуют каллус. Часть из них может продолжать микроспорогенез и гаметогенез, а какая-то часть вообще деградирует и погибает. Процесс перехода микроспор с гаметофитного на спорофитный путь развития определяется на генетическом уровне, но реализуется в зависимости от конкретных физиологических условий и различных по действию индуцирующих факторов. Направление развития микроспор прежде всего определяется стадией, на которой были изолированы пыльники, а также гормональным составом питательной среды.

Образовавшаяся из микроспоры многоклеточная структура далее может развиваться в каллусную ткань. Образование гаплоидных растений из эмбрионидов называется *прямым андрогенезом*, из каллуса – *косвенным*.

Из тысяч микроспор, содержащихся в пыльнике, только из единиц развиваются эмбриониды. Возможно, способность к эм-

бриоидогенезу генетически обусловлена. Экспериментально установлено увеличение частоты эмбриогенных микроспор под действием стрессовых воздействий, например низких и высоких температур, ионизирующих излучений. Для прямого андрогенеза имеет значение физиологическое состояние донора, стадия развития пыльцы в момент введения пыльника в культуру, состав питательной среды и условия культивирования. Для многих растений наиболее благоприятной стадией развития является одноядерная микроспора. Не все растения, регенерировавшие из каллусов, являются гаплоидными, поэтому для массового получения гаплоидов стараются индуцировать пыльцевой эмбриоидогенез (рис 8).

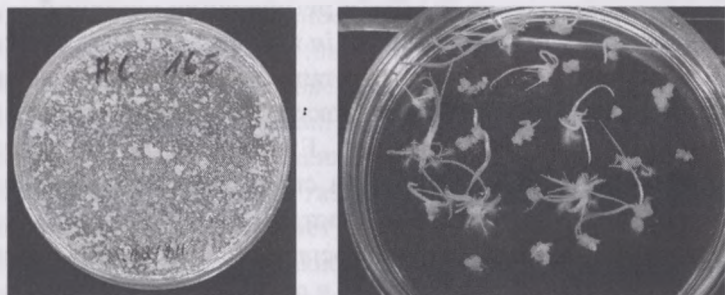


Рисунок 8. Получение гаплоидных растений-регенерантов в культуре микроспор

Установлена возможность прямого эмбриоидогенеза в культуре изолированных пыльников и микроспор пшеницы. В развитии андроклиных структур выявлены критические периоды: а) первый митоз и последующие, формирование многоклеточного комплекса; б) стадия глобулы; в) стадия проэмбрио. На критических этапах своего развития эмбриониды могут дедифференцироваться в каллус, в этом случае регенерация растений происходит через вторичный эмбриоидогенез или органогенез (геммогенез, гемморизогенез).

При культивировании целых пыльников нельзя исключить возможности образования каллусных тканей из диплоидных клеток спорогенной ткани пыльников. Растения, регенерировавшие из этого каллуса, могут оказаться диплоидными или полиплоидными. Культивирование целых пыльников имеет еще один недостаток: стенка пыльника может выделять вещества, ингибирующие процесс пыльцевого эмбриогенеза. Кроме того, у наиболее отзывчивых генотипов при благоприятных условиях андрогенеза *in vitro* культура пыльников ограничивает возможность одновременной массовой индукции каллусов и эмбриоидов из микроспор. С учетом этого предпочтительнее культивировать изолированную пыльцу, однако возможность извлечения пыльцы путем разрезания пыльника ограничена отдельными видами растений с большими пыльниками и крупной свободно расположенной в них пыльцой, таких как *Datura*, *Petunia*, *Nicotiana*, *Brassica*. При правильном подборе стадии развития пыльцы, предварительной обработки и условий инкубирования, пыльники раскрываются, пыльца самопроизвольно высыпается и всплывает. Свободно плавающие соматические ткани пыльника удаляют и продолжают инкубацию микроспор. При этом происходит кондиционирование среды за счет биологически активных веществ, вымываемых из пыльника. Широкому распространению экспериментальной гаплоидии *in vitro* мешают два крупных недостатка метода: низкий выход гаплоидных растений-регенерантов и появление среди них большого числа (особенно у злаков) альбиносов. Надо отметить, что среди растений-регенерантов в культуре пыльцы альбиносов бывает еще больше, что, видимо, вызвано нарушениями развития пыльцы. Причина альбинизма неясна. Возможно, это следствие мутаций, возникающих в микроспорах при культивировании.

Факторы, влияющие на андрогенез *in vitro*.

Продуктивность андрогенеза *in vitro* зависит от многих взаимосвязанных факторов: генотипа донорного растения, условий его выращивания, стадии развития микроспор, предобработки эксплантов, состава питательных сред, режима культивирования и др.

Одним из основных факторов, лимитирующих андрогенез *in vitro*, является *генотип донорного растения*. Причем не только виды внутри рода, но и сорта одних и тех же видов обнаруживают различную способность к регенерации растений. В исследованиях И.Р. Рахимбаева с сотрудниками в КазГУ им. С.М. Кирова при испытании 27 генотипов ячменя и 24 генотипов пшеницы андрогенетическая способность в культуре пыльников варьировала на разных питательных средах в пределах соответственно от 0 до 31,6 % и от 0 до 14,7 %.

Результаты многих исследований показывают, что взаимосвязь между генотипом и морфогенезом *in vitro* является сложной, особенно это касается однодольных растений. И. Васил считает, что *физиологическое состояние* экспланта на момент изолирования оказывает большее влияние на его морфогенетические способности, чем генотип. Оптимизация условий культивирования с учетом физиологического состояния экспланта может снизить влияние генотипа на андрогенез *in vitro*. Как подтверждение этой предпосылки выступают установленные факты о влиянии на эффективность андрогенеза *in vitro* условий выращивания донорных растений. Так, например, регенерация растений идет лучше в культуре пыльников, выделенных из растений, выращенных в поле, чем в теплице. По-видимому, это результат комплексного влияния факторов внешней среды.

Оптимальные условия выращивания доноров различаются для каждого вида растения. Имеются примеры положительного влияния на частоту индукции каллусов и эмбриоидов из микроспор действия различных физических и химических факторов на растения-доноры (низкие и высокие температуры, недостаток азота в питании, лазерная обработка и др.). Среди этих факторов особо значимым является *температурный*. Холодовая предобработка растений-доноров, колосьев, пыльников способствует сохранению жизнеспособности пыльцы и увеличивает частоту образования эмбриоидов. Вместе с тем не существует стандартных рекомендаций по режиму предобработки. Температура и продолжительность обработки зависят от вида, стадии

развития пыльцы, времени ее сбора. Однако встречаются факты отрицательного воздействия низких температур на андрогенез. Иногда положительный эффект дают инкубация пыльников при повышенной температуре, например 30° С для рапса, или последовательная холодовая и высокотемпературная их обработка, в частности для горчицы. Показано, что температурные шоки способствуют синхронизации деления микроспор, изменениям оси деления, ориентации веретена. В целом температурное воздействие можно рассматривать либо как способ задержки процессов развития микроспор и сохранения их жизнеспособности, либо как стресс, меняющий программу развития микроспоры.

Решающую роль для индукции андрогенеза *in vitro* играет стадия развития микроспор в момент их изоляции для культивирования. В зависимости от вида растений наиболее благоприятны стадии между концом мейоза и поздней двуядерной стадией. При переносе пыльников в культуру на оптимальной стадии развития наблюдаются преимущественный пыльцевой эмбриогенез и формирование растений. Так, у табака наилучшие результаты получаются, когда пыльца находится на стадии первого митоза, у различных видов крестоцветных и ячменя – ранней одноядерной, а у пшеницы – на средней одноядерной стадии развития микроспоры. У различных растений установлено существование определенной фракции микроспор, способных к эмбриогенезу *in vitro*, так называемых Р-зерен. Они существуют *in vivo* и отличаются от других типов микроспор меньшими размерами, отсутствием крахмала, светлой цитоплазмой, тонкой экзиной, иногда дополнительными митозами, вследствие чего могут быть многоядерными. Этот феномен получил название *пыльцевого диморфизма*. Обнаружена корреляция между частотой возникновения Р-зерен *in vivo* и частотой формирования эмбрионидов *in vitro*. Частота образования потенциальных эмбрионидных микроспор *in vivo* хотя и определяется генетическими особенностями вида, но может изменяться в зависимости от условий выращивания донорных растений. Эмбрионидная пыльца отличается от гаметофитной своей недифференцированностью.

Вероятно, под влиянием холода подавляются процессы нормальной дифференциации пыльцы, что приводит к увеличению ее эмбриогенного потенциала. По-видимому, у эмбриогенных микроспор подавлена функция формирования гаметофита, поэтому они легко вступают на спорофитный путь развития (рис. 9).

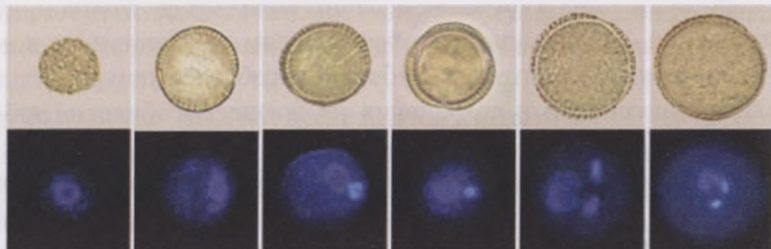


Рисунок 9. Стадии развития микроспор ячменя

Питательная среда и условия культивирования имеют большое значение для эффективности андрогенеза *in vitro*. Чаще всего для этого используют основные среды Мурасиге и Скуга, Гамборга, агаризованные или жидкие. На жидкой среде каллусогенез из микроспор идет быстрее и лучше, но эффективность регенерации растений ниже, поэтому чаще применяют поверхностное культивирование пыльников. Однако агар содержит вещества, оказывающие вредное действие на выжимаемость пыльцы. Содержание сахарозы в среде варьируется в зависимости от вида растения от 2 до 12%. По-видимому, это связано с ее участием в создании осмотического давления в среде. В зависимости от вида растений и стадии развития микроспоры варьируется также гормональный состав среды. Для многих растений показано благоприятное действие различных аминокислот (гидролизат казеина, аланин, глицин) и их аминов (аспарагин, глутамин), субстратов природного происхождения (дрожжевой экстракт, солодовый экстракт, кокосовое молоко). Значительный прогресс в культивировании

пыльников злаков был достигнут китайскими учеными благодаря добавлению в среду картофельного экстракта. Его состав окончательно не установлен, основной компонент – картофельный крахмал – используется не только для питания, но и как гелеобразующее вещество. Заслугой китайских исследователей также является установление факта положительного влияния на выход каллусов и эмбриоидов в культуре пыльников злаков увеличения концентрации нитратного и снижения концентрации аммонийного азота в среде. Для табака показана подобная зависимость от присутствия в среде ионов железа.

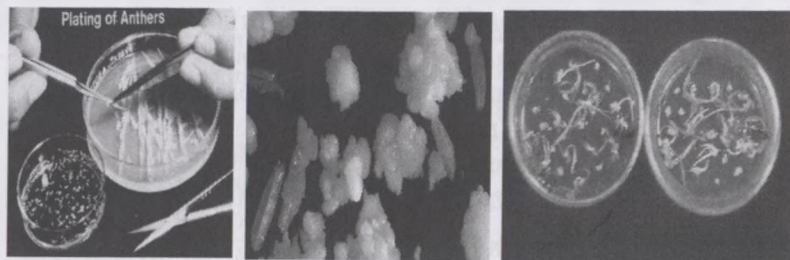


Рисунок 10. Образование эмбриоидов и растений-регенерантов в культуре пыльников пшеницы

Описанные выше условия культивирования касаются первого этапа работы по введению пыльников и пыльцы в культуру. Для регенерации растений из образовавшихся андрогенных структур требуется их пересадка на среды другого состава. Эмбриониды переносят на среды с пониженным содержанием сахарозы (1%), гормонов. У большинства видов растений, в первую очередь у пасленовых, регенерация идет через эмбриониды. У злаков андрогенез идет преимущественно через каллусообразование (рис. 10). Для индукции роста побегов и корней каллус пересаживается на среду с пониженным содержанием сахарозы (2-3%) и соответствующим гормональным балансом. Учитывая генотип, стадию развития пыльцы, оптимизируя питательную среду, условия куль-

тивирования, вплоть до подбора плотности пыльцы в микрокаплях, они смогли вывести на основе андрогенных гаплоидов также многие ценные сорта кукурузы, ржи, ячменя, табака, хлопка, сои, семенной капусты, китайской капусты, каучуконосов, перца и др. растений.

Получение гаплоидов методом селективной элиминации хромосом в гибридном зародыше. При отдаленной гибридизации некоторых видов установлено явление селективной (выборочной) элиминации хромосом одного из родителей на ранней стадии развития гибридного зародыша. Это явление лучше всего изучено у ячменя. При скрещивании диплоидных ячменей культурного вида *Hordeum vulgare* с многолетними дикими луковичными *Hordeum bulbosum* возникают гаплоиды с набором хромосом *H. vulgare*. На стадии начала роста зародыша и эндосперма происходит элиминация (выпадение) хромосом дикого вида, через 5 дней после оплодотворения хромосомы *H. bulbosum* полностью удаляются. Это происходит во время деления клеток зародыша и эндосперма. При каждом делении вследствие генетической несовместимости теряется до трех хромосом. Через 15 суток после опыления развитие гаплоидного зародыша на материнском растении останавливается. Однако *in vitro* их можно спасти, на соответствующей питательной среде из них развиваются нормальные проростки. Гаплоиды возникают в обоих случаях скрещивания, когда *H. bulbosum* служит материнской и отцовской формой. В первом случае появляются матроклинные гаплоиды (развивающиеся из яйцеклетки), во втором случае – андрогенные гаплоиды (из микроспор), что весьма существенно для селекции. Сочетание селективной элиминации хромосом с эмбриокультурой позволяет получать не только моногаплоиды ($n=7$) от диплоидного ячменя ($2n=14$), но и дигаплоиды ($2n=14$) от тетраплоидного ячменя ($4n=28$).

Поскольку гаплоиды стерильны, для получения фертильных растений гаплоиды обязательно должны быть переведены на диплоидный уровень, Использование гибридизации с ячменем луковичным и удвоение хромосом резко сокращает время, необ-

ходимое для получения гомозигот, и, что очень важно, при прохождении организма через гаплоидную форму существования он очищается от рецессивных генов. Гаплоиды могут быть получены одинаково успешно для разных сортов и гибридов ячменя, при этом число и частота образования гаплоидных растений очень высокие и, кроме того, не возникают растения-альбиносы. Применяв этот метод и культивируя зародыши *in vitro*, во Всесоюзном селекционно-генетическом институте в Одессе были выведены новые сорта ярового ячменя Исток и Одесский-115 за 4 года вместо 10-12 лет при обычной селекционной работе над новыми сортами. Этим же методом в Канаде созданы сорта ячменя Минго и Родео. Элиминация хромосом встречается и у других родов. Дикий ячмень, использованный в качестве опылителя, индуцирует гаплоиды у ржи и у пшеницы, например у сорта Чайниз Спринг, причем с высокой частотой. У других генотипов пшеницы наблюдалась несовместимость при скрещивании с *H. bulbosum*, но, несмотря на это, гаплоидные растения были получены и у озимой пшеницы.

Получение гаплоидных растений в культуре женского гаметофита. Работы по культивированию женских репродуктивных органов с целью получения гаплоидных растений начались еще в 50-е годы, и в последние годы интерес к культуре женского гаметофита особенно возрос. Это, во-первых, обусловлено тем, что культивирование неоплодотворенных семян мужски стерильных растений является единственной возможностью получения у них гаплоидов. У мужски стерильных линий табака и сахарной свеклы этим методом были получены гаплоидные растения. Во-вторых, женский гаметофит может быть источником получения гаплоидов у тех растений, у которых каллусная ткань обладает низким морфогенетическим потенциалом либо регенерирует растения-альбиносы. У некоторых растений в культуре семян частота регенерации зеленых растений значительно выше, чем из пыльников. Например, у ячменя все гаплоидные растения, индуцированные через гиногенез, оказались хлорофиллоносными, в то время как при андрогенезе 99% растений-

регенерантов были альбиносами. Подобные результаты были получены и на рисе.

Индукция гаплоидов в культуре семяпочки называется *гиногенезом* и является одной из форм апомиксиса. *Апомиксис* – размножение организмов, не сопровождающееся половым процессом. В зависимости от того, дает начало новому организму половая или вегетативная клетка, различают две основные формы апомиксиса – партеногенез и апогамию.

Партеногенез – форма полового размножения организмов, при которой женские половые клетки (яйцеклетка, яйца) развиваются без оплодотворения. Партеногенез – половое, но однополое размножение, потомство повторяет генотип матери. Зародыш может быть как гаплоидный, так и диплоидный. *Апогамия (апогаметия)* – гаметы не образуются, а зародыш (гаплоидный или диплоидный) развивается из синергиды или антиподы. Апомиксис – довольно распространенное явление в природе. *Женский гаметофит растений* – зародышевый мешок располагается в семяпочке и окружен нукеллусом и интегументами (покровами), образующими при смыкании узкий канал – микропиле, противоположная микропиле часть семяпочки называется халазой. Халазой стороной семяпочка через семяножку прикрепляется к плаценте. В зависимости от расположения микропиле, семяножки и продольной оси нукеллуса различают 5 типов семяпочек.

На процесс индукции гаплоидных растений влияет целый комплекс лимитирующих факторов. Среди них можно выделить *факторы эндогенные* (генотип исходного растения, степень развития зародышевого мешка) и *экзогенные* (состав питательной среды, условия культивирования).

Гаплоидные клетки и протопласты являются уникальной моделью для изучения деления и дифференцировки клеток, для изучения генетики соматических клеток, генетики популяций. Основной интерес к гаплоидам определяется возможностью быстрого получения гомозиготных растений, образуемых удвоением числа хромосом. Если гаплоидные растения подвергнуть воздействию колхицина, то возникнут абсолютно гомозиготные ди-

гаплоидные клетки, содержащие совершенно идентичные хромосомы. Для гаплоидов характерна стерильность при половом размножении: отсутствие у них гомологичных хромосом приводит к нарушению процесса мейоза и образованию половых клеток с аномальным набором хромосом. Удвоение числа хромосом превращает гаплоид в фертильное гомозиготное диплоидное растение. Используя пыльники F_1 – растений для получения удвоенных гаплоидов, можно отбирать рекомбинантные генотипы, несущие желаемые признаки, среди относительно небольших популяций на ранних этапах селекционного процесса. Скрещивание гомозиготных линий между собой, как правило, дает высокопродуктивное потомство. При размножении гомозиготных растений семенами не происходит расщепления признаков в потомстве, поэтому размножение семенами гомозиготных линий даст большой экономический эффект. Гаплоидные растения позволяют легко обнаружить рецессивные генные мутации, поскольку они не маскируются доминантными аллелями. Это резко ускоряет селекционный процесс. Гаплоидия применяется при количественном генетическом анализе сельскохозяйственных растений. Такой анализ включает изучение взаимодействия генов и генетической изменчивости, определение групп сцепления, установление числа генов, действующих на количественные признаки, а также локализации полигенов. Методы экспериментальной гаплоидии вошли в практику селекционеров всего мира и позволили достичь больших результатов. Выведены новые стабильные сорта риса (Китай, Япония, Филиппины, Индия, США, СНГ), устойчивые сорта и формы табака, проводится работа по созданию гомозиготных дигаплоидных линий у пшеницы, ржи, ячменя, рапса, спаржи и других культур.

Вопросы для контроля:

1. Какие существуют методы экспериментальной гаплоидии?
2. Как развиваются микроспоры *in vivo*?
3. Возможные пути развития микроспор *in vitro*.
4. Какими путями образуются андрогенные растения-регенеранты?

5. Какие факторы влияют на андрогенез *in vitro*?
6. Каковы преимущества и недостатки экспериментальной гаплоидии *in vitro*?
7. Развитие женского гаметофита *in vivo*
8. Пути формирования гаплоидных растений в культуре женского гаметофита.
9. Влияние различных факторов на гиногенез.
10. В чем состоит ценность гаплоидных клеток и растений?
11. Как используются гаплоидные растения на практике и в науке?

5.1 Тестовые задания к главе 5 «Гаплоидная технология»

1. Отметьте организм гетерозиготный по генам A и D:

- A) AA BB CC dd;
- B) AA Bv Cc Dd;
- C) Aa BB CC DD;
- D) Aa vv cc dd;
- E) Aa Bv CC Dd;
- F) Aa BB Cc Dd;
- G) Aa BB CC Dd;
- H) AA Bv Cc DD.

2. Отметьте гомозиготный организм:

- A) Aa Bv Cc;
- B) AA vv cc;
- C) AA Bv CC;
- D) Aa vv Cc;
- E) aa Bv CC;
- F) AA BB CC;
- G) Aa BB Cc;
- H) AA vv CC.

3. Какой способ получения гаплоидных растений наиболее эффективен?

- A) Внутривидовое скрещивание;
- B) Межвидовое скрещивание;
- C) Обработка растений ионизирующим излучением;
- D) Обработка растений химическими мутагенами;
- E) Экспериментальная гаплоидная технология *in vitro*;
- F) Метод андрогенеза *in vitro*;
- G) Метод гиногенеза *in vitro*;
- H) Индукция апомиксиса.

4. Факторы, влияющие на андрогенез *in vitro* (укажите неверный ответ)

- A) Физиологическое состояние экспланта;
- B) Генотип донорного растения;
- C) Стадия развития микроспор;
- D) Мутагенные агенты;
- E) Температура;
- F) Стадия развития мегаспор;
- G) Размер экспланта;
- H) Состав питательной среды.

5. Андрогенез *in vitro* – это...

- A) Получение гаплоидов в культуре завязи;
- B) Получение гаплоидов в культуре семяпочки;
- C) Получение гаплоидов в культуре пыльников;
- D) Получение гаплоидов в культуре апикальной меристемы;
- E) Получение мутантов в культуре зародышей;
- F) Метод культивирования мужского гаметофита *in vitro*;
- G) Получение гаплоидов путем культивирования микроспор *in vitro*;
- H) Получение гаплоидов путем межвидовой гибридизации.

6. Гиногенез *in vitro* – это...

- A) Получение полиплоидов в культуре зародышевого мешка;
- B) Получение гаплоидов в культуре неоплодотворенной завязи;
- C) Получение гаплоидов в культуре пыльцы;
- D) Получение гаплоидов в культуре пыльников;
- E) Получение альбиносных растений;
- F) Метод культивирования женского гаметофита *in vitro*;
- G) Получение гаплоидов путем культивирования мегаспор *in vitro*;
- H) Метод культивирования мужского гаметофита *in vitro*.

7. С чем связано значение гаплоидов в селекционном процессе?

- A) Возможностью получения изогенных линий и гетерозисных гибридов;
- B) Проявлением рецессивных мутаций и ускорением селекции на гаплоидном уровне;
- C) Удалением из популяции летальных и сублетальных генов;
- D) Возможностью проведения количественного генетического анализа;
- E) Со всеми перечисленными возможностями.

8. Какая клетка является гаплоидной?

- A) $2n$;
- B) $4n$;

- C) $4n+1$;
- D) n ;
- E) $3n$.

9. Отметьте гаплоидный организм:

- A) AA BB CC;
- B) Aa B CC;
- C) ABC;
- D) AA vv cc;
- E) a vv cc.

10. Организм, имеющий набор хромосом « $2n-1$ » называется:

- A) Анеуплоид, моносомик;
- B) Полиплоид, пентаплоид;
- C) Анеуплоид, трисомик;
- D) Полиплоид, гексаплоид;
- E) Анеуплоид, нуллисомик.

20. Организм, у которого количество хромосом соответствует « n » называется:

- A) Гаплоид;
- B) Полиплоид;
- C) Моносомик;
- D) Анеуплоид;
- E) Нуллисомик.

12. Отметьте рецессивную гомозиготу:

- A) Aa Bv;
- B) AA Bv;
- C) aa vv;
- D) Aa BB;
- E) AABV.

13. Отметьте доминантную гомозиготу:

- A) Aa Bv CC;
- B) AA Bv Cc;
- C) Aa BB CC;
- D) AA BB CC;
- E) Aa BB Cc.

14. Отметьте гетерозиготный организм:

- A) Aa Bv Cc Dd;

- В) AA Bb Cc Dd;
- С) Aa BB Cc DD;
- Д) AA Bb CC Dd;
- Е) Aa BB cc dd.

15. Укажите процесс, при котором образуются растения, содержащие только отцовский геном:

- А) Гиногенез;
- В) Андрогенез;
- С) Партеногенез;
- Д) Апогамия;
- Е) Апомиксис.

16. Эмбрионд – это:

- А) Зародыш, образующийся в искусственных условиях;
- В) Точка роста стебля;
- С) Точка роста корня;
- Д) Зародыш, образовавшийся из культивируемых *in vitro* соматических клеток;
- Е) Пазушная меристема листьев;
- Г) Зародыш, образовавшийся из эмбрионального клеточного комплекса;
- З) Структура, образовавшаяся из зиготы;
- И) Зародыш, образовавшийся из оплодотворенной яйцеклетки.

17. Прямой эмбриондогенез *in vitro* – это:

- А) Формирование эмбриондов из каллусных клеток;
- В) Формирование эмбриондов из клеток экспланта;
- С) Формирование эмбриондов из клеток «привыкшей» ткани;
- Д) Формирование эмбриондов из клеток флоэмы;
- Е) Формирование эмбриондов из клеток раневой меристемы;
- Г) Формирование зародыша из исходной соматической клетки;
- З) Формирование зародыша *in vitro* непосредственно из культивируемых клеток экспланта;
- И) Формирование эмбриондов из клеток ксилемы.

18. Непрямой эмбриондогенез *in vitro* – это:

- А) Формирование эмбриондов из каллусных клеток;
- В) Формирование эмбриондов из клеток экспланта;
- С) Формирование эмбриондов из клеток «привыкшей» ткани;
- Д) Формирование эмбриондов из клеток флоэмы;
- Е) Формирование эмбриондов из клеток раневой меристемы;

- Г) Формирование зародыша из дедифференцированных клеток;
- Г) Развитие клетки в процессе онтогенеза;
- Н) Формирование эмбрионов из неспециализированных клеток.

19. Какие генетические изменения в клетках можно обнаружить с помощью цито-генетического метода?

- А) Генные мутации;
- В) Точковые мутации;
- С) Аллельные мутации;
- Д) Мутации количественных признаков;
- Е) Изменение количества хромосом и крупные хромосомные аберрации.

20. Как возникают соматические и зиготические зародыши?

- А) Оба происходят из зиготы;
- В) Оба происходят из клеток экспланта;
- С) Соматический зародыш происходит из соматических клеток, а зиготический зародыш возникает из зиготы;
- Д) Соматический зародыш происходит из зиготы, а зиготический зародыш возникает из соматических клеток;
- Е) Соматический зародыш происходит из клеток ксилемы, а зиготический зародыш возникает из клеток флоэмы.

5.2 Практические задачи к главе 5 «Гаплоидная технология»

Задание 1

Для осуществления процесса дигаплоидизации гаплоидных растений-регенерантов пшеницы их необходимо обработать 0,1% раствором колхицина. Сколько надо взвесить (мг) колхицина для приготовления 200 миллилитров 0,1% раствора колхицина?

Задание 2

Известно, что фитогормон ИУК в концентрации 1,5 мг/л индуцирует процессы эмбриогенеза в культуре пыльников ячменя. Рассчитайте в каком объеме (мл) необходимо будет взять фитогормона из 5% раствора ИУК для приготовления двух литров картофельной питательной среды Potato.

Задание 3

Сколько миллиграммов колхицина необходимо взвесить на весах для приготовления 0,1% раствора колхицина, применяемого для дигаплоидизации гаплоидных растений.

Задание 4

При приготовлении 1 литра стандартной питательной среды Гамбурга-Эвелега (B5) в соответствии с протоколом добавляют 10 мг/л тиамин-НС1 (витамин B_1). Расчитайте сколько миллилитров необходимо будет взять из 5% сток-раствора витамина B_1 для приготовления 1,5 литра питательной среды Гамборга-Эвелега (B5).

Задание 5

Расчитайте в каком объеме (мл) необходимо будет взять макро-элементов из 10-кратно концентрированного сток-раствора объемом 200 мл для приготовления 0,5 литра среды Уайга.

Примечание: расчеты можно производить по одному из макро-элементов – хлориду калия KCl, концентрация которого по прописи составляет 65 мг/л.

Глава 6

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Клеточная инженерия – это метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции. При гибридизации искусственно объединяют клетки с образованием гибридного генома. Сущность этого способа гибридизации заключается в том, что в качестве родительских используют не половые клетки (гаметы), а клетки тела (сомы) растения, из которых изолируют протопласты. При определенном экспериментальном воздействии протопласты заставляют сливаться друг с другом. Из полученных гибридных клеток в дальнейшем регенерируют целые растения – *соматические гибриды*.

Клеточная реконструкция – это создание жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток (ядра, цитоплазмы, митохондрий, хлоропластов, хромосом). В результате таких манипуляций могут быть созданы клетки с необычными сочетаниями ядерных и цитоплазматических генов. Еще больший интерес предоставляет возможность переноса индивидуальных хромосом и создание анеуплоидных линий.

Протопласт является идеальным реципиентом для чужеродной ДНК, которая часто представляет собой плазмиды. Такая трансформация, обеспечивая проникновение и последующую экспрессию этой ДНК, может приводить к образованию генетически модифицированных растений. Таким образом, выделение, культивирование, слияние протопластов и перенос в них клеточных органелл, отдельных хромосом, ДНК позволит генетикам и селек-

ционерам расширить разнообразие получаемых гибридных растений.

Протопласт – клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом. Массовое получение «голых» клеток стало возможным благодаря Э. Кокингу, который в начале 60-х годов разработал способ разрушения клеточной оболочки, не повреждающий живое содержимое клетки, и изолировал отдельные протопласты высших растений. Он обрабатывал кончики корней томата гидролитическим ферментом из культуральной жидкости плесневых грибов и впервые получил изолированные протопласты энзиматическим путем.

Чтобы не повредить содержимое клетки при растворении клеточной стенки, клетку подвергают плазмолизу (рис. 10). В качестве осмотика используются сахароза, маннит, сорбит. Кроме того, высокое осмотическое давление среды выделения протопластов предохраняет их от осмотического шока, поскольку протопласты осмотически нестабильны. Иногда, если клетка вытянутая, протопласт при плазмолизе разбивается на части. В этом случае часть, в которую не попало ядро, называется **цитопластом**, это безъядерный субпротопласт.

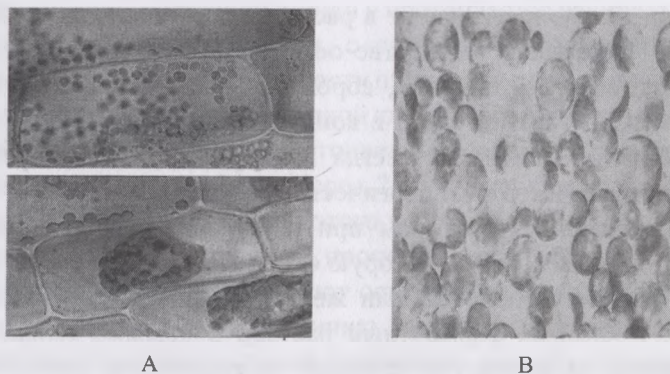


Рисунок 10. Растительная клетка в плазмолизованном состоянии (А) и протопласты, полученные после ферментативного гидролиза (В)

В 1968 г. японский ученый Такебе разработал эффективный метод получения больших количеств активных протопластов из клеток мезофилла табака. Затем этим методом стали выделять протопласты из самых разных тканей различных видов растений. Для удаления клеточной стенки используются ферменты трех типов – пектиназы, целлюлазы и гемицеллюлазы, имеющих различные фирменные названия:

- целлюлаза: Onozyka R-10, Cellulysin, Driselase;
- гемицеллюлаза: Rhozyme HP150, Hemicellulase;
- пектиназа: Macerozyme R-10, Macerase, Pectinol AC, Pectolyase Y23, Pektinase, PATE;
- российские препараты: ЗС, целлокандин и ксиланаза.

Комбинации ферментов и их соотношения специфичны для каждого типа клеток, потому что они отличаются по структуре и составу стенок. Для каждой ткани подбираются состав ферментов, их концентрация и соотношение, а также время воздействия. Выделяющиеся протопласты должны находиться в ферментном растворе минимальное время и затем тщательно отмываются от него.

Важную роль при выделении протопластов играет осмотический стабилизатор. Для того чтобы протопласты сохранили целостность, ферментные растворы должны быть изотоническими или гипертоническими. В некоторых случаях материал предварительно инкубируют в растворе плазмолитика (преплазмолиз). Чаще всего в качестве осмотиков используются сахара (глюкоза, сахароза, ксилоза, сорбит, маннит), иногда растворы солей CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KCl в концентрациях 0,3-0,8 М. Точная концентрация осмотиков всегда подбирается для конкретного вида растения и его физиологического состояния.

Немаловажным фактором при получении протопластов является хорошая аэрация, которую обеспечивают различные перемешивающие устройства, или же ткани инкубируют в чашках Петри, в которых ферментный раствор покрывает только дно. Выделение протопластов проводят на рассеянном свете или в темноте. Время инкубации в зависимости от сочетания ферментов, рН растворов и температуры может колебаться от 1-2 до 15-16

часов. Оптимальную температуру и время инкубации необходимо подбирать для каждой конкретной ткани. Температурные условия могут варьироваться в широких пределах. Так, например, для пшеницы это 14°C, для томатов 27°C.

После энзиматической изоляции протопласты должны быть очищены от остатков неразрушенной ткани и отмыты от ферментов. Для этого обычно применяют технику фильтрации-центрифугирования. Ресуспензируют протопласты либо в солевых растворах, либо в средах с 0,4 М маннита, сорбита, глюкозы и т.д. Часто применяют среды, используемые для дальнейшего культивирования протопластов. Успешное культивирование протопластов с последующей регенерацией из них интактных растений было впервые осуществлено Такебе в 1971 г. В процессе культивирования жизнеспособные протопласты регенерируют клеточную оболочку и превращаются в обычную культивируемую *in vitro* клетку. Предшественники целлюлозы и пектиновые вещества синтезируются в основном в аппарате Гольджи, но, по-видимому, этот процесс может идти и в других клеточных структурах, например, в эндоплазматической сети под контролем ядра. Иногда выделяется протопласт, лишенный ядра, их называют цитопластами. Цитопласты не способны к репарации новой клеточной оболочки.

Образование клеточной стенки у протопластов начинается сразу после отмытки ферментов, с помощью которых они были получены. Скорость и особенности процесса репарации зависят от вида и дифференцировки исходной клетки. Протопласты растений семейства пасленовых, крестоцветных, зонтичных образуют клеточную стенку за 24 ч. Через 24-36 ч наблюдаются первые деления клеток. В результате этого через 3-4 недели образуются колонии каллусных клеток. В процессе культивирования постепенно (через 2 недели) снижают осмотическое давление в культуральной среде, чтобы увеличить скорость деления. Культуру протопластов в жидких средах разбавляют средой с пониженным осмотическим давлением. Затем каллусы пересаживаются на агаризованную среду для регенерации растений. Индукция мор-

фогенеза (стеблей и корней) в каллусе приводит к образованию растений-регенерантов. Регенерация растений может осуществляться и через эмбриоидогенез (рис. 11).

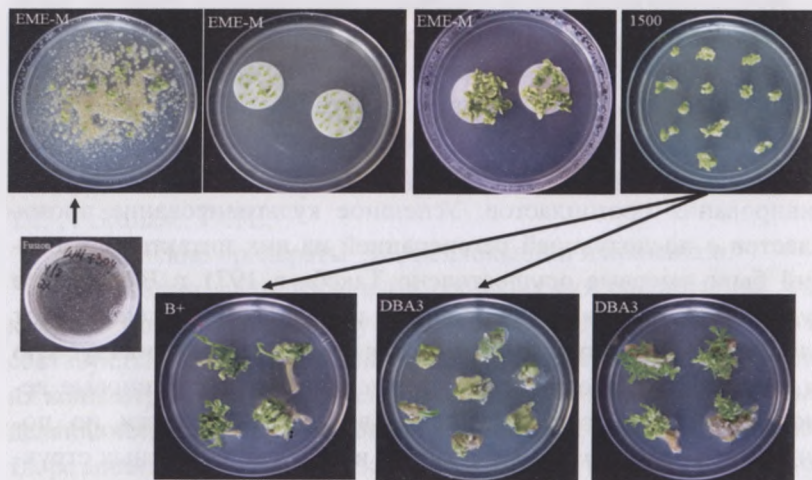


Рисунок 11. Регенерация растений в культуре протопластов картофеля

Способность вновь образованных из изолированных протопластов клеток к делению и реализации тотипотентности зависит от многих факторов:

1) видовая специфичность, физиологическое состояние и состояние дифференцировки исходной ткани, т.е. ее генетическая и эпигенетическая характеристики; 2) условия и способы изолирования протопластов; 3) плотность высева протопластов; 4) состав питательной среды; 5) условия культивирования.

Слияние протопластов. Под термином «клеточная инженерия растений» в узком смысле понимают слияние протопластов. При слиянии протопластов сначала происходит их слипание – **агглютинация**, а затем собственно слияние мембран. Протопласты

имеют отрицательный поверхностный заряд, поэтому взаимно отталкиваются. Для процесса слияния это отталкивание должно быть преодолено или снятием, или перераспределением поверхностного заряда. Для индуцированного слияния протопластов используют химический и электрический методы.

Химический метод заключается в добавлении к суспензии протопластов веществ, стимулирующих слияние. Благодаря широкому поиску эффективного фюзогена (индуктора слияния) был найден полиэтиленгликоль (ПЭГ) – хорошо растворимый в воде полимер. Предварительная обработка суспензии смешанных протопластов концентрированным раствором ПЭГ (20-30%) вызывает их слипание. Через 10-15 мин ПЭГ удаляют отмыванием раствором щелочным рН (9-11) и высоким содержанием Ca^{2+} (100-300 мМ), и в этом растворе мембраны слипшихся протопластов сливаются. Методика «ПЭГ» – высокое рН – высокое содержание Ca^{2+} хорошо зарекомендовала себя и в различных модификациях используется в большинстве лабораторий мира. Применяя эту обработку, удастся вовлечь в слияние более 10% (и даже до 50%) протопластов. Оптимальные результаты зависят от конкретного материала. Существуют различные точки зрения, объясняющие механизм слияния протопластов под влиянием ПЭГ.

Метод имеет свои недостатки. В результате такой обработки часть протопластов повреждается и погибает. Зачастую сливаются не два, а больше протопластов, которые оказываются нежизнеспособными. Кроме того, протопласты, не слившиеся после обработки, часто остаются слипшимися.

В начале 80-х годов был разработан **метод электрослияния**, привлекает внимание довольно высокой частотой слияния (20% и более). При этом для агглютинации и слияния протопластов используют электрическое поле, суспендируя их между двумя электродами. Слияние под действием электрического поля происходит с высокой эффективностью без применения каких-либо химических стимуляторов, при комнатной температуре и физиологических значениях рН. Однако следует отметить, что метод электрослияния требует дорогостоящего оборудования, и поэто-

му многие исследователи для слияния протопластов применяют различные модификации химического метода. На способность протопластов к слиянию действует много факторов. Слияние — это случайный процесс. Частота слияния зависит не от видовой специфичности, а от особенностей ультраструктуры клеток. Так, например, меристематические и каллусные протопласты сливаются легко, а вакуолизованные и с развитыми хлоропластами — труднее.

Клеточная инженерия предполагает создание клеток нового типа не только на основе гибридизации целых клеток, но и путем *реконструкции клетки* из отдельных фрагментов разных клеток. Генетическая реконструкция растительной клетки путем введения в нее изолированных клеточных органелл (ядра, хлоропласты и митохондрии) привлекает внимание ученых, потому что она позволила бы целенаправленно передавать признаки, кодируемые цитоплазмой, и создавать новые формы хозяйственно важных сортов. Так, включение высокоэффективных хлоропластов может способствовать активации фотосинтеза и повышению продуктивности растения. Хлоропласты кодируют такие признаки, как устойчивость к гербицидам, иммунитет к некоторым болезням, реакцию на токсины. Сливая протопласты с митохондриями, контролирующими цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС), можно придать растению этот ценный признак.

Протопласты можно культивировать различными способами, применение того или иного метода культивирования зависит от цели эксперимента. Перед посадкой промытые протопласты суспендируют в определенном объеме среды для культивирования и подсчитывают. Затем плотность протопластов доводят до требуемой, хотя оптимальная плотность в каждом случае определяется экспериментально.

При культивировании протопластов *в жидкой среде* используют различные приемы. Для успешного культивирования протопластов в жидкой среде, так же, как и изолированных клеток, требуется высокая плотность. В большинстве случаев эта вели-

чина составляет 10^4 - 10^5 клеток/мл, а объем культуры 2,5-10 мл. Неспособность их расти в разбавленных суспензиях связана с утечкой из клеток каких-то важных метаболитов. Чтобы обеспечить «кондиционирование» клеток в разбавленной культуре, либо используют «питательный, или кормящий, слой», либо применяют обогащенные питательные среды, либо уменьшают до минимума объем культуры.

Широко используется метод культивирования протопластов в жидких каплях объемом 20-40 мкл при высокой влажности. Капли могут быть висячие либо сидячие. С помощью автоматической пипетки протопласты распределяются по маленьким каплям на крышке или на дне чашки Петри.

В 1978 г. Ю.Ю. Глеба разработал и успешно использует в своих работах культивирование единичных протопластов в микрокаплях питательной среды объемом до 1 мкл. В микрокаплях такого объема, если в них находится лишь одна клетка, соотношение объема клетки к объему питательной среды является таким же, как и в макрокультурах с плотностью 10^3 клеток/мл.

Суспензию протопластов культивируют также в жидкой среде, наслаивая ее тонким слоем в концентрации в два раза больше, чем оптимальная, на полужидкую питательную среду в самых разных сосудах. Протопласты можно культивировать и на агаризованной среде, но не поверхностным способом, а заплывая в него. Суспензию протопластов смешивают в чашке Петри с равным объемом теплой (45°C) среды, содержащей 1,2% агара. После застывания среды протопласты оказываются фиксированными в одном положении и физически отделены один от другого. Этот метод платирования протопластов в агаре позволяет наблюдать за поведением каждого конкретного протопласта по мере культивирования.

После второго-третьего деления клетки начинают страдать от дефицита питательных веществ, и, если не обогатить среду, происходит торможение деления и даже гибель клеток. Существуют два пути обогащения среды питательными веществами во время культивирования – добавление по каплям концентрированной

среды в чашки Петри и применение твердого подпитывающего слоя. Для культивирования протопластов применяют те же питательные среды, что и для культивирования клеток и тканей. Существенным отличием сред для культивирования протопластов является увеличение в 2-4 раза концентрации кальция и добавление осмотиков (0,4-0,8 М). Широко распространены следующие среды: модифицированная среда Мурасиге и Скуга, чаще называемая средой Нагата и Такебе; среда Гамборга В5 и среда Као и Михайлюка, представляющая собой среду Гамборга В5, сильно обогащенную витаминами, аминокислотами и сахарами, иногда с более сложным составом фитогормонов. При этом сахара используются не только в качестве осмотиков, но и для стимуляции образования клеточной стенки (ксилоза, рибоза, целлобиоза, манноза, рамноза).

Температура культивирования в значительной степени зависит от специфики вида и колеблется от 15 до 30°C. Обычно протопласты очень требовательны к температуре. Колебания освещенности для разных видов растений составляет от 0 (темнота) до 2000 лк.

Принципы соматической гибридизации.

Слияние протопластов (engl. – fusion) соматических клеток растений благодаря их тотипотентности приводит к получению гибридного организма. Поэтому этот метод является инструментом не только генетического анализа, но и генетического улучшения растений.

Половое скрещивание – это очень ограниченная и строго регламентированная система гибридизации, где в качестве родительских форм можно использовать лишь определенные организмы в определенных сочетаниях. Половой процесс симметричен: гаметы обоих родителей приносят в зиготы одинаковые гаплоидные наборы ядерного генетического материала. Каждое отдельное растение-потомок несет равные количества генов от обоих родителей. Внеядерная генетическая информация, находящаяся в хлоропластах и митохондриях, у большинства высших растений в половом процессе наследуется строго однопородитель-

ски и по материнской линии. Половая гибридизация ограничена физиологически близкими комбинациями видов растений. Только путем постоянного расширения генетического базиса можно обеспечить эффективность селекции в будущем. Расширение генетического базиса культурных растений возможно через получение межвидовых и межродовых гибридов. Особенно важна для передачи генов от диких растений культурным межвидовая гибридизация.

Соматическая гибридизация является новым способом гибридизации, позволяющим преодолевать ограничения полового процесса и искусственно конструировать новые растения. Соматическая гибридизация позволяет:

1) скрещивать филогенетически отдаленные виды растений (организмов), которые невозможно скрестить обычным половым путем;

2) получать асимметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами (или несколькими генами, или только оргanelлами и цитоплазмой) другого;

3) создать систему гибридизации, включающую одновременное слияние трех и более родительских клеток;

4) получать гибриды, представляющие собой в генетическом смысле сумму идиотипов родителей;

5) получать растения, гетерозиготные по внеядерным генам;

6) преодолевать ограничения, налагаемые генеративными системами несовместимости;

7) скрещивать формы, которые невозможно гибридизовать половым путем из-за аномалий в морфогенезе или гаметогенезе родителей;

8) гибридизовать клетки, несущие различные эпигенетические программы.

Таким образом, соматическая, или парасексуальная, гибридизация является уникальным методом переноса ядерных и цитоплазматических геномов, позволяющим обойти проблему половой несовместимости у растений.

При слиянии двух протопластов *истинная гибридная клетка (ядерный гибрид)* образуется, если сливаются ядра. Клетка, в которой слияние ядер не произошло, называется *гетерекарионом*. Интересны возможности реконструкции растительной клетки путем такой гибридизации, когда в качестве одного или обоих родителей используются субпротопласты. *Субпротопласт* – это часть протопласта, окруженная цитоплазматической мембраной и несущая некоторые из органоидов клетки: *ядро-нуклеопласт*, протопласт без ядра – *цитопласт*, ядро и часть протоплазмы – *мини-протопласты*. Для пересадки пластид и митохондрий от одного вида другому могут использоваться цитопласты.

Гибрид, несущий гены ядра только одного родителя наряду с цитоплазматическими (внеядерными) генами от обоих либо от одного из родителей, называется *цитоплазматическим (цибрид)*. *Цитогеты* – *цитоплазматические гетерозиготы* – гибриды, несущие альтернативные цитоплазматические гены от обоих родителей (рис.12).

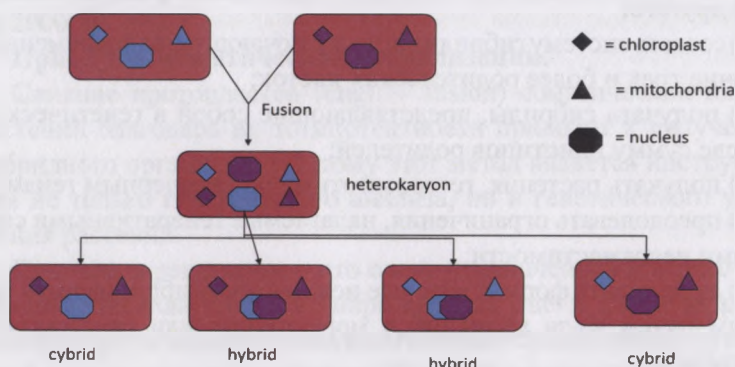


Рисунок 12. Схема соматической гибридизации растений

Культура гибридных клеток с получением каллусной ткани и индукцией в ней органогенеза дает возможность получить гибридное растение-регенерант. Первым гибридом высших растений,

полученным методом соматической гибридизации П. Карлсоном с сотрудниками в 1972 г., был межвидовой гибрид *Nicotiana glauca* и *N. langsdorfii*. Из гибридных клеток был получен каллус, индукция органогенеза у которого дала проростки, из этих проростков были выращены гибридные растения, которые цвели. Эти гибриды были идентичны амфидиплоидным (по одному диплоидному набору хромосом от каждого родителя) половым гибридам по морфологии, числу хромосом, изозимному составу пероксидазы. Таким образом, выделение, культивирование, слияние протопластов, а также перенос в них отдельных клеточных органелл позволит генетикам и селекционерам расширить разнообразие получаемых гибридных растений.

Генетические основы соматической гибридизации.

Метод парасексуальной гибридизации, являясь всецело искусственным, привлекает большое внимание и вселяет надежду на получение уникальных заданных сочетаний генов, поэтому большинство исследователей использовали соматическую гибридизацию с целью скрестить нескрещиваемое и получить гибриды с новыми наборами генов. Соматическая гибридизация является очень сложным, непредсказуемым и слабоуправляемым процессом. Генотип соматических гибридов является результатом целого ряда событий, способных приводить к генетическим изменениям. После слияния двух протопластов в лучшем случае в них может независимо друг от друга и в разное время произойти слияние ядер, слияние хлоропластов и митохондрий и обмен генетической информацией. Но вполне возможен и любой другой ход событий: неслияние ядер, неслияние органелл, частичное разрушение органоидов того или иного родителя. При культивировании слившихся протопластов в процессе митотического деления клеток может произойти сегрегация (удаление) ядра и других органоидов, частичная элиминация хромосом, селективное (выборочное) размножение органоидов того или иного родителя. Кроме того, на эти процессы может накладываться генетическая нестабильность и мутационные процессы, обусловленные гибридизацией, а также генетическая изменчивость, свой-

ственная клеткам. Правильному образованию гибридных клеток может мешать сочетание целого ряда факторов: 1) нестабильность одного или нескольких компонентов после обработки, вызывающей слияние; 2) присущая одному или обоим родительским протопластам низкая эффективность посева; 3) асинхронное деление ядер; 4) неполное слияние цитоплазмы из-за наличия вакуолей; 5) потеря хромосом при последовательных митозах; 6) гибель гибридных клеток при низкой плотности посева.

Ю.Ю. Глеба с сотрудниками провел специальное исследование поведения ядерных генов при гибридизации путем слияния протопластов табака одного и того же вида, они применили механическую изоляцию и культивирование индивидуальных продуктов слияния – метод, который позволяет клонировать индивидуальные генетические события и изучать большое количество потомков из каждого клона. В качестве одного из родителей они использовали клетки старой каллусной линии табака сорта Ксанти, потерявшей способность к морфогенезу и устойчивой к 5-метилтриптофану. В качестве другого родителя использовали мезофильные клетки амфигаплоидных ($n=24$, имеющих по одному гаплоидному набору хромосом от каждого родителя) и амфидиплоидных растений табака сорта Роза, гомозиготные по рецессивному гену чувствительности к свету. В двух независимых экспериментах были изолированы механическим путем 13 единичных продуктов слияния каллусных протопластов с гаплоидными мезофильными клетками и 12 продуктов слияния каллусных клеток с диплоидными мезофильными клетками. Кроме того, были изолированы единичные родительские каллусные (12 клеток) и мезофильные гаплоидные (6 клеток) протопласты. Из всех колоний, полученных из родительских мезофильных протопластов, и колоний, регенерировавших из продуктов слияния, удалось получить целые растения. Только клетки одной линии, полученной из продукта слияния, не дали нормальных растений. Также не образовались растения из каллусных протопластов первого родителя, поскольку родительская каллусная линия утратила способность к морфогенезу. Всего было получено около

350 взрослых растений (по 5-25 из каждого клеточного клона), которые были разбиты на несколько групп клонов с общими характеристиками: А, Б, В.

Растения группы А, полученные из 4 клонов, имели признаки обеих родительских форм. Устойчивость к свету, частичная устойчивость к аналогу триптофана, анеуплоидность и хромосомная нестабильность – признаки клеток каллусной ткани; нормальный морфогенез и сидячий тип листьев – признаки клеток растений сорта Роза. Хромосомные числа этих растений соответствовали более или менее простой сумме хромосомных наборов родительских клеток. Таким образом, эти растения являются истинными гибридами, то есть слияние клеток сопровождалось слиянием (объединением) их ядер.

Растения, полученные из 14 клонов и отнесенные к группе Б, были морфологически нормальными и по всем своим признакам (исключая пестролистность, которая не связана с ядром) были сходны с одной из родительских форм. Выращивание растений на сильном свете сопровождалось их обесцвечиванием, что указывает на их чувствительность к свету. В корешках содержались строго гаплоидные либо диплоидные хромосомные наборы. Это значит, что в продуктах слияния, давших начало клонам группы Б, ядра двух родительских клеток не слились и позже сегрегировали в различные дочерние клетки. На этапе регенерации дали растения только клетки, содержавшие ядра от клеток сорта Роза, способные к морфогенезу.

К группе В были отнесены растения от клонов из двух продуктов слияния. Среди регенерантов каждого из этих клонов наблюдалась гетерогенность, то есть были обнаружены как растения, сходные с растениями из группы А, так и формы, похожие на растения группы Б. Растения, регенерированные из клонов, полученных от индивидуальных родительских гаплоидных мезофильных протопластов, оказывались сходными во всех отношениях с исходным материалом сорта Роза, за исключением того, что у большинства регенерантов имела место диплоидизация.

Из результатов проведенных экспериментов Ю.Ю. Глеба делает главный вывод, что *при гибридизации растений путем слияния протопластов ядерные генетические детерминанты наследуются как двуродительски, так и однородительски*. Последнее, очевидно, является результатом неслияния ядер с их последующей сегрегацией в процессе клеточных делений в гетерокарионах. Такая сегрегация наблюдается в случае как внутривидовых, так и межвидовых комбинаций. При гибридизации растений путем слияния протопластов некоторые внеядерные генетические детерминанты наследуются двуродительски. Как оказалось, двуродительское наследование внеядерных генов имеет место при межвидовой гибридизации.

В последующих экспериментах этих и других авторов было однозначно доказано, что с помощью слияния протопластов возможно получение цитоплазматических гетерозигот гибридных растений, несущих внеядерные гены от обоих родителей. *Соматическая гибридизация является методом получения цитоплазматических гетерозигот*. В процессе митотического размножения клеток для плазматических генов характерна сегрегация, что должно в итоге приводить к выщеплениям (появлению) чистых родительских форм, гомозиготных по тому или иному плазматическому гену (если не происходит их рекомбинация). Во всех работах, где изучались пластиды у большого числа гибридных растений, наблюдалось выщепление не одного, а обоих родительских типов пластид. Это говорит о случайной сегрегации и об отсутствии селективного давления на органоидном уровне (для этого типа органоидов) в цитоплазматических гетерозиготах. В процессе сегрегации кодируемые пластидами признаки (пластидная хлорофиллдефектность, устойчивость к стрептомицину, тентоксину, атразину, полипептидное строение большой субъединицы РубФК, а также рестриктивные спектры хлоропластной ДНК) сегрегируют группами, т.е. косегрегируют. На процесс удаления родительских хлоропластов в популяции соматических гибридов, возможно, оказывают сильное влияние факторы, сопутствующие слиянию протопластов и последующему отбору и регенерации гибридов.

Таким образом, соматические гибриды, в отличие от половых, обладают большей изменчивостью. Фенотипическая изменчивость, которая наблюдается у соматических гибридов, является отражением генетических явлений, происходящих до регенерации растений. Д. Эванс и Е. Фликс причины изменчивости видят в следующем: 1) ядерная несовместимость; 2) митотическая рекомбинация; 3) органоидные расщепления; 4) сома-клональная изменчивость.

Получение гибридов между видами растений, относящимися к различным семействам, трибам (таксономическая единица, занимающая промежуточное положение между семейством и родом) и родам, с помощью полового скрещивания невозможно. Гибридизация клеток филогенетически отдаленных видов растений осуществлена только путем слияния протопластов. Однако при этом не удавалось получить полноценные фертильные растения. Среди межродовых соматических гибридов наибольший интерес вызывает гибрид картофеля с томатом. Первый такой гибрид получил Г. Мельхерс в 1978 г., позже и другие ученые. Растения-регенеранты (помато, томафель) имели гибридный ядерный материал, но были стерильными. Морфологически ненормальные растения получались также при парасексуальной гибридизации травянистых и древесных видов дурмана, относящихся к разным родам. Большим достижением японских исследователей является соматический гибрид от слияния протопластов риса и проса, растений, относящихся к разным трибам семейства злаковых, который обладал признаками обоих видов. Особый интерес представляет то, что эти растения принадлежат к однодольным.

Методы селекции соматических гибридов.

Отбор единичных гетерокарионов и гибридных протопластов среди массы родительских протопластов является непростой задачей. Поэтому поначалу исследователи осуществляли селекцию гибридов на уровне растений-регенерантов по принципу комплементарности мутаций. Так, Г. Мелхерс и Г. Лабиб в 1974 г. для доказательства гибридной природы растений, регенериро-

вавших из гибридных клеток, использовали генетическую комплементацию. **Генетическая комплементация** – это такое взаимодействие генов в гибридной клетке, вследствие которого восстанавливается функция дефектных генов. В качестве родительских линий использовались два сорта *Nicotiana tabacum*, которые отличались дефектными светочувствительными хлоропластами. У каждого сорта ядерный геном содержал рецессивный ген (V и S), вызывающий светозависимую хлорофилльную недостаточность. Растения, гомозиготные по любому из этих генов, выращиваемые при интенсивном освещении, обесцвечиваются и гибнут. Половые гибриды имели нормальные хлоропласты, потому что мутации в их клетках комплементировали. Такой же результат был получен путем слияния гаплоидных протопластов обоих сортов.

Помимо хлорофилльных мутантов, для селекции парасексуальных гибридов методом генетической комплементации используются и другие мутанты, например ауксотрофные. **Ауксотрофы** – это биохимические мутанты клеток, которые вследствие мутации утратили способность расти на обычной питательной среде и требуют добавления какого-либо вещества, синтез которого у них блокирован мутацией. Так, например, О. Шидер выделил один гибрид мха печеночника, сливая протопласты мужского штамма, ауксотрофного по глюкозе, с протопластами женского штамма, дефектного по никотиновой кислоте.

Другим методом отбора гибридных клеток является **физиологическая комплементация**. Под этим термином понимают способность гибридных клеток жить и размножаться либо переходить к организованному росту (морфогенезу) в условиях культуры, при которых родительские клетки этого делать не в состоянии. Эта способность родителей к росту и морфогенезу не связана с мутацией, а является нормальной физиологической реакцией на внешние условия. Первым успешно использовали этот метод П. Карлсон с сотрудниками в 1972 г., получившие межвидовой соматический гибрид *Nicotiana glauca* и *N. langsdorffii*. Половые гибриды между этими видами были получены раньше,

и было установлено, что клетки этих растений не нуждались в ауксине. Клетки же родительских видов в культуре были ауксинозависимыми. Протопласты из мезофилла листа обоих видов подвергали слиянию и помещали на среду, лишенную ауксина. Клетки, способные расти в этих условиях, были гибридными.

Существуют и другие подходы селекции гибридных клеток после слияния протопластов, которые можно использовать в том случае, когда нет специфических генетических маркеров или не изучена возможность применения физиологической комплементации. Эти методы состоят в инактивации протопластов перед слиянием ядами, подавляющими метаболизм клетки. Функционирование клеток может быть восстановлено путем слияния с другими клетками, инактивированными другими ядами, т.е. своеобразная *биохимическая комплементация*. Для инактивации клеток, помимо ядов, может применяться облучение.

Селекция и дальнейшее культивирование в микрокаплях отдельных ге-терокариоцитов (гибридных клеток) является в то же время и методом клонирования, т.е. получением популяции клеток от одной клетки. Клонирование отдельных продуктов слияния протопластов гарантирует получение гибридных растений.

Методы анализа гибридных растений.

Гибридность продуктов слияния протопластов проверяют и подтверждают различными способами. Для этого используются *генетические и биохимические методы анализа*.

Одним из методов генетического анализа является *гибридологический анализ*, который состоит в точном статистическом учете расщепления по фенотипу потомков, полученных от скрещивания специально подобранных форм. Если при соматической гибридизации использовались рецессивные мутанты, то при последующем самоопылении (половое размножение) гибрида мутации должны выщепляться и фенотипически выражаться в F_1 . Такого рода анализ позволяет подтвердить гибридную природу полученных форм растений. Однако поведение ядерных генов парасексуальных гибридов в половых (гибридологических) скрещиваниях изучено очень слабо.

Значительно чаще гибриды подвергаются *цитогенетическому изучению*, то есть исследуются число и морфология хромосом. Этот метод более доказателен для дальнеродственных гибридов (межтрибных, межсемейственных), у родителей которых хромосомы достаточно различаются между собой. Для видов, у которых хромосомы морфологически не отличаются, подходит *метод дифференциального окрашивания*. Он выявляет специфическую исчерченность хромосом, характерную для каждой пары гомологичных хромосом. Цитогенетический анализ не всегда надежен из-за высокой хромосомной вариабельности клеток *in vitro*.

Биохимические методы анализа широко применяются большинством исследователей, особенно для межвидовых гибридов. Изучение *изозимных форм с помощью электрофореза* в полиакриламидном геле (ПААГ) и последующей окраски белков с определенной ферментативной активностью является наиболее простым и эффективным способом биохимического анализа парасексуальных гибридов. С этой целью исследуются спектры изоферментов пероксидазы, эстеразы, малатдегидрогеназы, лак-татдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, амилазы и других ферментов. Одним из наиболее глубоких, достоверных и доступных методов биохимического анализа соматических гибридов является анализ РубФК. Это самый распространенный и наиболее изученный белок растений, который является ключевым ферментом цикла Кальвина. Этот белок состоит из 8 больших и 8 малых субъединиц, полипептиды больших субъединиц кодируются хлоропластной ДНК, малых – ядерной ДНК. Изучение полипептидного состава субъединиц с помощью изоэлектрофокусирования в полиакриламидном геле позволяет обнаружить различия в строении полипептидов белка у разных видов растений. Такого рода исследования проведены у целого ряда межвидовых соматических гибридов с целью установления их гибридной природы. Анализ РубФК также с успехом применяется при изучении судьбы внеядерных генов при парасексуальной гибридизации. Для этих же целей выделяются

и исследуются хлоропластные и митохондриальные ДНК гибридов и их родителей. Эти ДНК подвергаются действию ферментов – нуклеаз, которые расщепляют их в самых различных специфических местах. Рестриктивные спектры, получаемые в результате электрофореза образовавшихся при разрезании фрагментов ДНК, видоспецифичны и могут быть использованы для характеристики ДНК органелл и для изучения гибридности по цитоплазмону, а также судьбы родительских пластов и митохондрий при соматической гибридизации. Для анализа соматических гибридов может применяться также *метод молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот* – как ДНК-ДНК, так и ДНК-РНК. Критерий молекулярной гибридизуемости важен при изучении гибридов филогенетически отдаленных видов, а также асимметричных гибридов.

Соматическая гибридизация применяется как для фундаментальных исследований в области цитологии, молекулярной генетики, физиологии растений, так и в практической селекции. Гибридизация соматических клеток является принципиально новой технологией для селекционного процесса. Она позволяет скрещивать формы и виды растений, для которых скрещивание половым путем невозможно, то есть преодолевать несовместимость при межвидовой гибридизации. Даже в том случае, если половая гибридизация возможна, соматические гибриды имеют преимущества по сравнению с половыми, потому что они наследуют внеядерные гены двуродительски.

Очень ценны для селекции также *асимметричные гибриды*, содержащие один полный геном и только несколько хромосом другого родителя. Для получения таких гибридов нужна направленная элиминация хромосом одного из родителей после слияния. Это осуществляется радиоактивным облучением протопластов этого родителя с целью дестабилизации хромосом. В зависимости от дозы и продолжительности облучения может произойти полная инактивация ядер. Слияние таких протопластов с нормальными даст *цибрид* – цитоплазматический гибрид, то есть гибрид, унаследовавший ядро (ядерные гены) одного

из родителей наряду с цитоплазматическими генами обоих родителей или одного из них. Глубокоасимметричные гибридные клетки, несущие только небольшие фрагменты хромосом от одного из родителей наряду с полным набором генов другого, можно получить при гибридизации филогенетически отдаленных видов. Поскольку регенерация полноценных фертильных растений при этом невозможна, то эти гибридные клетки могут быть использованы на практике для селекции новых клеточных линий – продуцентов экономически важных веществ.

Такие признаки, как мужская стерильность, устойчивость к некоторым гербицидам и токсинам, эффективность фотосинтеза и др., наследуются цитоплазматически. Техника парасексуальной гибридизации позволяет манипулировать цитоплазматическими генами и получать растения, несущие часть цитоплазмона (например, пластом) от одного вида наряду с частью от другого (например, митохондрии). Пересадка цитоплазмона подобным образом проведена для табака, петунии. Очень заманчиво использовать этот прием для пересадки признака устойчивости к гербициду от диких сородичей к культурным растениям, в частности к культурному картофелю, который чувствителен ко всем без исключения гербицидам. Подобные эксперименты с крестоцветными доказали возможность получения реконструированных растений методом соматической гибридизации.

Вопросы для контроля:

1. Что представляет собой клеточная инженерия и как она осуществляется?
2. Как выделяются протопласты?
3. Как определяют жизнеспособность протопластов? Какие факторы влияют на нее?
4. Какими способами культивируют протопласты?
5. Какие факторы определяют регенерацию растений из протопластов?
6. Методы слияния изолированных протопластов.
7. В чем преимущества соматической гибридизации по сравнению с половой?
8. Что происходит с ядерным геномом при соматической гибридизации?
9. Как ведут себя хлоропластные и митохондриальные гены при соматической гибридизации?

10. Как осуществляется отбор гибридных клеток и растений?
11. Генетические методы анализа соматических гибридов.
12. Биохимические методы анализа соматических гибридов.
13. В каких целях используется соматическая гибридизация?
14. Что ограничивает применение соматической гибридизации?

6.1 Тестовые задания к главе 6 «Клеточная инженерия»

1. Регенерацию растений из протопластов определяют следующие факторы (укажите неверный ответ):

- A) Физиологическое состояние исходной ткани;
- B) Видовая специфичность растений;
- C) Обработка протопластов мутагенам;
- D) Плотность посева протопластов;
- E) Состав питательной среды;
- F) Увеличение содержания воды;
- G) Влияние климатических факторов;
- H) Способность к дифференциации.

2. Соматическая гибридизация позволяет (укажите неверный ответ):

- A) Скрещивать филогенетически отдаленные виды растений;
- B) Получать асимметричные гибриды;
- C) Получать гибриды гетерозиготные по внеядерным генам;
- D) Преодолевать несовместимость;
- E) Получать гибриды с определенными заданными свойствами;
- F) Получать гомозиготные гибриды;
- G) Получать симметричные гибриды;
- H) Устранять постгамную несовместимость.

3. Количественную оценку выживаемости клеток после действия мутагенов проводят:

- A) Методом мацерации клеток;
- B) По способности клеток к росту;
- C) Путем фиксации клеток;
- D) Окрашиванием клеток витальными красителями;
- E) Оценивая тотипотентность клеток;
- F) Окрашиванием клеток прижизненными красителями;

- G) Окрашиванием клеток флуоресцентными красителями;
- H) Путем криоконсервации.

4. Наиболее подходящей для получения протопластов фазой роста клеток в суспензионной культуре является:

- A) Логарифмическая фаза;
- B) Латентная фаза;
- C) Фаза замедления роста;
- D) Стационарная фаза;
- E) Фаза ускорения роста;
- F) log-фаза;
- G) Линейная фаза;
- H) Фаза, следующая за фазой адаптации.

5. К способам слияния протопластов относятся:

- A) Действие азотнокислого кальция;
- B) Действие хлористого кальция и азотнокислого натрия;
- C) Действие полиэтиленгликоля;
- D) Действие электрического тока;
- E) Действие ПААГ;
- F) Действие хлористого натрия;
- G) Действие азотнокислого магния;
- H) Действие УФ-излучения.

6. Клеточная инженерия основана на следующем методическом подходе:

- A) Слиянии протопластов;
- B) Агглютинации протопластов;
- C) Слиянии отдельных органоидов;
- D) Слиянии немембранных структур клетки;
- E) Трансформации генов;
- F) Глубоком замораживании клеток;
- G) Реакции преципитации;
- H) Культивировании половых клеток.

7. Соматический гибрид – это:

- A) Гибрид, образовавшийся в результате слияния соматических клеток;
- B) Растение, появившееся в результате соматической изменчивости;

С) Зародышеподобная структура, образовавшаяся в результате соматического эмбриогенеза;

Д) Гибрид, образовавшийся в результате объединения гомозиготной материнской клетки с гетерозиготной отцовской клеткой;

Е) Гибрид, образовавшийся в результате объединения материнской клетки несущей рецессивные признаки с отцовской клеткой несущей доминантные признаки;

Ф) Гибрид, полученный с помощью клеточной инженерии;

Г) Генетическая копия растения-донора экспланта;

Н) Растение, образовавшееся в результате соматической гибридизации.

8. Для получения протопластов обычно используют следующие ферменты:

А) Целлюлаза, каталаза;

В) Каталаза, пероксидаза;

С) Лигаза, изомераза;

Д) Целлюлаза, пектиназа;

Е) Протеиназа, липаза;

Ф) Гемицеллюлаза, пектиназа;

Г) Рестриктаза, лигаза;

Н) Целлюлаза, гемицеллюлаза.

9. Цитопласт – это:

А) Растительная клетка, лишенная клеточной стенки;

В) Гибридная клетка, образовавшаяся после слияния двух и более субпротопластов;

С) Клетка, образовавшаяся в результате слияния цитопласта одной клетки и ядра другой клетки;

Д) Гетерокарион;

Е) Растительная клетка, лишенная клеточной стенки и ядра;

Ф) Протопласт без ядра;

Г) Гибридная клетка, продуцирующая моноклональные антитела;

Н) Субпротопласт, лишенный ядра.

10. Методы анализа и отбора соматических гибридов (укажите неверный ответ):

А) Физиологическая комплементация;

В) Генетическая комплементация;

С) По продукту экспрессии чужеродного гена;

- D) Биохимическая комплементация;
- E) По результатам культивирования на среде с антибиотиком;
- F) Гибринологический анализ;
- G) Отбор на среде с мутагеном;
- H) Цито-генетический анализ.

11. Соматические гибриды получают:

- A) Путем слияния соматических клеток;
- B) Путем гибридизации эмбриоидов;
- C) Путем слияния половых клеток;
- D) Слиянием гамет;
- E) Непрямой селекцией устойчивых клеток на средах с токсичными концентрациями солей;
- F) Путем слияния протопластов;
- G) Путем генетической трансформации;
- H) Слиянием соматических клеток под воздействием электрического тока.

12. Соматическая гибридизация позволяет (укажите неверный ответ):

- A) Скрещивать филогенетически отдаленные виды растений;
- B) Получать асимметричные гибриды;
- C) Получать цитоплазматические гибриды;
- D) Получать половые гибриды;
- E) Получать соматические гибриды;
- F) Преодоление прогамной несовместимости;
- G) Получение гетерозисных гибридов;
- H) Получать симметричные гибриды.

13. Преимущества соматической гибридизации (укажите неверный ответ):

- A) Преодоление прогамной несовместимости;
- B) Преодоление постгамной несовместимости;
- C) Получение цитоплазматических гибридов;
- D) Получение асимметричных гибридов;
- E) Получение симметричных гибридов;
- F) Получение половых гибридов;
- G) Получение соматических гибридных растений;
- H) Получение межвидовых гибридов.

14. Протопласты культивируют:

- A) В питательной среде продуваемой стерильным воздухом;
- B) В открытом сосуде в постоянном объеме питательной среды;
- C) Непрерывно снабжая свежей питательной средой;
- D) В каплях питательной среды;
- E) На твердой агаризованной питательной среде;
- F) В микрокаплях питательной среды;
- G) В жидком азоте;
- H) В суспензионной культуре (в жидкой питательной среде).

15. Соматональные варианты – это:

- A) Соматические гибриды;
- B) Растения-регенеранты, являющиеся генетической копией растения – донора экспланта;
- C) Растения, возникающие при традиционном вегетативном размножении;
- D) Растений, полученные методом генетической инженерии;
- E) Растения-регенеранты, отклоняющиеся от растения – донора экспланта;
- F) Растения взятые для введения в культуру;
- G) Соматические гибриды, полученные в результате длительного культивирования и отклоняющиеся от родительских форм;
- H) Растения фенотипически различающиеся друг от друга вследствие проявления генетической изменчивости.

16. Цитогета – это:

- A) Клетка, содержащая генетически разнокачественные митохондрии;
- B) Клетка, содержащая генетически разнокачественные пластиды;
- C) Клетка, содержащая пластиды одного и митохондрии другого биологического вида;
- D) Цитоплазматическая гомозигота;
- E) Клетка, содержащая ядра двух видов;
- F) Клетка, в которой не произошло слияния ядер двух видов;
- G) Организм, состоящий из двух или более генотипов;
- H) Субпротопласт, в котором имеется только ядро.

17. Гетерокарион – это:

- A) Клетка, содержащая хлоропласты одного биологического вида и ядро другого вида;

В) Клетка, содержащая митохондрии одного биологического вида и ядро другого вида;

С) Клетка, содержащая хлоропласты одного, митохондрии второго и ядро третьего биологического вида;

Д) Гибридная клетка, в которой не произошло слияния ядер двух видов;

Е) Клетка, содержащая генетически разнокачественные митохондрии;

Ф) Клетка, содержащая пластиды одного и митохондрии другого биологического вида;

Г) Соматическая гибридная клетка с ядрами двух видов;

Н) Гибридная клетка, содержащая ядра двух видов.

18. К биоинженерным методам относятся:

А) Клеточная инженерия;

В) Биометрия;

С) Криоконсервация;

Д) Методы гаплоидной технологии;

Е) Генная инженерия;

Ф) Тканевая инженерия;

Г) Эмбриокультура;

Н) Клональное микроразмножение.

19. Следующие этапы работ не применяются в клеточной инженерии растений:

А) Выделение и культивирование протопластов;

В) Слияние протопластов;

С) Реконструирование клеток и создание клеток нового типа;

Д) Получение растений-регенерантов из культуры гибридных клеток;

Е) Введение чужеродного гена в геном растения;

Ф) Культивирование соматических клеток в условиях *in vitro*;

Г) Гибридизация половых клеток;

Н) Культивирование соматических клеток в условиях *in vivo*.

20. К биотехнологическим методам/технологиям, используемым в биотехнологии растений относятся (укажите неверный ответ):

А) Генная инженерия;

В) Клеточная инженерия;

С) Инженерная энзимология;

Д) Хромосомная инженерия;

Е) Криосохранение;

- F) Технология получения гибридом;
- G) Серологический метод;
- H) Метод культивирования стволовых клеток *in vitro*.

21. Слияние соматических клеток называется (укажите неверный ответ):

- A) Неполовая гибридизация;
- B) Асимметричная гибридизация;
- C) Соматическая гибридизация;
- D) Парасексуальная гибридизация;
- E) Слияние протопластов *in vitro*;
- F) Симметричная гибридизация;
- G) Сексуальная гибридизация;
- H) Половая гибридизация.

22. К биоинженерным методам не относится:

- A) Инженерная энзимология;
- B) Генная инженерия;
- C) Клеточная инженерия;
- D) Хромосомная инженерия;
- E) Масс-спектрометрия;
- F) Тканевая инженерия;
- G) Спектрофотометрия;
- H) Криосохранение.

23. Этапы клеточной реконструкции (укажите неверный ответ):

- A) выделение клеток и органоидов;
- B) «конструирование» клеток;
- C) культивирование клеток в условиях *in vitro*;
- D) индукция деления реконструированных клеток;
- E) получение морфогенных структур из реконструированных клеток;
- F) обработка мутагенными агентами;
- G) получение ген-модифицированных клеток;
- H) культивирование клеток в условиях *in vivo*.

24. Метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции называется:

- A) инженерная энзимология;
- B) клеточная инженерия;

- С) клеточная селекция;
- Д) эмбриоинженерия;
- Е) генная инженерия;
- Ф) соматическая гибридизация и клеточная реконструкция;
- Г) биоинженерный метод;
- Н) гаплоидная технология.

25. Методы, применяемые в клеточной инженерии (укажите неверный (-ые) ответ (ы)):

- А) получение растения-регенеранта из культивируемых *in vitro* гибридных клеток;
- В) реконструкция клеток растений;
- С) гибридизация соматических клеток растений;
- Д) выделение и культивирование протопластов;
- Е) введение чужеродного гена;
- Ф) черенкование растений;
- Г) иммобилизация клеток;
- Н) слияние протопластов.

26. Что не относится к клеточной инженерии?

- А) выделение и культивирование протопластов;
- В) слияние протопластов;
- С) реконструкция клеток растений, создание клеток нового типа;
- Д) получение растения-регенеранта из культивируемых *in vitro* гибридных клеток;
- Е) введение чужеродного гена в геном растения.

27. Процесс слияния соматических клеток называется:

- А) трансгенез;
- В) регенерация;
- С) соматическая гибридизация;
- Д) дедифференциация;
- Е) иммобилизация.

28. Термин, обозначающий создание жизнеспособной клетки из отдельных фрагментов разных клеток (ядра, цитоплазмы, митохондрий, хлоропластов, хромосом, в результате которого клетки приобретают необычные сочетания ядерных и цитоплазматических генов:

- А) клеточная реконструкция;

- В) трансгенез;
- С) репарация;
- Д) фолдинг;
- Е) клонирование.

29. Гетерокарион – это...

- А) Клетка, содержащая хлоропласты одного биологического вида и ядро другого вида;
- В) Организм, сочетающий в себе два или несколько генотипов;
- С) Клетка, содержащая митохондрии одного биологического вида и ядро другого вида;
- Д) Клетка, содержащая хлоропласты одного, митохондрии второго и ядро третьего биологического вида;
- Е) Гибридная клетка, в которой не произошло слияния ядер двух видов.

30. Что такое соматический гибрид?

- А) Гибрид, образовавшийся в результате слияния соматических клеток;
- В) Растение, появившееся в результате соматической изменчивости;
- С) Зародышеподобная структура, образовавшаяся в результате соматического эмбриогенеза;
- Д) Гибрид, образовавшийся в результате объединения гомозиготной материнской клетки с гетерозиготной отцовской клеткой;
- Е) Гибрид, образовавшийся в результате объединения материнской клетки несущей рецессивные признаки с отцовской клеткой несущей доминантные признаки.

31. Что такое цитопласт?

- А) Растительная клетка, лишенная клеточной стенки;
- В) Гибридная клетка, образовавшаяся после слияния двух и более субпротопластов;
- С) Клетка, образовавшаяся в результате слияния цитопласта одной клетки и ядра другой клетки;
- Д) Гетерокарион;
- Е) Растительная клетка, лишенная клеточной стенки и ядра.

32. Методы селекции соматических гибридов (укажите неверный ответ)

- А) Физиологическая комплементация;

- В) Генетическая комплементация;
- С) По продукту экспрессии чужеродного гена;
- Д) Визуальный отбор гибридных клеток;
- Е) Биохимическая комплементация.

33. Методы анализа соматических гибридов (укажите неверный ответ)

- А) Гибридологический анализ;
- В) Цито-генетический анализ;
- С) Анализ экспрессии чужеродного гена;
- Д) Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот;
- Е) Электрофорез ферментов.

34. Что такое плазмолиз?

- А) Насыщение клетки водой;
- В) Переход клетки в состояние циторриза;
- С) Лизис клетки;
- Д) Отложение в клеточной стенке лигнина;
- Е) Отставание цитоплазмы от клеточной стенки.

35. Какие полисахариды составляют основу клеточной стенки растений?

- А) Целлюлоза, крахмал, гликоген;
- В) Пектины, амилоза, гемицеллюлоза;
- С) Целлюлоза, гемицеллюлоза, пектины;
- Д) Амилоза, гликоген, целлюлоза;
- Е) Целлюлоза, амилопектин, гликоген.

6.2 Практические задания к главе 6 «Клеточная инженерия»

Задание 1

Для выделения протопластов в качестве осмотика применяют 0,4-0,5 М раствор сахарозы. Определите сколько необходимо взвесить сахарозы для получения раствора заданной концентрации.

Задание 2

На слияние протопластов, основанном на химическом методе, большое влияние оказывает ПЭГ и буфер, содержащий ионы кальция. Объясните как приготовить 100-300 мМ раствор CaCl_2 ?

Задание 3

Известно, что зеатин в концентрации 6 мг/л индуцирует процессы геммогенеза в каллусной культуре ячменя.

Расчитайте какое количество (мл) раствора зеатина необходимо взять для индукции геммогенеза из 1% сток-раствора зеатина для приготовления среды Шенка-Хильдербрандта объемом 2 литра.

Глава 7

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Генетическая инженерия – это конструирование функционально активных генетических структур в виде рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК. Этим методом можно перестраивать геном организмов по намеченному плану, изменяя содержащуюся в них генетическую информацию. Генетическая, или генная инженерия – это методы и технологии, связанные с целенаправленным созданием *in vitro* новых комбинаций генетического материала, способного размножаться в клетке-хозяине и синтезировать конечные продукты обмена. Суть генетической инженерии состоит в переносе отдельных генов из одного организма в другой. Это стало возможно после открытия ферментов рестриктаз и лигаз.

Рестриктазы рассекают молекулу ДНК по строго определенным местам. Сейчас обнаружено более 500 рестриктаз, расщепляющих специфические нуклеотидные последовательности в ДНК. Полученные фрагменты ДНК имеют комплементарные, или липкие, концы и могут быть сшиты в единое целое ферментами *ДНК-лигазами* (рис. 13).

С помощью этих ферментов из набора рестриктазных фрагментов ДНК, содержащих нужный ген, собирается рекомбинантная ДНК, которая затем различными способами вводится в клетку. Новая генетическая информация экспрессируется, и клетка начинает синтезировать продукт, кодируемый введенным геном. Таким образом, вводя в клетку новую генетическую информацию в виде гибридных молекул ДНК, можно получить организм с новым признаком (рис. 14). Такой организм называется *трансгенным* или *трансформированным*.

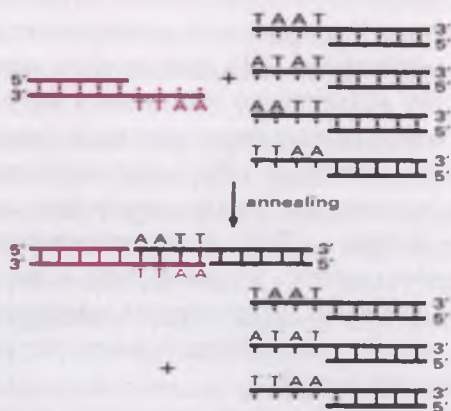


Рисунок 13. Схема действия ферментов рестриктаз и ДНК-лигаз

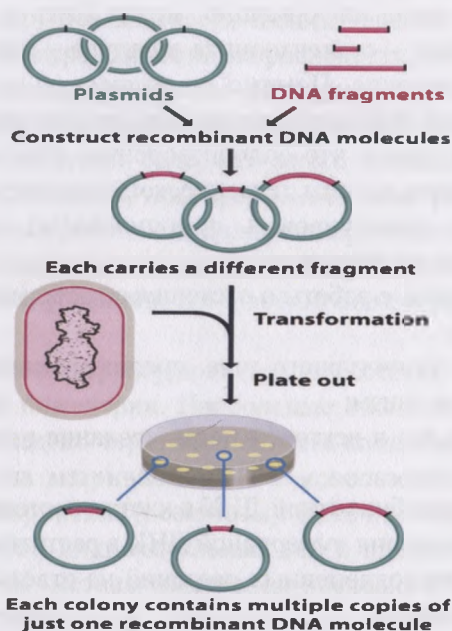


Рисунок 14. Технология получения рекомбинантной ДНК (Genomes. Garland Science, 2007)

Впервые рекомбинантная ДНК была получена в 1972 г. в лаборатории П. Берга в Стэнфордском университете в США, в ней были соединены фрагменты ДНК фага лямбда, кишечной палочки и полный геном онкогенного обезьяньего вируса 40. Первые работы по генетической инженерии растений начались в 1980 г. на основе культуры клеток. В 1983 г. был получен каллус, а затем и химерное растение санбин (от английских слов sunflower – «подсолнечник» и bean – «бобы»), представляющее собой подсолнечник, в геноме которого работали гены, кодирующие запасной белок бобов фазеолин. Генетическая инженерия как способ переноса генов обещает стать эффективным инструментом в селекции культурных растений.

Методической основой генной инженерии является культура изолированных протопластов, полученных либо из клеток мезофилла листа, либо из каллусной ткани. Протопласт, получивший новую генетическую информацию, может быть клонирован по схеме: протопласт – суспензионная культура – каллусная культура – целое растение. Помимо соматических клеток, для генетической трансформации могут быть использованы пыльца, яйцеклетка или только что оплодотворенная яйцеклетка. Таким образом, применяя методы генетической инженерии в культуре клеток, можно конструировать принципиально новые формы растений с ценными качествами.

Генноинженерные работы с растениями складываются из следующих этапов:

- получение структурного гена, предназначенного для переноса в другой организм;
- включение его в вектор, то есть создание рекомбинантной ДНК;
- перенос рекомбинантной ДНК в клетки растений;
- анализ экспрессии чужеродной ДНК в растительных тканях;
- регенерация полноценных растений из отдельных клеток с измененным геномом.

Для каждого типа полипептидных цепей, то есть белков, в клетке существует *структурный ген*, определяющий последова-

тельность аминокислотных остатков в них. Целью генной инженерии является введение индивидуального структурного гена от одного растения в уже имеющиеся ценные сорта для их улучшения.

В настоящее время благодаря достижениям молекулярной биологии выделение структурных генов в чистом виде и в достаточном количестве, в принципе, возможно. Однако проведение такой работы с растениями затрудняется тем, что геном растений очень сложен, он включает более 150 тысяч генов, тогда как кодирующую функцию несут только 5-10% уникальной ДНК, что соответствует 15-25 тысячам структурных генов. Геном растения населен огромным числом повторяющихся элементов ДНК (90-95%), функция которых неизвестна. Идентификация отдельных растительных генов, кодирующих определенный признак, является очень трудоемкой работой. Кроме того, ряд важнейших признаков кодируется множественными генами. Например, такие признаки, как урожайность, скороспелость, азотфиксация, устойчивость к неблагоприятным факторам среды, имеют полигенную природу, а их биохимические основы неясны. Помимо этого, клетки растений содержат много полисахаридов, которые ингибируют стандартные ферментативные реакции. Целью генноинженерных работ пока являются простые гены, кодирующие определенный признак растений, например, гены некоторых запасных белков, устойчивости к вредителям, гербицидам и пестицидам.

Для выделения структурных генов растений используются методы генной инженерии. Наибольшее число геномных копий генов было выделено через этап синтеза комплементарной цепи ДНК (кДНК) на матричной РНК с использованием фермента обратной транскриптазы (ревертазы). С его помощью можно синтезировать любой индивидуальный ген в присутствии соответствующих иРНК (методы выделения последних достаточно хорошо разработаны).

Векторы для переноса генов. Структурные гены содержат только кодированную запись конечного продукта (белка, РНК),

они полностью лишены регуляторных участков и потому не способны самостоятельно функционировать ни в клетке-хозяине, ни *in vitro*. Сигналы репликации и транскрипции, управляющие действием генов в клетке, придает им вектор.

Векторы – это специфические в отношении клетки-хозяина, способные к репликации структуры, которые могут присоединять к себе те или иные гены и переносить их в другие клетки. Вектор – это нуклеотидная последовательность, способная включаться в ДНК, не нарушая ее целостности. Вектор должен отвечать следующим требованиям: а) должен автономно реплицироваться; б) иметь маркеры, по которым легко обнаружить трансформированные клетки (например, устойчивость к антибиотику); в) введение чужеродного гена не должно нарушать функций вектора; г) небольшие размеры.

В качестве промотора чаще всего используют регуляторный участок гена 35S белка из генома вируса мозаики цветной капусты. Для удобства контроля за процессом трансформации в переносимую конструкцию обычно включают маркерные гены. Маркерными часто являются гены устойчивости к различным антибиотикам или гербицидам. Используют также репортёрные гены, экспрессия которых не даёт клетке селективных преимуществ, но приводит к изменению фенотипа растения. Например, широко используемым репортёрным геном является ген β -глюкуронидазы (GUS). Трансгенные клетки, экспрессирующие этот ген, при помещении на специфический субстрат окрашиваются в голубой цвет.

Большая часть векторов получена из плазмид кишечной палочки *E. coli* и других бактерий. Помимо главной хромосомы, бактерии содержат большое количество очень маленьких кольцевых молекул ДНК, которые состоят из нескольких тысяч пар оснований и называются *плазмидами*. Это автономно реплицирующиеся молекулы ДНК (генетические элементы), они не сцеплены с главной хромосомой и несут гены устойчивости к антибиотикам, таким как тетрациклин или канамицин. Плазмиды легко отделить от хромосомной ДНК и получить в чистом виде.

Сочетание структурного гена и вектора дает *рекомбинантную (гибридную) ДНК*. Плазмиды обладают свойством легко проникать в бактериальные клетки. Оказавшись внутри бактериальной клетки, они начинают реплицироваться. При этом чужеродная ДНК не только транскрибируется, но и транслируется, и в клетке начинается синтез белка, кодируемого чужеродным геном, то есть происходит трансформация клетки. В клетке *E.coli* можно осуществить экспрессию любого эукариотического гена.

Для отбора бактериальных клеток, содержащих рекомбинантные молекулы ДНК с нужным геном, в среду вводят антибиотик (тетрациклин или канамицин), поскольку плазмиды содержат ген устойчивости к ним. Бактериальные клетки без плазмиды в этих условиях погибают. Таким образом, плазмиды служат векторами для клонирования чужеродных генов.

В группе почвенных бактерий *Agrobacteria* есть несколько видов, которые могут заражать растения и вызывать образование корончатых галлов, то есть наростов – недифференцированной опухолевой ткани, растущей в месте заражения. К этим бактериям чувствительны почти все двудольные широколиственные растения, а злаки и другие однодольные – нет. Особенно сильным индуктором опухолей является *Agrobacterium tumefaciens*. Эта бактерия, попадая в растение через ранки, вводит чужеродные гены и заставляет его синтезировать соответствующие белки. В результате растительные клетки размножаются и образуют галл, то есть опухоль, обычно в области корневой шейки. Инфекционный процесс – это природная форма генетической инженерии. Агентом, вызывающим опухоль, является плазида этой бактерии, которая получила название *Ti-плазида* (от англ. tumor inducing – «вызывающий опухоль»). Эти плазмиды представляют собой кольцевую молекулу ДНК с молекулярной массой около $1,2 \times 10^8$ (3-5% от размера хромосомы агробактерий), они размножаются в бактериальных клетках как независимо реплицирующиеся генетические элементы.

В 1977 г. американские генетики доказали, что опухоли корончатого галла возникают в результате включения в растения ДНК

определенного фрагмента Ti-плазмид агробактерий, названного *T-ДНК* (от англ. Transferred – «перенесенный»). В опухолевых клетках были обнаружены химические соединения нового класса – опины, которых нет в здоровых клетках того же растения. *Опины* – это производные аминокислоты аргинина, подробно изучены два из них *октопин*, состоящий из аргинина и пировиноградной кислоты, и *нопалин* – соединение аргинина с α -кетоглутаровой кислотой. Опухолевые клетки синтезируют либо октопин, либо нопалин, это зависит от штамма бактерии, индуцировавшей опухоль. Бактерии используют их в качестве источника углерода и азота, клетки растений не способны утилизировать их. Бактерии не только вызывают образование опухоли у растений, но и модифицируют его метаболизм таким образом, что начинается синтез аминокислот, необходимых только бактериям. Этот тип паразитических взаимоотношений был назван *генетической колонизацией*. Это представляет собой пример успешной генетической инженерии, осуществляемой природой.

Ti-плазмиды классифицируют по типу индуцируемого опина. Каждая клетка *A. tumefaciens* содержит один тип плазмиды: либо октопиновую, либо нопалиновую. Гены, ответственные за перенос T-ДНК в растительную клетку и ее встраивание в хромосомную ДНК, находятся вне T-ДНК, слева от нее (вирулентность). Вне T-ДНК расположены также гены катаболизма опинов. В настоящее время T-ДНК картирована, то есть установлено, как размещены гены в ней. В клетках октопиновых опухолей T-ДНК состоит из 7 генов, с каждого из которых транскрибируется уникальная РНК. Гены T-ДНК расположены близко и не перекрываются, весьма вероятно, что каждый ген транскрибируется независимо от других со своего собственного промотора. 4-5 генов подавляют дифференцировку опухолевых клеток с образованием побегов и корней. Один ген кодирует синтез опина, два других гена отвечают за подавление образования корней. Поэтому клетки корончатых галлов в культуре остаются недифференцированной тканью типа каллуса. Они способны расти на среде без гормонов, потому что производят их в больших количествах сами. Дисбаланс на

уровне регуляторов роста подавляет дифференцировку. Т-ДНК в Ti-плазмиде с обеих сторон ограничена почти идентичными прямыми повторами длиной в 25 пар нуклеотидов, которые, возможно, играют определенную роль в переносе Т-ДНК в растение.

Генетические исследования с мутантами показали, что ДНК Ti-плазмид ответственна за индукцию опухолей, синтез опинов и подавление дифференцировки. После встраивания в хромосому Т-ДНК становится обычным геном растения. Благодаря тому, что интегрированная в растение Т-ДНК наследуется по законам Менделя, а ее гены имеют собственные промоторы, под контролем которых могут экспрессироваться чужеродные гены, ДНК Ti-плазмиды можно использовать в качестве вектора в генноинженерных работах.

Таким образом, идеальная векторная система Т-ДНК должна отвечать следующим требованиям:

- содержать все сигналы, необходимые для переноса и стабильной интеграции ДНК в ядро растений;
- содержать все продукты, необходимые для обеспечения этих процессов;
- не должна нести функций, которые могли бы препятствовать регенерации в нормальные растения;
- иметь систему для экспрессии генов, введенных в растительные клетки;
- иметь маркер, позволяющий отбирать трансформированные клетки;
- обеспечивать простой способ введения чужеродной ДНК в данный вектор.

Разработаны два метода для введения Ti-плазмидных последовательностей, содержащих нужный ген, в растение.

Первый метод – метод «промежуточных векторов» – основан на использовании плазмиды кишечной палочки pBR 322. Т-ДНК вырезают из Ti-плазмиды с помощью рестриктаз и встраивают в плазмиду pBP 322 для клонирования в *E.coli*. Бактерии, содержащие плазмиду с Т-ДНК, размножают, после чего эту плазмиду выделяют. Затем в клонированную Т-ДНК с

использованием рестриктаз встраивают нужный ген. Эту рекомбинантную молекулу, содержащую Т-ДНК со встроенным в нее геном, снова размножают в большом количестве, то есть клонируют в кишечной палочке. Затем с помощью конъюгации вводят в клетки агробактерии, несущие полную Т-плазмиду. Между Т-сегментами нативной Ti-плазмиды и промежуточного вектора происходит гомологичная рекомбинация. В результате этого Т-ДНК со встроенным геном включается в нативную Ti-плазмиду, замещая нормальную ДНК. Получаются клетки *A. tumefaciens*, несущие Ti-плазмиды со встроенными в Т-сегмент нужными генами. Далее их перенос в клетки растения осуществляется обычным способом, характерным для агробактерий.

Второй метод основан на создании системы *бинарных (двойных) векторов*. Последние исследования показали, что для заражения и трансформации не нужна целая Ti-плазида, а достаточны только пограничные области Т-ДНК и один участок Ti-плазмиды, ответственный за вирулентность. Причем эти два участка ДНК не обязательно должны находиться в одной и той же плазмиде. Если клетки агробактерий содержат Ti-плазмиду с сегментом *vir* и другую плазмиду с Т-ДНК, эти бактерии могут трансформировать клетки растений. При этом Т-ДНК с любыми встроенными в нее генами интегрирует с геномом растения, для этого не нужна гомологичная рекомбинация в бактериальных клетках.

Значительный интерес как векторы для растений представляют также *Ri-плазмиды Agrobacterium rhizogenes*, вызывающей раковую болезнь «бородатый корень» (от англ. root inducing – «индуцирующий корень»). Это заболевание характеризуется быстрым размножением корней в пораненном участке, зараженном бактериями. Корешки, подобно ткани корончатого галла, быстро растут в культуре в отсутствие бактерий. В клетках корешков содержатся опины и несколько копий Т-ДНК. В отличие от корончатых галлов трансформированные клетки корешков «бородатого корня» легко поддаются регенерации и дают здоровые

плодовитые растения, которые содержат в листьях и корнях опин. Кроме того, они содержат в своем геноме фрагмент Ri-плазмиды (Т-ДНК), которая передается половому потомству.

Таким образом, Ti-плазмиды и Ri-плазмиды являются эффективными векторами для введения генов в высшее растение.

Для введения сконструированных Ti-плазмид в растительную клетку может быть использовано несколько методов. Наиболее простой из них – природный способ – это инокуляция сконструированных штаммов в поврежденные (пораненные) области растения. Другой метод состоит в трансформации протопластов путем кокультивирования их с агробактериями.

Методы переноса генов в растения.

Естественное заражение двудольных растений агробактериями – весьма распространенное явление. В практическом отношении значительно удобнее осуществлять трансформацию растительных клеток *in vitro*. С помощью системы переноса Т-ДНК уже проведены десятки экспериментов как на целых растениях, так и на культуре протопластов. На табаке и петунии было получено потомство трансформированных растений, которые стабильно наследовали признаки устойчивости к канамицину в соответствии с менделевскими закономерностями. Показано, что при кокультивировании вирулентных агробактерий с протопластами табака существенным условием для трансформации их агробактериями является наличие вновь образуемых клеточных стенок. Хорошие результаты были получены при совместном культивировании протопластов черного паслена с *A. rhizogenes*. Из трансформированных каллусов с высокой частотой (70%) были получены регенеранты. Для введения генов в однодольные растения чаще всего используют прямой перенос ДНК: электропорацию, баллистическую трансфекцию, метод силиконово-карбидных волокон (рис. 14).

Модификация метода связана с использованием *бактериальных сферопластов*, которые в присутствии фюзогена сливаются с протопластами. Так были слиты протопласты барвинка розового и сферопласты агробактерий, несущие Ti-плазмиду октопино-

вого типа. Для индукции слияния применяли фюзогены – полиэтиленгликоль или поливиниловый спирт. После слияния протопласты переносили на среду без фитогормонов. Колонии, выросшие на этой среде, содержали октопин, то есть Т-ДНК. Также были проведены опыты по *прямому введению Т-ДНК в протопласты с помощью полиэтиленгликоля*. Для отбора трансформированных клеток, как и в других опытах, была использована их способность расти на средах без добавления фитогормонов.

Для защиты «голой» ДНК при прямом переносе в протопласты ее заключают в *липосомы* – сферические тельца из фосфолипидов. Это предохраняет ДНК от разрушения нуклеазами, присутствующими в культуральной среде. Этот метод эффективен, потому что протопласты под воздействием ПЭГ или поливинилового спирта легко сливаются с липосомами или поглощают их путем эндоцитоза. Кроме того, этим способом можно вводить ДНК в растения независимо от их видовой принадлежности.

Этот способ введения чужеродной ДНК в растение можно сделать более эффективным, если применить *метод электропорации* – электрической пробой клеточных мембран, подобный тому, который используют для слияния протопластов. Большинство исследователей применяют кратковременные разряды большой напряженности (1-2 кВ/см). Электропорацией осуществлен перенос генов в протопласты как двудольных (табак), так и однодольных (кукуруза) растений.

Для трансформации животных клеток успешно применяются *микроинъекции*. Провести инъекцию растворов ДНК в клетки растений технически сложнее. Для микроинъекций в растительные клетки применяются иглы с внешним диаметром 2 мкм и внутренним 1-1,5 мкм и специальный микроманипулятор. Примерный объем инъекции в каждый протопласт составляет 10^{-8} - 10^9 мл. Физические методы переноса ДНК (микроинъекции, электропорация) позволяют переносить большие количества ДНК, тогда как векторные системы ограничены в переносе больших блоков ДНК.

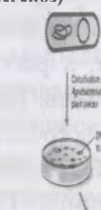
Принципиальной модификацией метода трансформации рас-

тительных протопластов является *хромосомная инженерия*. Успешный перенос хромосом открывает возможность переноса большого числа сцепленных генов одновременно. Это направление очень интересно, поскольку многие ценные признаки растений имеют мультигенный характер.

Агробактериальная трансформация (косвенный трансгенез)

Ti-плазида агробактерий →

Кокультурирование Агробактерий с эксплантатами →



Трансформация ДНК в клетку

Трансформированная клетка →



Каллусная ткань, сформировавшаяся из трансформированных клеток →



Биобаллистический метод (прямой трансгенез)



← Бомбардировка микрочастицами с ДНК в клетки растений



← Трансгенное растение

Растение-регенерант, образуемый из каллуса

Рисунок 14. Получение трансгенных растений с помощью агробактериальной трансформации и биобаллистическим методом

Таким образом, методов введения генетической информации в растения немало, и они продолжают совершенствоваться. Одним из таких значительных усовершенствований явилась разработка метода «листных дисков», который значительно упрощает и ускоряет тестирование экспрессии генов на уровне целого рас-

тения. В этом методе сочетаются способность агробактерий к переносу генов в растения с простой и общей способностью эксплантов листьев к регенерации. Этот метод проверен на табаке, томате, арбузе. Стерильные диски листьев табака инокулировались штаммом *A. tumefaciens*, содержащим модифицированную неонкогенную Ti-плазмиду, в T-ДНК которой онкогены заменены химерным геном резистентности к канамицину. После совместного культивирования листовых дисков с агробактериями в течение двух дней диски помещаются на селективную среду, содержащую канамицин. Регенерация побегов из дисков листьев в чашках Петри наступает через 2-4 недели, а регенерация корней – через 4-7 недель после инокуляции листьев. Трансформанты определяются по их способности к росту на среде, содержащей 50 мг/л канамицина. Наличие вставки T-ДНК с новым для растения геном подтверждается блот-гибридизацией. Преимущество этого метода заключается в комбинировании переноса генов, регенерации растений и эффективной селекции трансформантов в едином процессе. Метод листовых дисков пригоден для всех видов растений, которые могут быть инфицированы агробактериями и регенерированы из листьев.

Основные ценные сельскохозяйственные признаки, такие как, например, урожайность, скороспелость, длина стебля или колоса, количество белка в зерне, устойчивость к различным стрессовым факторам среды, контролируются полигенными системами, то есть взаимодействием сложного комплекса генов. Такие полигенные признаки не могут служить объектом генетической инженерии. Наиболее приемлемым подходом для улучшения растений, возможно, будет модификация существующих генов и генноинженерные манипуляции с отдельными клонируемыми растительными генами, кодирующими конкретные признаки.

Запасные белки основных культурных видов кодируются семейством близкородственных генов. Накопление запасных белков семян – это сложный, четко регулируемый биосинтетический процесс огромной агрономической и экономической значимости. Первая генноинженерная попытка улучшения свойства одного

растения путем введения гена запасного белка от другого была проведена Д. Кемпом и Т. Холлом в 1983 г. в США. Ген фазеолина бобов с помощью Ti-плазмиды был перенесен в геном подсолнечника. И хотя результатом этого опыта было лишь химерное растение, получившее название «сан-бин», это был очень важный эксперимент, ознаменовавший начало прикладного направления в генетической инженерии растений. В клетках подсолнечника были обнаружены иммунологически родственные фазеолиновые полипептиды, что подтверждало факт переноса гена между растениями, относящимися к различным семействам. Позднее ген фазеолина был передан клеткам табака, в растениях-регенерантах ген экспрессировался во всех тканях, хотя и в малых количествах. Неспецифическая экспрессия фазеолинового гена, так же, как и в случае переноса его в клетки подсолнечника, сильно отличается от экспрессии этого гена в зрелых семядолях бобов, где фазеолин составляет 25-50% от общего белка. Этот факт указывает на необходимость сохранения и других регуляторных сигналов этого гена при конструировании химерных растений и на важность контроля экспрессии генов в процессе онтогенеза растений. Ген, кодирующий запасной белок кукурузы – зеин, после интеграции его в T-ДНК был перенесен в геном подсолнечника следующим образом. Штаммы агробактерии, содержащие Ti-плазмиды с геном зеина, использовали для индукции опухолей в стеблях подсолнечника. Некоторые из полученных опухолей содержали мРНК, синтезируемые с генов кукурузы, что дает основание рассматривать эти результаты как первое доказательство транскрипции гена однодольного растения в двудольном. Однако присутствие зеинового белка в тканях подсолнечника не обнаружилось.

Более реальной задачей для генетической инженерии считается улучшение аминокислотного состава белков. Как известно, в запасном белке большинства злаковых наблюдается дефицит лизина, треонина, триптофана, у бобовых – метионина и цистеина. Введение в эти белки дополнительных количеств дефицитных аминокислот могло бы ликвидировать аминокислотный

дисбаланс. Однако сложность проблемы состоит в том, что изменение состава белка может повлечь за собой изменение его физико-химических свойств, ухудшение качества и снижение урожайности.

Еще одним путем решения лизиновой проблемы у злаковых представляется возможность увеличения содержания свободного лизина в зерне. Этот подход основан на получении мутантов по гену аспарат-киназы, первого фермента в цепи реакций, ведущих к синтезу разветвленных аминокислот. В норме аспараткиназа злаковых ингибируется по механизму обратной связи свободным лизином и метионином, что является лимитирующей стадией в синтезе лизина. Для улучшения аминокислотного состава белка любых растений можно также использовать совершенно новые гены, искусственно синтезированные, которые программируют неприродные полипептиды, построенные из незаменимых аминокислот. Такая конструкция гена, кодирующего неприродный полипептид, состоящий на 80% из пяти незаменимых аминокислот, была создана Джейнс и др. в 1986 г. с помощью химического синтеза. Используя Ti-плазмиды и Ri-плазмиды, им удалось трансформировать клетки растений табака и регенерировать из них химерные растения, в которых искусственный ген подвергался экспрессии, программируя синтез нового белка.

Такие высокоэффективные гербициды, как глифосфат, атразины, производные сульфонилмочевины, интенсивно изучаются на предмет выявления механизма толерантности к ним некоторых сорняков. Так, на полях, где широко используют атразин, довольно часто появляются атразинустойчивые биотипы у многих видов растений. Изучение механизма устойчивости к гербицидам с целью получения методами генетической инженерии культурных растений, обладающих этим признаком, включает следующие этапы: выявление биохимических мишеней действия гербицидов в растительной клетке; отбор устойчивых к данному гербициду организмов в качестве источников генов устойчивости; клонирование этих генов; введение их в культурные растения и изу-

чение их функционирования. Установлено, что признак гербицидоустойчивости является моногенным, то есть признак детерминируется чаще всего одним-единственным геном. Это очень облегчает возможность использования технологии рекомбинантной ДНК для передачи этого признака. Гены, кодирующие те или иные ферменты деструкции и модификации гербицидов, могут быть с успехом использованы для создания гербицидоустойчивых растений методами генетической инженерии. Традиционные методы селекции создания сортов устойчивых к гербицидам очень длительны и малорезультативны.

В фитовирусологии широко известен феномен индуцированной перекрестной устойчивости растений к вирусным инфекциям. Сущность этого явления состоит в том, что заражение растения одним штаммом вируса предотвращает последующую инфекцию этих растений другим вирусным штаммом. Молекулярный механизм подавления вирусной инфекции пока неясен. Показано, что для иммунизации растений достаточно введения отдельных вирусных генов, например генов капсидных белков. Так, ген белка оболочки вируса табачной мозаики перенесли в клетки табака и получили трансгенные растения, у которых 0,1% всех белков листьев был представлен вирусным белком. Значительная часть этих растений при инфицировании вирусом не проявляла никаких симптомов заболевания. Полагают, что индуцированная устойчивость растений к вирусам обусловлена особым антивирусным белком, очень похожим на интерферон животных. Представляется возможным методом генетической инженерии усилить экспрессию гена, кодирующего этот белок, путем его амплификации или подстановки под более сильный промотор.

Для борьбы с насекомыми-вредителями в растениеводстве используются химические средства – инсектициды. Все большее внимание привлекают биологические средства борьбы, обеспечивающие строгую избирательность действия и отсутствие адаптации вредителей к применяемому *биопестициду*. В этом плане особенно интересны микробиологические пестициды – токсины микробов, убивающие насекомых. Токсический белок –

токсин, продуцируемый микробом *Bacillus thuringiensis*, убивает личинок насекомых, питающихся листьями. Ген токсина локализован в плазмиде, различные штаммы *Bacillus thuringiensis* могут продуцировать различные токсины, которые отличаются по кругу поражаемых хозяев и по эффекту действия. Сейчас известно около 20 разновидностей токсина. Гены токсина из разных штаммов были клонированы, секвенированы и перенесены в другие виды микроорганизмов, в частности в клетки штамма *Pseudomonas fluorescens*. Это широко распространенный безвредный эпифитный микроорганизм, входящий в нормальную микрофлору многих культурных растений, включая и корневую систему. Как показали опыты, микрофлора на основе рекомбинантных клеток *Pseudomonas fluorescens*, продуцирующих токсин, успешно защищала ряд растений от экспериментального заражения представителями семейства. Предпринята попытка введения гена этого токсина непосредственно в растения. Получены трансгенные растения табака, способные синтезировать токсин. Такие растения были нечувствительны к гусеницам *Manduca sexta*. Последние погибали в течение 3 суток контакта с токсинпродуцирующими растениями. Токсинообразование и обусловленная им устойчивость к насекомым передавалась по наследству как доминантный признак. Аналогичные работы проводятся с хлопчатником для придания ему устойчивости к гусеницам, и получены растения, продуцирующие этот токсин. Кроме того, создан устойчивый трансгенный хлопчатник – введением гена коровьего гороха. Продукт этого гена подавляет активность протеаз в пищеварительной системе насекомых. Исследованы гены токсинов микроорганизмов, убивающих колорадского жука, и созданы устойчивые растения картофеля.

В связи с возможностями генной инженерии конструировать энтомопатогенные растения на основе токсина микробного происхождения еще больший интерес к себе вызывают токсины растительного происхождения. *Фитотоксины* являются ингибиторами белкового синтеза и осуществляют защитную функцию, направленную против насекомых-вредителей, микроорганизмов

и вирусов. Лучше всех среди них изучен ризин, синтезируемый в клещевине: его ген клонирован и установлена нуклеотидная последовательность. Однако высокая токсичность ризина для млекопитающих ограничивает генноинженерные работы с ним только техническими культурами, не используемыми в пищу человека и на корм животным. Токсин, вырабатываемый фитотоксической американской, эффективен против вирусов и безвреден для животных. Механизм его действия заключается в инактивации собственных рибосом при проникновении в клетки различного рода патогенов, в том числе фитовирусов. Пораженные клетки некротизируются, предотвращая размножение патогена и его распространение по растению. В настоящее время проводятся исследования по изучению гена этого белка и передаче его в другие растения.

Вирусные болезни широко распространены среди насекомых, поэтому для борьбы с насекомыми-вредителями можно использовать природные вирусы насекомых, препараты которых называют *вирусными пестицидами*. В отличие от ядохимикатов они обладают узким спектром действия, не убивают полезных насекомых, они быстро разрушаются во внешней среде и не опасны для растений и животных. Наряду с вирусами насекомых используются как биопестициды некоторые грибы, поражающие насекомых-вредителей. Применяемые сейчас биопестициды являются природными штаммами энтомопатогенных вирусов и грибов, однако не исключена возможность создания в будущем методами генетической инженерии новых эффективных биопестицидов.

Растения очень часто подвергаются воздействию различных неблагоприятных факторов окружающей среды: высокие и низкие температуры, недостаток влаги, засоление почв и загазованность среды, недостаточная освещенность, напротив, избыток некоторых минеральных веществ и т.д. Этим факторам множество, поэтому и способы защиты от них многообразны – от физиологических свойств до структурных приспособлений, позволяющих преодолевать их пагубное действие. Устойчивость растений к тому или иному

стрессовому фактору является результатом воздействия множества разных генов, поэтому говорить о полной передаче признаков толерантности от одного вида растения другому генноинженерными методами не приходится. Тем не менее, у генетической инженерии имеются определенные возможности для повышения устойчивости растений. Это касается работы с отдельными генами, контролируемыми метаболические ответы растений на стрессовые условия, например сверхпродукцию пролина в ответ на осмотический шок, на действие засоления, синтез особых белков в ответ на тепловой шок и т.д. Дальнейшее углубленное изучение физиологической, биохимической и генетической основы ответной реакции растения на условия среды, несомненно, позволит применять методы генетической инженерии для конструирования устойчивых растений. Пока можно отметить лишь косвенный подход для получения морозоустойчивых растений, основанный на генноинженерных манипуляциях с *Pseudomonas syringae*. Этот микроорганизм, сосуществующий с растениями, способствует их повреждению ранними заморозками. Механизм явления связан с тем, что клетки микроорганизма синтезируют особый белок, локализующийся во внешней мембране и являющийся центром кристаллизации льда. Известно, что формирование льда в воде зависит от веществ, могущих служить центрами образования льда. Белок, вызывающий формирование кристаллов льда в различных частях растения (листья, стебли, корни), является одним из главных факторов, ответственных за повреждение тканей растений, чувствительных к ранним заморозкам. Многочисленные эксперименты в строго контролируемых условиях показали, что стерильные растения не повреждались заморозками вплоть до $-6-8^{\circ}\text{C}$, тогда как у растений, имеющих соответствующую микрофлору, повреждения возникали уже при температурах $-1,5-2^{\circ}\text{C}$. Мутанты этих бактерий, потерявшие способность синтезировать белок, вызывающий формирование кристаллов льда, не повышали температуру образования льда, и растения с такой микрофлорой были устойчивы к заморозкам. Штамм таких бактерий, распыленный над клубнями

картофеля, конкурировал с обычными бактериями, что приводило к повышению морозоустойчивости растений. Возможно, такие бактерии, созданные с помощью методов генной инженерии и используемые в качестве компонента внешней среды, будут служить для борьбы с заморозками.

Первостепенной задачей генетической инженерии для повышения эффективности биологической фиксации азота является создание штаммов ризобий с усиленной азотфиксацией и колонизирующей способностью. Колонизация бобовых растений ризобиями протекает очень медленно, лишь единичные из них дают начало клубенькам. Это происходит потому, что местом инвазии ризобий является только одна небольшая область между точкой роста корня и ближайшим к ней корневым волоском, находящимся на стадии формирования. Все остальные части корня и развившиеся корневые волоски растения нечувствительны к колонизации. В ряде случаев сформировавшиеся клубеньки оказываются неспособными фиксировать азот, что зависит от многих растительных генов (выявлено не менее пяти), в частности от неблагоприятного сочетания двух рецессивных генов. Традиционными методами генетики и селекции удалось получить лабораторные штаммы ризобий с более высокой колонизирующей способностью. Но они в полевых условиях испытывают конкуренцию со стороны местных штаммов. Повышение их конкурентоспособности, видимо, можно осуществить генно-инженерными методами. Повышение эффективности процесса азотфиксации возможно с применением генно-инженерных приемов, основанных на увеличении копий гена, усилении транскрипции тех генов, продукты которых образуют «узкое» место в каскадном механизме азотфиксации, путем введения более сильных промоторов и т.п.

Успешно осуществлен трансгеноз *nif*-области в клетки других микроорганизмов с целью создания новых азотфиксирующих бактерий. Так, *nif*-гены перенесены в кишечную палочку, сальмонеллу и другие микроорганизмы. Но перенесенные *nif*-гены не всегда экспрессируются в реципиентных клетках, а иногда

могут привести и к нежелательным последствиям. Очень привлекательна идея новых бактерий-симбионтов для других видов растений, например злаковых. Другая сторона этой проблемы – изучение возможности переноса генов бобовых растений, участвующих в симбиозе с ризобиями, в другие виды сельскохозяйственных растений, с тем чтобы передать им способность к симбиозу с азотфиксирующими микроорганизмами. Но это будет реализовано только после полной расшифровки вклада генов растений в этот сложный процесс. Видимо, легче совершенствовать существующие симбиозы, чем искусственно создавать новые. Поэтому исследуются отношения злаков со слабоассоциированными с ними видами азоспирилл, которые обеспечивают их некоторым количеством азота. Генетически, видимо, можно добиться большей зависимости ассоциированной микрофлоры от растения в обеспечении углеводным питанием, что способствовало бы более прочной ассоциации. Для создания таких прочных ассоциатов необходимо также устранить конкурирующие формы других ризосферных микроорганизмов, а это уже очень сложная экологическая задача. Среди возможных партнеров для создания ассоциаций с высшими растениями выделяется группа цианобактерий, осуществляющих в природе фиксацию атмосферного азота. При совместном росте культуры ткани табака и клеток анабены образуется смешанная система, причем цианобактерии живут в толще каллуса или на поверхности локальными зонами. В смешанной каллусной культуре и в тканях растений-регенерантов с цианобактериями обнаружена ацетилен-восстанавливающая способность, то есть полученная система способна к фиксации атмосферного азота. Полученная система представляет большой интерес, поскольку в природе цианобактерий очень редко встречаются в симбиозе с высшими растениями. Не исключена модификация генома как цианобактерий, так и высших растений с целью повышения эффективности таких ассоциаций.

Одной из задач, стоящих перед генетической инженерией, является исследование возможности создания РубФК с преоб-

ладающей карбоксилазной активностью. РуБФК состоит из 8 больших и 8 малых субъединиц. Большие субъединицы фермента кодируются хлоропластным геномом и транслируются на пластидных 70S рибосомах, малые субъединицы кодируются ядерным геномом и транслируются на 80S рибосомах цитоплазмы. Показано, что в зависимости от полипептидного состава малой субъединицы наблюдаются разные отношения карбоксилазной активности к оксигеназной. Например, у разных видов *Nicotiana* это отношение варьирует от 6 до 12. В целом этот показатель у C_3 -растений составляет 5-7, у C_4 -растений – 13-15. Выдвинута идея повышения эффективности C_3 -растений путем изменения неблагоприятного для карбоксилазной активности РуБФК соотношения CO_2 / O_2 введением в геном хлоропластов гена леггемоглобина. Этот белок кодируется генами ряда белковых растений, вступающими в симбиоз с азотфиксирующими ризобиями, и защищает их от кислорода путем его обратимого связывания. В последние годы делаются попытки генноинженерных манипуляций со структурными единицами РуБФК. Так, ген малой субъединицы фермента из листьев гороха был перенесен с помощью Ti-плазмиды в протопласты петунии. Там, благодаря экспрессии этого гена, формировались малые субъединицы, свойственные гороху. Возникшая гибридная молекула РуБФК по своей конформации и активности отличались от ферментов гороха и петунии. Наряду с программой перестройки молекулы РуБФК существуют проекты переноса группы генов от C_4 -растений C_3 -растениям. Однако это очень сложная работа, поскольку фотосинтезирующая функция кодируется большим количеством разнообразных генов. Более простой задачей может быть перенос генов, кодирующих карбоксилазу и декарбоксилазу фосфоенолпирувата. В результате в хлоропластах трансформированных растений могла бы заметно возрасти локальная концентрация CO_2 . Этого же эффекта можно достигнуть путем трансгеноза гена ангидразы либо путем его амплификации, что должно привести к усилению синтеза ангидразы и ее транспорта в хлоропласты, а следовательно, к повышению концен-

трации HCO_3 в них. У некоторых C_3 -растений, например у подсолнечника, эффективность фотосинтеза очень высока и не уступает даже C_4 -растениям. Удельная активность RuБФК подсолнечника оказалась значительно выше, чем у других C_3 -растений, но пока не установлено, объясняется ли это особыми свойствами самого фермента или другими физиологическими особенностями подсолнечника. Таким образом, направления генно-инженерного улучшения эффективности фотосинтеза многообразны и многообещающи.

Вопросы для контроля:

1. Что представляет собой генетическая инженерия?
2. Как осуществляется генетическая инженерия?
3. Как создают рекомбинантную ДНК?
4. Как получают структурные гены?
5. Что такое вектор?
6. Какие структуры могут быть векторами?
7. Почему плазмиды агробактерий могут быть хорошим вектором?
8. Какими способами переносят гены в растения?
9. Какие достижения имеет генетическая инженерия растений по улучшению качества растительной продукции?
10. Какие достижения имеет генетическая инженерия растений по созданию гербицидоустойчивых растений?
11. Какие достижения имеет генетическая инженерия растений по созданию растений, устойчивых к патогенам и вредителям?
12. Возможности генетической инженерии растений по повышению эффективности биологической азотфиксации.
13. Возможности генетической инженерии растений по повышению эффективности фотосинтеза.
14. Каковы перспективы генетической инженерии растений?

7.1 Тестовые задания к главе 7 «Генетическая инженерия растений»

1. Функция рестриктазы заключается в:

- A) Расщеплении молекулы АТФ;
- B) Расщеплении молекулы ДНК;

- С) Расщеплении молекул липидов;
- Д) Расщеплении молекул углеводов;
- Е) Расщеплении молекул белков;
- Ф) Узнавании определенных сайтов и «разрезание» молекулы ДНК;
- Г) Расщеплении молекулы нуклеиновой кислоты с образованием «липких» и тупых концов;
- Н) «Сшивании» фрагментов ДНК.

2. Подвижные генетические элементы – это:

- А) Нуклеотидная последовательность ядерной ДНК, передающаяся хлоропластной ДНК;
- В) Фрагмент ДНК, способный менять свое местоположение в геноме клетки;
- С) Нуклеотидная последовательность ядерной ДНК передающаяся митохондриальной ДНК;
- Д) Нуклеотидная последовательность хлоропластной ДНК, передающаяся митохондриальной ДНК;
- Е) Мобильные генетические элементы;
- Ф) Бактериофаги;
- Г) Транспозоны;
- Н) Плазмидная ДНК бактерий.

3. Плазманы – это:

- А) Гены митохондриальной ДНК;
- В) Гены хлоропластной ДНК;
- С) Ген бактериальной ДНК;
- Д) Гены митохондриальной и хлоропластной ДНК;
- Е) Ген плазмодия – организма, относящегося к простейшим;
- Ф) Ген, ответственный за плазмолиз растительной клетки;
- Г) Гены, способные менять свое местоположение в геноме клетки;
- Н) Гены, ответственные за синтез опинов агробактерий.

4. Плазида – это:

- А) Кольцевая ДНК простейшего животного – плазмодия;
- В) Кольцевая ДНК митохондрий;
- С) Кольцевая ДНК хлоропластов;
- Д) Один из генетических элементов бактерий;
- Е) Цитоплазматический ген клетки эукариот;
- Ф) Кольцевая бактериальная ДНК;

Г) Вирусная ДНК;

Н) Кольцевая ДНК бактерий, содержащая генетическую информацию.

5. Генная инженерия – это:

А) Метод получения новых организмов путем рекомбинации генов одного организма;

В) Метод получения новых организмов путем рекомбинации отцовских и материнских генов одного вида;

С) Метод получения новых организмов путем моногибридного скрещивания;

Д) Метод получения новых организмов путем полигибридного скрещивания;

Е) Метод получения новых организмов с использованием технологии рекомбинантных ДНК;

Ф) Метод получения соматических гибридов;

Г) Метод, основанный на получении рекомбинантной ДНК и генетической трансформации;

Н) Метод, в результате применения которого получают генетически модифицированные организмы/продукты.

6. Вектор – это:

А) Участок информационной РНК;

В) Самореплицирующаяся молекула ДНК, способная переносить чужеродную генетическую информацию в клетку;

С) Комплементарная цепь ДНК, синтезированная на РНК-матрице при помощи фермента обратной транскриптазы;

Д) Участок цепи ДНК кодирующий структуру белковой молекулы;

Е) Транспортная РНК;

Ф) Молекула ДНК небольшого размера, с помощью которой осуществляется перенос чужеродного гена в клетку реципиента;

Г) Вариабельный участок иммуноглобулина;

Н) Самореплицирующаяся молекула ДНК с помощью которой осуществляется генетическая трансформация.

7. В генетической инженерии растений используются плазмиды следующих бактерий:

А) *Mycobacterium tuberculosis*;

В) *Salmonella typhimurium*;

- C) *Agrobacterium rhizogenes*;
- D) *Streptococcus pyogenes*;
- E) *Agrobacterium tumefaciens*;
- F) *Staphylococcus aureus*;
- G) Плазмиды почвенных агробактерий, вызывающих образование опухоли «корончатый галл» и «бородатый корень»;
- H) *Lactobacterium bulgaricum*.

8. Ti-плазида была обнаружена в бактерии:

- A) В агробактерии, вызывающей образование опухоли «корончатый галл»;
- B) *Azotobacter agile*;
- C) *Agrobacterium tumefaciens*;
- D) *Bacillus brevis*;
- E) *Agrobacterium rhizogenes*;
- F) *Corynebacterium diphtheriae*;
- G) *Pseudomonas denitrificans*;
- H) В почвенной агробактерии *A. tumefaciens*.

9. «Липкие и тупые концы» у фрагментов ДНК появляются при действии фермента:

- A) Каталазы;
- B) Рестриктазы;
- C) РДФ-карбоксилазы;
- D) Изомеразы;
- E) Трансферазы;
- F) Рестрицирующей эндонуклеазы;
- G) Лигазы;
- H) Эндонуклеазы.

10. В генной инженерии используются следующие свойства плазмид:

- A) Способность к автономной репликации;
- B) Наличие генов устойчивости (маркерных генов) к антибиотикам;
- C) Способность не передаваться из клетки в клетку;
- D) Способность включать в свою ДНК чужеродные гены;
- E) Плазмиды не являются самореплицирующимися молекулами ДНК;
- F) Плазмиды не способны к генетической трансформации;

- G) Плазмиды имеют большой размер;
- Н) Плазмиды имеют интроны (бессмысловые участки).

11. Трансгенез – это:

- A) Новые гены, образовавшиеся в результате мутации;
- B) Белки, образовавшиеся в результате трансляции;
- C) Перенос генов искусственным способом из одной живой системы в другую;
- D) Транспортная РНК;
- E) Транспозон;
- F) Перенос гена от донорного организма к реципиенту в условиях *in vitro*;
- G) Перенос чужеродных генов с помощью вектора;
- Н) Фрагмент ДНК.

12. Возможности генетической инженерии растений (укажите неверный ответ):

- A) Создание растений, устойчивых к гербицидам;
- B) Создание растений, устойчивых к насекомым;
- C) Создание злаковых растений, способных к азотфиксации;
- D) Улучшение качества липидов в растениях;
- E) Получение мутантов;
- F) Создание растений-деструкторов нефти;
- G) Создание гомозиготных растений;
- Н) Создание растений, устойчивых к абиотическим факторам.

13. Этапы генноинженерных работ (укажите неверный ответ):

- A) Выделение структурного гена;
- B) Получение рекомбинантной ДНК;
- C) Перенос рекомбинантной ДНК в клетку;
- D) Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот;
- E) Встраивание структурного гена в вектор;
- F) Получение соматической гибридной клетки;
- G) Анализ экспрессии встроенного гена;
- Н) Получение преципитата.

14. Гены в растения переносят следующими способами (укажите неверный ответ):

- A) Микроинъекцией;
- B) С помощью вирусов;

- С) Электропорация;
- Д) Культивирование агробактерий с протопластами;
- Е) С помощью селективных агентов;
- Ф) С помощью ПЭГ;
- Г) С помощью векторов;
- Н) С помощью криопротекторов.

15. Ti-плазмида – это:

- А) Гибридная плазмида;
- В) Рекомбинантная ДНК;
- С) Плазмида вируса;
- Д) Плазмида агробактерии;
- Е) Плазмида митохондрии;
- Ф) Плазмида бактерии, вызывающей образование опухоли в прикорневой части растения;
- Г) ДНК хлоропластов;
- Н) Плазмида почвенной бактерии *A. tumefaciens*.

16. Растение, имеющее в составе генома чужеродный ген называется:

- А) Трансгенное растение;
- В) Клонированное растение;
- С) Гибридное растение;
- Д) Дигаплоидное растение;
- Е) Генетически модифицированное растение;
- Ф) ГМО;
- Г) Гомозиготное растение;
- Н) Фертильное растение.

17. Сфера биотехнологии, занимающаяся созданием функционально активных генетических конструкций рекомбинантной ДНК:

- А) Генная инженерия;
- В) Клеточная инженерия;
- С) Инженерная энзимология;
- Д) Белковая инженерия;
- Е) Эмбриоинженерия;
- Ф) Молекулярная биотехнология;
- Г) Биоинженерия;
- Н) Клеточная селекция.

18. При получении трансгенных растений рекомбинантную молекулу ДНК вводят с помощью (укажите неверный ответ):

- А) Ti-плазмиды;
- В) Ri-плазмиды;
- С) С помощью микротрубочки, микроманипулятора и микрокапилляра;
- Д) Посредством хлоропластной ДНК;
- Е) Посредством митохондриальной ДНК;
- Ф) С помощью бактериофагов;
- Г) С помощью криопротекторов;
- Н) С помощью нанотрубок.

19. С помощью данного фермента можно получить и выделить небольшие олигонуклеотиды (фрагменты ДНК):

- А) Рестриктаза;
- В) Оксидаза;
- С) Лигаза;
- Д) Полимераза;
- Е) Липаза;
- Ф) Эндонуклеаза;
- Г) Киназа;
- Н) Рестрицирующая эндонуклеаза.

20. В биотехнологии растений следующие нуклеиновые кислоты могут быть использованы в качестве вектора (укажите неверный ответ):

- А) ДНК вируса;
- В) плазмиды;
- С) ДНК хлоропластов;
- Д) ДНК митохондрий;
- Е) плазмиды агробактерий;
- Ф) ядерная ДНК;
- Г) нуклеиновая кислота дрожжей;
- Н) РНК.

21. Направление биотехнологии, занимающееся созданием функционально активных генетических конструкций рекомбинантной ДНК:

- А) Молекулярная биотехнология;

- В) Экологическая биотехнология;
- С) Медицинская биотехнология;
- Д) Пищевая биотехнология;
- Е) Сельскохозяйственная биотехнология;
- Ф) Геномика;
- Г) Генная инженерия;
- Н) Биогеотехнология.

22. Кем из ученых была доказана двунитевая спиральная модель ДНК?

- А) Р. Франклин;
- В) Ф. Сталь;
- С) Дж. Уотсон, Ф. Крик;
- Д) Э. Чаргафф;
- Е) Ф. Келлер, Т. Мильштейн.

23. Что из нижеприведенного относится к вектору:

- А) митохондриальная ДНК;
- В) рибосома;
- С) рецепторный G-белок;
- Д) гибридома;
- Е) транспортный белок.

24. С чем связаны достижения в области генной инженерии?

- А) открытием ферментов рестриктазы (рестрицирующей эндонуклеазы) и лигазы;
- В) синтезированием генов и клонированием;
- С) применением векторов;
- Д) селекцией трансформированных клеток;
- Е) все ответы правильные.

25. Рекомбинантная ДНК – это:

- А) комбинация ДНК молекулы человека и молекулы ДНК животных;
- В) ДНК, в состав которой введен фрагмент ДНК (ген) другого организма;
- С) структура, сконструированная из эмбриональных стволовых клеток;
- Д) структура, предназначенная для клонирования человека;
- Е) метод, применяемый для восстановления нарушенной структуры ДНК.

26. При действии какого фермента появляются «липкие концы» у фрагментов ДНК?

- А) рестриктаза (рестрицирующая эндонуклеаза);
- В) лигаза;
- С) липаза;
- Д) РНК-аза;
- Е) фосфокиназа.

27. Как называется индуцируемый процесс переноса гена с одной биосистемы в другую с целью получения организма, несущего новые признаки?

- А) дедифференциация;
- В) трансгеноз;
- С) биоконверсия;
- Д) регенерация;
- Е) биотрансформация.

28. Какое из нижеприведенных положений не соответствует требованиям, предъявляемым к векторам?

- А) вектор должен обладать способностью к репликации;
- В) в составе вектора должны быть маркерные гены;
- С) размер вектора должен быть большим;
- Д) вектор не должен подавлять экспрессию введенного гена, а также вводимый ген не должен изменять функциональную активность вектора;
- Е) в структуре молекулы должны быть сайты, распознаваемые рестриктазами.

29. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это:

- А) метод, применяемый для синтеза белков;
- В) метод секвенирования молекулы ДНК;
- С) амплификация определенных фрагментов ДНК, выделенной из растительного материала;
- Д) образование ДНК на матрице РНК;
- Е) все ответы правильные.

30. Фермент, расщепляющий молекулу ДНК на определенные фрагменты:

- А) рестриктаза (рестрицирующая эндонуклеаза);
- В) лигаза;
- С) трансфераза;

- D) РНК-аза;
- E) фосфокиназа.

31. Процесс вырезания интронных участков с помощью системы ферментов:

- A) трансгенез;
- B) сплайсинг;
- C) репликация;
- D) денатурация;
- E) регенерация.

32. Совокупность генов, определяющих наследственный аппарат организма:

- A) протеом;
- B) кариотип;
- C) пластом;
- D) геном;
- E) правильного ответа нет.

33. Направление биотехнологии, занимающееся созданием функционально активных генетических структур:

- A) Молекулярная биотехнология;
- B) Экологическая биотехнология;
- C) Медицинская биотехнология;
- D) Пищевая биотехнология;
- E) Сельскохозяйственная биотехнология.

34. Экзон – это:

- A) Смысловая часть структурного гена, входящая в иРНК
- B) участок ДНК, в котором есть информация об аминокислотной последовательности белка;
- C) Полинуклеотидный участок;
- D) Смысловая белоккодирующая часть структурного гена;
- E) все ответы правильные.

35. По какому мономеру РНК отличается от ДНК?

- A) Тимин;
- B) Аденин;
- C) Гуанин;
- D) Урацил;
- E) Цитозин.

36. Каково значение плазмид, используемых в генной инженерии?

- А) стимулируют пролиферацию клеток;
- В) способны включать в свою ДНК чужеродные гены и переносить их в клетки реципиента;
- С) облегчают процесс слияния соматических клеток;
- Д) стимулируют или ингибируют процессы морфогенеза;
- Е) все ответы правильные.

37. С помощью какого фермента можно выделить короткие олигонуклеотиды?

- А) рестриктаза;
- В) оксидаза;
- С) лигаза;
- Д) полимеразы;
- Е) липаза.

38. В качестве вектора могут использоваться:

- А) ДНК вирусов;
- В) плазмиды;
- С) ДНК хлоропластов;
- Д) ДНК митохондрий;
- Е) все ответы правильные.

39. Что такое вектор?

- А) молекула белка, способная переносить генетический материал;
- В) клетка, возникшая в результате соматической гибридизации;
- С) Самореплицирующаяся молекула ДНК, способная переносить чужеродную генетическую информацию в клетку;
- Д) участок ДНК;
- Е) растительная клетка, лишенная клеточной стенки.

40. Каким термином в генной инженерии обозначают изменение генетического аппарата?

- А) дифференциация;
- В) регенерация;
- С) агглютинация;
- Д) витрификация;
- Е) генная модификация.

41. С какой целью в структуре вектора, используемого для генетической трансформации, должен присутствовать участок, кодирующий устойчивость к антибиотикам?

- А) с целью проведения скрининга трансформированных клеток;
- В) для усиления жизнеспособности плазмид;
- С) для усиления экспрессии введенного гена;
- Д) для повышения эффективности генной трансформации;
- Е) все ответы правильные.

42. Из каких этапов состоит технология получения рекомбинантной ДНК?

- А) Получение структурного гена;
- В) Получение рекомбинантной ДНК;
- С) Перенос рекомбинантной ДНК в клетку;
- Д) Анализ экспрессии рекомбинантной ДНК в клетках;
- Е) Все ответы правильные.

43. Какому термину соответствует данное определение: «Конструирование функционально активных генетических структур в виде рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК»?

- А) клеточная инженерия;
- В) генная инженерия;
- С) инженерная энзимология;
- Д) технология клонирования;
- Е) клеточная терапия.

44. Как называется растение в геноме которого имеется чужеродный ген?

- А) трансгенное растение;
- В) клонированное растение;
- С) гибридное растение;
- Д) дигиплоидное растение;
- Е) мутантное растение.

45. Что из нижеприведенного относится к вектору:

- А) бактериальная плаزمид;
- В) дрожжи;
- С) гибридная клетка;
- Д) стволовая клетка;
- Е) правильного ответа нет.

46. Какое направление биотехнологии связано с конструированием функционально активных генетических структур в форме рекомбинантных молекул ДНК?

- А) генная инженерия;
- В) клеточная инженерия;
- С) инженерная энзимология;
- Д) белковая инженерия;
- Е) эмбриоинженерия.

47. Процесс переноса в клетку реципиента генетической конструкции с введенным чужеродным геном:

- А) биоконверсия;
- В) трансгенез;
- С) реверсия;
- Д) пролиферация;
- Е) трансдукция.

48. Что такое цитоплазмон?

- А) Совокупность генов ядра эукариотической клетки или хромосомы прокариотической клетки;
- В) Форма и количество хромосом, характерные для гаплоидного набора данного организма;
- С) Совокупность цитоплазматических генов;
- Д) Совокупность митохондриальных генов;
- Е) Совокупность пластидных генов.

49. Что такое митохондрион?

- А) Совокупность генов ядра эукариотической клетки или хромосомы прокариотической клетки;
- В) Форма и количество хромосом, характерные для гаплоидного набора данного организма;
- С) Совокупность цитоплазматических генов;
- Д) Совокупность митохондриальных генов;
- Е) Совокупность пластидных генов.

50. Что такое пластам?

- А) Совокупность генов ядра эукариотической клетки или хромосомы прокариотической клетки;
- В) Форма и количество хромосом, характерные для гаплоидного набора данного организма;

- С) Совокупность цитоплазматических генов;
- Д) Совокупность митохондриальных генов;
- Е) Совокупность пластидных генов.

51. Что такое корончатые галлы?

- А) Опухоли, появляющиеся у двудольных растений при внедрении *Agrobacterium tumefaciens*;
- В) Каллусные ткани, появляющиеся у однодольных растений при внедрении *Bacillus subtilis*;
- С) Проростки, появляющиеся у древесных растений при внедрении *Clostridium pasterianum*;
- Д) Клубеньки, образующиеся на корнях бобовых растений при внедрении *Rhizobium trifolii*;
- Е) Почки, образующиеся у низших растений при внедрении бактерии *Pseudomonas reinhardii*.

52. Что такое подвижные генетические элементы (транспозоны)?

- А) Нуклеотидная последовательность ядерной ДНК, передающаяся хлоропластной ДНК;
- В) Фрагмент ДНК, способный менять свое местоположение в геноме клетки;
- С) Нуклеотидная последовательность ядерной ДНК передающаяся митохондриальной ДНК;
- Д) Нуклеотидная последовательность хлоропластной ДНК, передающаяся митохондриальной ДНК;
- Е) Плазмидная ДНК бактерий.

53. Какие свойства плазмид используются в генной инженерии?

- А) Способность к автономной репликации;
- В) Наличие генов устойчивости к антибиотикам;
- С) Способность передаваться из клетки в клетку;
- Д) Способность включать в свою ДНК чужеродные гены;
- Е) Все ответы правильные.

54. Какие специфические вещества синтезируются в корончатых галлах растений в результате внедрения *Agrobacterium tumefaciens*?

- А) Кадаверин и путресцин;
- В) Ацетил-Ко А и фумаровая кислота;

- С) Нопалин и октопин;
- Д) Диоксиацетон и α -кетоглутаровая кислота;
- Е) Гидрохинон и триптофан.

55. Кансид – это:

- А) Структура, способная переносить чужеродные гены в клетку;
- В) Белковая оболочка вирусной частицы;
- С) Плаزمид, несущая *cos*-сайты фага λ ;
- Д) Вирулентный фаг;
- Е) Вирус бактерий.

56. Мобильные генетические элементы – это:

- А) Участки ДНК, повторенные со средней частотой, способные перемещаться из одного локуса в другой;
- В) Транспортная РНК;
- С) Две или несколько рибосом, объединившихся с одной молекулой информационной РНК;
- Д) Участок ДНК, связывающий РНК-полимеразу;
- Е) Участок одной хромосомы, присоединившийся к негомологичной хромосоме.

57. Что такое «липкие концы»?

- А) Акцепторный конец тРНК;
- В) Одноцепочечные комплементарные концы двухцепочечных фрагментов ДНК;
- С) Участок иРНК, ассоциирующийся с рибосомой;
- Д) Участок рРНК, ассоциирующийся с белками;
- Е) Участок молекулы фермента, связывающийся с субстратом.

58. Что вызывают у растений агробактерии:

- А) Эмбриоидогенез;
- В) Органогенез;
- С) Корончатый галл;
- Д) Образование протопластов;
- Е) Каллусогенез.

59. Ri-плаزمид – это:

- А) Гибридная плаزمид;
- В) Рекомбинантная ДНК;

- С) Вирусная плазида;
- Д) Агробактериальная плазида;
- Е) Митохондриальная ДНК.

60. Какова функция рестриктазы?

- А) Расщепление молекулы АТФ;
- В) Расщепление молекулы ДНК;
- С) Расщепление молекул липидов;
- Д) Расщепление углеводов;
- Е) Расщепление молекул белков.

7.2 Практические задачи к главе 7 «Генетическая инженерия растений»

Задача 1

Имеется последовательность из 27 нуклеотидных пар двухцепочечной ДНК следующего состава:

5'-ЦТГААТТАГГАТЦЦАГГЦААТАГТГТГ-3'

3'-ГАЦТТААТЦЦТАГГТЦЦГТТАТЦАЦАЦ-5'

Каким способом и на сколько частей можно разрезать эту ДНК?

Задание 2

Определите аминокислотную последовательность белка, синтезированного на основании следующей нуклеотидной последовательности ДНК: CCCATGCCGGT. Как изменится аминокислотный состав белка, если под действием ультрафиолетового облучения произошла делеция четвертого нуклеотида?

Задание 3

Кольцевая плазида рBR322 имеет участки расщепления различными рестриктазами. Какой из нижеприведённых фрагментов двухцепочечной ДНК можно встроить в данную плазмиду?

5'-ЦЦГАТТЦАГАТГТААГГЦААТАГТГТГТАТЦАЦА-3'

3'-ГГЦТААГТЦТАЦАТТЦЦГТТАТЦАЦАЦТААГТГТ-5'

5'-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3'

3'-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5'

Задание 4

Назовите мономерный состав белка, синтезированного из фрагмента ДНК CCCAAAAGATA. Как изменится состав белка, если удалить второй нуклеотид из представленной последовательности?

Задание 5

Один из белков вируса табачной мозаики имеет следующий аминокислотный состав: – серин – глицин – серин – изолейцин – треонин – пролин – серин –. В результате мутагенного воздействия в мРНК произошла замена цитозина на гуанин. Как изменится аминокислотный состав белка в этом случае?

Глава 8

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO*

Клетки растений *in vitro* претерпевают различные изменения: генетические, морфологические, физиологические, биохимические. Даже потомство одной клетки – клеточный клон – из-за высоких темпов хромосомной изменчивости становится вскоре гетерогенным. Изменения, возникающие в культивируемых клетках, могут быть наследуемыми и ненаследуемыми. Последние называются модификациями и помогают клеткам адаптироваться при изменении условий выращивания. Для практического использования культур клеток гораздо важнее наследственная, или генетическая, изменчивость. В основе генетической изменчивости могут быть одиночные мутации генов, перестройки хромосом, амплификации или делеции генов, изменения внеядерных генов. Наследственная изменчивость растительных клеток имеет не только генетическую, но и эпигенетическую природу, т.е. возникает вследствие изменения экспрессии генов в процессе развития при неизменном сохранении всего генома.

Изменчивость клеток *in vitro* можно усилить применением различных мутагенов. Использование спонтанного и экспериментального мутагенеза находит практическое применение как метод создания исходного материала для клеточных технологий и селекционеров. Нестабильность культивируемых клеток приводит к появлению из них генетически измененных растений-регенерантов. Такие растения называют *сомаклональными вариан-*

тами. В последнее время они привлекают большое внимание как источник генетического разнообразия при создании новых форм и сортов растений. Еще более привлекательна возможность отбора соматоклональных вариаций на клеточном уровне в селективных условиях. Селекция на клеточном уровне позволяет резко сократить объем работы и повысить ее эффективность за счет того, что для анализа миллиона генотипов достаточно проанализировать миллион клеток, культивируя их в селективных условиях. В этих случаях жизнеспособными оказываются лишь клетки с соответствующими изменениями генетического аппарата. Эти клетки дают начало клеточным линиям, обладающим теми же признаками, что и измененная клетка. Последующая регенерация позволяет получить из них растения, устойчивые к испытанному фактору стресса.

Клеточная селекция – это процесс возрастающего доминирования в культуре клеток определенного типа. Так как каждая клетка потенциально может регенерировать растение, то путем клеточной селекции можно быстро создать новые формы растений. Эти формы в генетическом отношении могут быть идентичными с исходной клеткой из которой они возникли. Если эта клетка была устойчивой к какому-либо патогену или какому-то экстремальному фактору, то и растение, которому она дала начало, также будет устойчивым. Клеточная селекция имеет свои *преимущества* перед традиционными методами ведения селекционного процесса: исключает сезонность в работе, экономятся посевные площади. Кроме того, если рассматривать каждую клетку популяции как индивидуальный организм, то в одном опыте можно экспериментировать с миллионами особей. Селекционер, работающий в полевых условиях традиционными методами, в лучшем случае имеет дело с тысячами растений (рис.15).

Большим препятствием в этих исследованиях является отсутствие знаний о связи между событиями, происходящими на молекулярном и хромосомных уровнях в клетках, с изменчивостью признаков на уровне организма, поэтому в этих работах превалирует эмпирический подход.



Рисунок 15. Регенерация в каллусной культуре клеток на селективной среде

Методы клеточной селекции.

Для проведения направленной селекции, то есть выделения из общей массы культивируемых клеток отдельных клеток с определенными мутантными изменениями, создают селективные условия, способствующие росту только мутантных клеток. В культурах клеток растений используют такие селективные системы, как устойчивость к аналогам аминокислот и аналогам нуклеотидов, патотоксинам, антибиотикам, гербицидам, высоким концентрациям солей и тяжелых металлов, низким значениям pH и другим стрессовым факторам. Используют также системы прототрофности и ауксотрофности по фитогормонам, витаминам, аминокислотам, то есть отбирают клетки, способные или, наоборот, неспособные расти на среде с этими веществами.

Если проводят отбор клеток на устойчивость к какому-либо веществу, то клетки высевают на среду, содержащую это вещество. Когда проводят отбор применительно к какому-либо стрессовому фактору (низкие или высокие температуры, гипоксия и др.), культуральные сосуды помещают соответствующие условия. Через некоторое время большая часть клеток погибает, выживают лишь те, которые оказались устойчивыми к селективному фактору благодаря мутации или эпигенетическому изменению. Такой метод называют *прямой селекцией*. Этот подход, например, широко

ко применяется для выделения клеток – сверхпродуцентов некоторых метаболитов, в частности аминокислот. Культуру выращивают в присутствии ингибитора (аналог аминокислоты), в результате чего отбираются мутанты, преодолевающие нарушения метаболизма за счет образования избытка желаемого соединения.

Непрямая, или негативная, селекция основана на создании таких условий, когда делятся только клетки дикого типа, включая при этом в ДНК специально добавленный в среду аналог тимидина, и затем погибают (метод «летального роста»), а мутантные клетки теряют способность размножаться, но остаются живыми. Другими словами, создаются особые условия, при которых мутанты с нужными свойствами не растут. Затем их помещают на питательные среды, обеспечивающие нормальную жизнедеятельность, и получают устойчивые линии.

Методы клеточной селекции целесообразно использовать в тех случаях, когда экологический и культуральный факторы совпадают или различаются минимально, только в этих случаях можно ожидать, что формы, отселектированные в стрессовых условиях в культуре клеток, окажутся устойчивыми к экологическому фактору. В культуре клеток получены мутанты с повышенным синтезом специфических аминокислот при отборе на устойчивость к токсическим концентрациям этих аминокислот и их аналогов. Этим методом получен целый ряд клеточных линий картофеля, моркови, табака, риса, дурмана и других растений, способных к сверхсинтезу триптофана, лизина, метионина, пролина, фенилаланина, глицина. Токсичность некоторых аминокислот, добавленных в среду, может быть обусловлена двумя причинами: 1) угнетение какого-либо фермента биосинтеза ведет к блокированию синтеза другой подобной аминокислоты, имеющей с ней общие биосинтетические пути; 2) избыток аминокислоты приводит к подавлению ассимиляции нитрата или аммония. Аминокислотные аналоги, кроме того, могут включаться в состав белков, что приводит к образованию нефункциональных протеинов.

Используя различные селективные системы, можно вести направленную селекцию клеток по различным хозяйственно ценным признакам, как-то: устойчивость к болезням, гербицидам, к различным стрессовым воздействиям (засоление, тяжелые металлы, кислотность почв, низкие и высокие температуры и др.). Для получения мутантов в каждом случае необходимо разработать схему селекции и доказать генетическую природу измененных клеточных линий. Полученные изменения не всегда бывают связаны с мутациями, а могут носить модификационный характер и не наследоваться. Это сложная работа, поскольку доказательством мутации является совокупность критериев:

- 1) частота измененных клеток должна быть очень низка (1×10^{-6} - 10^{-7});
- 2) она значительно повышается при использовании мутагенов (1×10^{-4} - 10^{-5});
- 3) измененные клетки способны к длительному росту;
- 4) новый признак сохраняется даже при отсутствии селективного давления;
- 5) обнаруживается продукт измененного гена.

Отбор клеток растений по требуемому признаку может проводиться из суспензионных культур, из поверхностно культивируемых каллусных клеток, из культуры протопластов. Главным преимуществом при использовании суспензионных культур является возможность применения стандартных микробиологических методов, так как большая часть приемов селекции культивируемых растительных клеток с наследуемыми изменениями заимствована из генетики микроорганизмов и соматических клеток животных. Небольшой размер клеточных агрегатов и относительная физиологическая гомогенность культуры позволяют влиять с помощью селективного фактора сразу на большое число клеток.

Использование каллусной культуры, растущей на агаре, может оказаться наиболее приемлемым методом селекции, если для данного вида невозможно получить хорошую суспензионную культуру или протопласты. Кроме того, этот подход может пригодиться в тех случаях, когда селективный фактор плохо рас-

творяется в воде. В этом случае вещество, растворенное в органическом растворителе, равномерно распределяется в чашке по поверхности агара либо добавляется к расплавленной агаризованной среде. Клетки транспланта каллуса, высаженного на такую среду, неодинаково контактируют с ингибитором: нижние клетки получают более высокие дозы, чем верхние. Устойчивые клетки постепенно выделяются как зоны интенсивного роста, необходимо их отделение от каллусной массы и культивирование на селективной среде для определения стабильности линии. Отбор устойчивых линий клеток растений из протопластов имеет свои преимущества. Протопласты можно выделять не только из суспензионных культур и каллусов, но и непосредственно из ткани интактного растения. Кроме того, при использовании протопластов для клеточной селекции есть уверенность в том, что клеточные линии берут начало от одной клетки.

Отбор устойчивых клеток может быть одноступенчатым и многоступенчатым. При *одноступенчатом отборе* клетки культивируются в среде, содержащей селективный фактор в концентрации, превышающей минимальную концентрацию в 2-3 раза. Однако избыточные концентрации могут привести к одновременной гибели почти всех клеток, а одиночные не смогут выжить.

Более эффективен *многоступенчатый отбор*, суть которого состоит в том, что клетки начинают культивировать на средах, содержащих сублетальные концентрации селективного агента. Затем, по мере роста, их пересаживают на среды, содержащие более высокие концентрации ингибитора. При этих условиях быстрее растущие устойчивые клетки начинают обгонять по скорости роста клетки дикого типа. Постепенно увеличивая концентрацию ингибитора и доведя ее до летальной, можно получить культуры, интенсивно растущие при концентрациях, значительно превышающих минимальные, установленные для исходной культуры, не подвергающейся отбору. Кроме того, при многоступенчатом отборе признак устойчивости, как правило, остается стабильным. Селекцию или идентификацию изменчивости по требуемым признакам можно проводить на разных

уровнях организации – от изолированного протопласта до семени. Подтверждением этому служат работы, в которых для отбора биохимических мутантов использовалась культура зрелых зародышей. Так, в культуре зрелых зародышей были получены мутанты ячменя с повышенным синтезом лизина и треонина. Отбор на уровне проростков или зрелых зародышей может оказаться удобной системой. Однако в этих случаях возникают ограничения, связанные с малым количеством отобранного материала, так как для тиражирования требуется значительное время.

Для сохранения желательного признака более надежно сразу же после отбора устойчивых линий расклонировать их, то есть получить потомство отдельных устойчивых клеток. **Клеточные линии** – это потомство от нескольких клеток, например, составляющих один агрегат в суспензионной культуре. Единственный абсолютно надежный способ обеспечения клонального происхождения клеточных линий растений – это изолирование и культивирование единичных клеток (или протопластов).

Индукцированный мутагенез.

Культивируемые клетки растений являются ценной экспериментальной системой при изучении механизмов мутагенеза и получении мутантов высших растений. Для повышения частоты мутаций используют индуцированный мутагенез. Наиболее эффективными мутагенами являются рентгеновское и ультрафиолетовое излучения, нитрозометилмочевина, метилметансульфонат (ММС), этионин и другие. Мутагенный эффект может вызвать также присутствие в питательной среде тяжелых металлов. Применение метода культуры клеток позволяет работать с миллионами и даже миллиардами клеток в небольшом объеме питательной среды. Преимуществом клеточной селекции является то, что клетки легко подвергать однородной и контролируемой мутагенной обработке, а затем сразу же помещать в селективные условия. Наконец, из измененных клеток возможно получение растений.

Мутагены повышают выход устойчивых клеточных клонов. Например, обработка клеток табака N-нитрозо-N-метилмочевинной

значительно повышает устойчивость клеток к NaCl. Вместе с тем мутагены, вызывающие случайные мутации, наряду с повышением частоты желаемого признака, могут вызвать и дополнительные вредные мутации. Индуцированный мутагенез эффективно используется для получения высокопродуктивных клеточных линий – продуцентов вторичных веществ. Эффективность мутагена в культуре тканей повышается особенно на гаплоидном уровне благодаря проявлению всех рецессивных мутаций в ранних поколениях, а также в культуре протопластов из-за их выровненности при изолировании из однородных тканей. Особенно перспективным источником выделения разнообразных мутаций являются протопласты гаплоидных растений. Классическим примером использования для отбора мутанта гаплоидных протопластов является работа П. Карлсона. Он использовал мутантные протопласты гаплоидного табака для отбора клеток, устойчивых к метионинсульфоксиму, действующему аналогично токсину, вызывающему заболевание табака в природе. Растения, регенерировавшие из отобранных клеток, оказались устойчивыми к заболеванию. Другим доступным источником гаплоидных клеток для отбора мутантов являются микроспоры. Таким образом, мутагенез и клеточная селекция как в случае соматических, так и половых клеток являются эффективными способами получения генетически измененных форм и новых сортов растений.

Соматоклональные варианты.

В процессе регенерации растений из каллусных культур, состоящих из генетически измененных клеток, какая-то часть этих мутаций может перейти в регенеранты. Поэтому растения, полученные путем регенерации в культуре тканей, очень часто отличаются от исходных донорных растений. Такие растения называют соматоклональными вариантами. Отклонения у этих растений могут затрагивать все стороны жизнедеятельности. В результате часто появляются регенеранты, отличающиеся от исходного растения морфологическими признаками, продолжительностью этапов онтогенеза, продуктивностью, устойчивостью к болезням и неблагоприятным условиям. Явление соматоклональ-

ной изменчивости может быть определено как генетическая изменчивость, накапливаемая в процессе искусственного культивирования тканей. Таким образом, **сомаклональные варианты** – это растения-регенеранты, отклоняющиеся от родительского типа, которые возникают в результате генетической изменчивости в культуре *in vitro*. Для того чтобы идентифицировать какой-либо вариант как сомаклональный мутант, требуется генетическая проверка регенеранта путем самоопыления и соответствующих скрещиваний у видов с половым способом размножения. Для видов, размножаемых бесполом путем, где мейотическая передача невозможна или затруднена, генетическую основу изменения гарантирует сохранение признака по крайней мере в двух последовательных циклах клонального размножения.

Синонимами сомаклональных вариантов служат также термины «клеточные варианты», «вариантные линии», «фенотипические варианты». Сомаклональные варианты, полученные из протопластов, называют **протоклонами**, а из каллусов – **каллусными клонами**. Впервые фенотипические варианты получила Р.Г. Бутенко с сотрудниками на растениях табака. Д. Шепард наблюдал сомаклоны, вырастив из протопластов картофеля тысячи растеньиц. Позже им были описаны 35 различных признаков (морфология, окраска листьев, цветков, клубней и др.) у 65 линий протоклонов при нормальном кариотипе. Варьировались даже генетически сложные признаки, например, урожай клубней. Особый интерес представляют сомаклональные варианты злаков как источник получения ценных генотипов. Получены каллусные клоны пшеницы, ячменя, риса, варьирующиеся по таким признакам, как высота растений, длина остей, окраска зерна, форма колоса, электрофоретические спектры запасных белков.

Причины сомаклональной изменчивости.

До последнего времени любую вариабельность в культуре объясняли только изменением числа хромосом, иногда – реконструкцией хромосом и точечными мутациями, изменениями цитоплазматических генов. Однако сомаклональное варьирование – фундаментальное явление, которое невозможно объяснить

только этими причинами. Новейшие достижения молекулярной генетики показывают, насколько сложна организация генетического материала в эукариотической клетке и, следовательно, в такой же степени сложны процессы изменчивости в культивируемых *in vitro* клетках растений. Крупный специалист по соматической изменчивости У. Скаукрофт из Австралии видит ее причины в кариотипической изменчивости, хромосомных абберациях, амплификации или редукции числа копий генов, в перемещении подвижных генетических элементов, в генных перестройках в связи с дифференцировкой, в соматическом кроссинговере. Хромосомные перестройки (абберации) – это обширный и гетерогенный класс наследственных изменений, включающих выпадение (делеция), добавление (дупликация), перемещение (транслокация) или поворот на 180° (инверсия) участков в пределах одной хромосомы или между хромосомами. Довольно трудно провести четкую границу между хромосомными перестройками и генными мутациями. Хромосомные перестройки встречаются в культуре тканей с высокой частотой и могут вызывать существенные фенотипические изменения. Но среди растений-регенерантов и их потомства встречаемость хромосомных аббераций сильно уменьшается вследствие их элиминации. Так, у регенерантов не могут быть обнаружены хромосомные абберации, исключаящие морфогенез. При исследовании соматического потомства не выявлено аббераций, приводящих к стерильности.

В ДНК культивируемых клеток табака и регенерировавших из них растений были выявлены количественные и качественные изменения. На основании этого можно заключить, что амплификация или деамплификация последовательностей ДНК может быть одним из механизмов, ответственных за соматическую изменчивость. Амплификация может повлечь за собой увеличение синтеза специфического продукта, кодируемого данным геном, либо нарушение во времени развития генной активности. Мобильные генетические элементы, передвигаясь по хромосоме, могут инактивировать структурные гены, изменять генную регуляцию, реактивировать «спящие» гены и генерировать дупли-

кации и делеции. Мобильные генетические элементы ответственны за явление генетической нестабильности, мутагенез и хромосомные перестройки, которые возникают в результате их транспозиции. Анализ причин изменчивости в культуре еще более усложняется, если признать, что наследственная изменчивость в культуре клеток может иметь не только генетическую, но и эпигенетическую природу, т.е. возникает вследствие изменения генной активности. Главным остается вопрос о том, в какой степени наблюдаемые в культуре клеток наследственные изменения являются результатом собственно мутационных (генетических) событий, а в какой мере они возникают вследствие изменения экспрессии генов, то есть эпигенетических изменений. Это особенно затруднительно потому, что неизвестно, по каким критериям эпигенетические изменения могут отличаться от мутаций.

Факторы, влияющие на соматоклональную изменчивость.

Генотип донорного растения оказывает большое влияние на широту изменчивости, возникающей в процессе культивирования. Так, частота хромосомных аномалий у овса, частота морфологических вариантов у пшеницы, малины, бегонии была различной у разных сортов. У риса частота возникновения и спектр изменений не зависел от условий культивирования, но очень зависел от сорта.

Большую роль в возникновении соматоклональной изменчивости играет *состав питательной среды*, особенно это относится к фитогормонам – изменение гормонального баланса приводит к изменению кинетики клеточного цикла и самого митоза у культивируемых клеток и регенерантов. Изолирование клеток из целого организма и культивирование их на искусственной питательной среде, которая содержит экзогенные фитогормоны, значительно нарушает и гормональный баланс.

Продолжительный *период культивирования ткани* приводит к увеличению хромосомных aberrаций. Частота соматоклональных вариантов среди растений, регенерировавших из каллусных тканей, также увеличивается с увеличением времени культиви-

рования. Так, например, у овса частота цитогенетически аномальных растений повышалась с увеличением времени культивирования тканей. Аномалии включали хромосомные разрывы, потери хромосом, обмены и анеуплоидию. У растений сахарного тростника, регенерировавших из культур тканей через различные интервалы времени, повышалась частота регенерации растений, устойчивых к патотоксину.

Таким образом, соматональная изменчивость *in vitro* – реально существующее явление, которое может быть успешно использовано как эффективный источник изменчивости для улучшения сортов важных сельскохозяйственных культур, недостатком которого, к сожалению, является невозможность его четкого контроля исследователем.

Вопросы для контроля:

1. Какие изменения претерпевают клетки *in vitro*?
2. Что такое клеточная селекция, в чем состоит ее преимущество?
3. Методы клеточной селекции.
4. Как отбираются клетки с требуемым признаком?
5. Как получают клеточные линии со стабильным признаком?
6. Какие виды мутаций клеток происходят *in vitro*?
7. Как можно индуцировать мутагенез клеток?
8. Что такое соматональные варианты?
9. Причины возникновения *in vitro* соматоклонов
10. Какие факторы влияют на соматональную изменчивость?
11. Для чего используются соматоклоны?

8.1 Тестовые задания к главе 8 «Клеточная селекция и изменчивость клеток, культивируемых *in vitro*»

1. Клеточные линии, устойчивые к засолению отбирают следующим образом:

- А) Культивируя клетки на бессолевой среде;
- В) Культивируя клетки на среде с низким содержанием солей;
- С) Культивируя клетки на среде с повышенной концентрацией хлоридных солей;

- D) Культивируя клетки на среде с высоким содержанием солей;
- E) Культивируя клетки на среде с высоким содержанием пролина;
- F) Культивируя клетки на среде с высоким содержанием бетаина;
- G) Культивируя клетки на среде с низким содержанием криопротекторов;
- H) Культивируя клетки на среде с повышенной концентрацией карбонатных солей.

2. Для имитации *in vitro* стрессового эффекта засухи используется питательная среда:

- A) Среда, содержащая осмотически активные вещества;
- B) Среда, содержащая жирные кислоты;
- C) Среда, содержащая целлюлозу;
- D) Среда, содержащая гликоген;
- E) Среда, содержащая пектиновые вещества;
- F) Среда, содержащая полиэтиленгликоль;
- G) Среда, содержащая бетаин;
- H) Среда, содержащая сахарозу.

3. Для отбора устойчивых к засухе клеточных линий в качестве селективного агента используют ПЭГ так как:

- A) ПЭГ не относится к осмотически активным веществам и не поглощается клеткой;
- B) ПЭГ осмотически активен;
- C) ПЭГ осмотически не активен;
- D) ПЭГ осмотически активен, но не поглощается клеткой;
- E) ПЭГ не поглощается клеткой;
- F) ПЭГ адсорбирует свободную воду в клетке;
- G) ПЭГ имитирует условия водного дефицита в клетке;
- H) ПЭГ имеет низкую вязкость.

4. Устойчивые к ионному стрессу клеточные линии в условиях *in vitro* получают следующим способом:

- A) Прямой селекцией устойчивых клеток на средах с токсичными концентрациями солей;
- B) Непрямой селекцией устойчивых клеток на средах с различными концентрациями солей;
- C) Тотальной селекцией устойчивых клеток;
- D) С помощью полимеразной цепной реакции;

- Е) Методами электронной микроскопии;
- Ф) Гибринологическим анализом;
- Г) С помощью иммуноферментного анализа;
- Н) С помощью серологического анализа.

5. Устойчивые к ионному стрессу растения в условиях *in vitro* получают прямой селекцией устойчивых клеток так как:

- А) Многие ионы оказывают токсическое влияние на физиологические процессы;
- В) Многие ионы оказывают токсическое влияние на биохимические процессы;
- С) Происходит увеличение фотосинтеза;
- Д) Происходит увеличение интенсивности фотосинтеза;
- Е) Одним из механизмов устойчивости растения к ионному стрессу обеспечивается механизмами устойчивости на клеточном уровне;
- Ф) Происходит абсорбция ионов паренхимными клетками ксилемы;
- Г) Происходит обмен между ионами между клетками ксилемы и флоэмы;
- Н) Происходит абсорбция ионов клетками флоэмы.

6. Клеточная селекция – это:

- А) Выделение и селекция протопластов с высоким морфогенетическим потенциалом;
- В) Слияние протопластов двух биологических видов методом электропорации;
- С) Отбор клеточных линий на средах, содержащих селективный агент;
- Д) Метод получения гибридных растений;
- Е) Метод получения соматических гибридов;
- Ф) Селекция клеточных линий и растений, обладающих новыми наследственными свойствами на уровне клеток;
- Г) Отбор клеточных линий, устойчивых к стресс-факторам в условиях *in vitro*;
- Н) Метод получения генетически модифицированных организмов.

7. Что такое селективная среда?

- А) Среда, в состав минеральной части которой входят только макросоли;
- В) Среда, содержащая фактор, по которому идет отбор клеток;
- С) Среда, в состав которой из фитогормонов входит только этилен;

- D) Среда, содержащая глицин;
- E) Среда, в состав которой входит селен.

8. Как можно повысить генетическую нестабильность культивируемой *in vitro* растительной клетки?

- A) Действием радиации;
- B) Действием химических мутагенов;
- C) Действием высоких концентраций солей;
- D) Действием экстремальных температур;
- E) Все перечисленное выше верно.

9. Какая хромосомная aberrация называется делецией?

- A) Участок хромосомы поворачивается на 180° ;
- B) Участок хромосомы удваивается;
- C) Хромосомы образуют хиазмы;
- D) Утеря участка хромосомы;
- E) Обрыв участка хромосомы и присоединение его к другой паре хромосом.

10. Какая хромосомная aberrация называется транслокацией?

- A) Участок хромосомы поворачивается на 180° ;
- B) Участок хромосомы удваивается;
- C) Хромосомы образуют хиазмы;
- D) Утеря участка хромосомы;
- E) Обмен между негомологичными участками хромосом.

11. Какая хромосомная aberrация называется дупликацией?

- A) Участок хромосомы поворачивается на 180° ;
- B) Участок хромосомы удваивается;
- C) Хромосомы образуют хиазмы;
- D) Утеря участка хромосомы;
- E) Добавление отдельных генов к основному набору.

12. Какие изменения относятся к геномным?

- A) Замена нуклеотида;
- B) Поворот участка хромосомы на 180° ;
- C) Увеличение количества хромосом кратно n ;
- D) Дупликация;
- E) Образование хромосомами хиазм.

13. Что такое пролиферация клеток?

- A) Образование вегетативных органов;
- B) Образование клеток и тканей путем размножения имеющихся клеток;
- C) Образование генеративных органов;
- D) Образование эмбриоидов;
- E) Образование каллуса.

14. Фенотипические варианты – это

- A) Соматональные варианты, отклоняющиеся от родительского типа, которые возникли в культуре;
- B) Растения взятые для введения в культуру;
- C) Генетические копии растений-доноров экспланта;
- D) Варианты питательной среды для получения растений-регенерантов;
- E) Мобильные генетические элементы.

15. Каков генотип гексаплоидной пшеницы?

- A) $4n$;
- B) $6n$;
- C) n ;
- D) $2n+1$;
- E) $2n$.

16. Генетическая нестабильность культивируемой *in vitro* растительной клетки является следствием:

- A) Гетерогенности клеток исходного экспланта;
- B) Тотипотентности соматических клеток;
- C) Следствием их частичной гетеротрофности;
- D) Следствием их чувствительности к кислотности среды;
- E) Следствием витрификации;
- F) Следствием нарушения коррелятивных связей при вычленении экспланта;
- G) Следствием влияния фитогормонов;
- H) Гомогенность клеток исходного экспланта.

17. Генетическая нестабильность культивируемой *in vitro* растительной клетки является следствием:

- A) Следствием особых осмотических свойств этих клеток;

- В) Следствием нарушения коррелятивных связей при вычленении экспланта;
- С) Следствием особого метаболизма этих клеток;
- Д) Гетерогенность клеток исходного экспланта;
- Е) Следствием накопления полифенолов;
- Ф) Следствием влияния экзогенных фитогормонов;
- Г) Гомогенность клеток исходного экспланта;
- Н) Следствием автотрофности этих клеток.

18. Генетическая нестабильность культивируемой *in vitro* растительной клетки является следствием:

- А) Следствием влияния эндогенных фитогормонов;
- В) Следствие спонтанной мутации;
- С) Следствием снижения фотосинтеза;
- Д) Следствием нарушения коррелятивных связей при вычленении экспланта;
- Е) Следствием влияния физических факторов культивирования;
- Ф) Следствием влияния агар-агара;
- Г) Следствием способности соматических клеток к образованию целого растения;
- Н) Тотипотентности соматических клеток.

19. Генетическая нестабильность культивируемой *in vitro* растительной клетки является следствием:

- А) Следствием повышения содержания связанной воды в этих клетках;
- В) Физиолого-генетической гетерогенностью клеток исходного экспланта;
- С) Следствием влияния химических факторов культивирования;
- Д) Следствием повышения содержания путресцина;
- Е) Следствием повышения содержания кадаверина;
- Ф) Следствием длительного культивирования *in vitro*;
- Г) Следствием автотрофности этих клеток;
- Н) Следствием гетеротрофности клеток.

20. Генетическая нестабильность культивируемой *in vitro* растительной клетки является следствием:

- А) Следствием влияния физико-химических факторов культивирования;

- В) Тотипотентности соматических клеток;
- С) Следствием снижения фотосинтеза;
- Д) Следствием витрификации;
- Е) Следствием разного содержания свободной воды в этих клетках;
- Ф) Следствием культивирования изолированных клеток в искусственных условиях;
- Г) Следствием полиплоидизации клеток в процессе культивирования;
- Н) Следствием накопления полифенолов в клетках.

8.2 Практические задания к главе «Клеточная селекция и изменчивость клеток, культивируемых *in vitro*»

Задание 1

Определите массовую долю (в %) хлорида натрия в растворе, содержащем 80 г соли в 500 г раствора.

Задание 2

Сколько граммов 30% раствора гидроксида калия надо прибавить к 20 г 90% раствора, чтобы получить 50% раствор?

Задание 3

Определите молярную и эквивалентную концентрацию серной кислоты, если известно, что в объеме 500 мл раствора серной кислоты содержится 196 г кислоты.

Задание 4

Определите прирост сырой массы каллуса картофеля, если известно, что начальная масса каллуса составляла 0,210 грамм, а по истечении 1 недели культивирования конечная сырая биомасса каллуса составила 0,985 грамм.

Задание 5

Сколько миллиграмм сухой соли CaCl_2 необходимо взвесить для приготовления 2 л среды Мурасиге-Скуга (МС)?

Примечание: в соответствии с протоколом в состав стандартной среды МС входит 440 мг/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Глава 9

СОХРАНЕНИЕ IN VITRO ГЕНОФОНДА. КРИОКОНСЕРВАЦИЯ

Современное растениеводство основано на регулярной смене сортов. Это связано с утратой сортом ценных признаков, появлением новых популяций вредителей и возбудителей болезней, изменением климата, почвы и множеством других причин. Средний срок жизни сорта пшеницы и других зерновых культур обычно 5-10 лет. Для выведения новых сортов и улучшения старых требуется разнообразный генетический материал. В целях сохранения генофонда редких и исчезающих видов, ценных селекционных объектов и штаммов — продуцентов экономически важных веществ разрабатываются методы создания коллекций и банков генов *in vitro*. Основным источником генов являются семена, но в последнее время, по мере развития биотехнологических методов и их применения в селекции, растет потребность в генетическом материале в виде культуры клеток и тканей. Более того, хранение *in vitro* удобно для тех видов растений, семена которых не могут храниться в обычных условиях и быстро теряют всхожесть, для вегетативно размножаемых видов и особенно для видов, исчезающих из природы. Для создания новых клеточных линий, синтезирующих ценные продукты, необходимо хранение коллекции клеток, то есть эталонов клеток-продуцентов, обладающих определенными характеристиками. Для исследования физиологических и биохимических процессов в культивируемых клетках возникает необходимость длительного сохранения исходных стандартных линий клеток. Таким образом, для решения как теоретических, так и

практических задач требуются надежные методы хранения культуры клеток.

В течение многих лет для поддержания исходных культур использовалось постоянное их выращивание при оптимальных условиях. Однако это чревато генетическими изменениями в культивируемых клетках, кроме того, это трудоемкая и дорогостоящая работа. Для решения проблемы хранения культуры клеток есть два подхода: либо *максимально замедлить ее рост*, либо хранить в замороженном состоянии – *криосохранение* (от греч. *kyos* – «мороз», «лед»).

Замедление роста клеток. Задача состоит в том, чтобы изменить кинетику роста культуры и увеличить время между пересадками. Это позволило бы пересаживать культуры раз в 3-4 месяца, года и даже реже. В настоящее время замедление роста под влиянием факторов, ограничивающих рост, достигнуто лишь для культур побегов и растений-регенерантов. Наиболее действенный путь замедления роста состоит в снижении температуры культивирования в сочетании с пониженным освещением. Выбор температуры определяется холодостойкостью вида растения. Так, для депонирования коллекций картофеля использовалась температура 10°C, а яблони 1°C. Рекомендуют для культур, нормально растущих при 20... 25°C, использовать 4... 10°C, а для культур, обычно растущих при температуре около 30°C – плюс 15...20°C.

Рост растения можно также замедлить добавлением к питательной среде осмотиков – маннита и сорбита, повышением концентрации сахарозы или внесением в питательную среду веществ, тормозящих рост. В качестве последних были использованы гидразид малеиновой кислоты, 2,2-метилгидразид янтарной кислоты, хлорхолинхлорид, абсцизовая кислота, п-диметилсукциаминовая кислота. В крайне редких случаях для замедления роста используют снижение содержания кислорода – гипоксию. Условия гипоксии создают, применяя смесь 90% азота и 10% кислорода. Иногда уменьшают концентрацию кислорода и одновременно снижают атмосферное давление. Во избежание истощения питательных веществ и обезвоживания объем агари-

зованной среды для медленно растущих культур увеличивают. Если используется жидкая питательная среда, ее время от времени доливают, поскольку она активнее испаряется. Хотя большинство культур обладает низкой скоростью роста и удалось значительно увеличить время между пересадками, оказалось невозможным сократить скорость роста до нуля. Современные знания не позволяют перевести культуры в состояние покоя, наблюдаемое в обычных семенах. Пока еще для полного прекращения роста тканей высших растений известно только криосохранение.

Криосохранение – это глубокое замораживание и хранение при сверхнизких температурах, например при температуре жидкого азота (-196°C). Гарантирует стабильное сохранение генетических характеристик объектов практически в течение любого срока. Этот метод позволяет хранить самый разнообразный материал – от изолированных протопластов до зародышей и семян. В настоящее время глубокое замораживание клеток, тканей и органов получило широкое распространение в медицине и животноводстве. Иначе обстоит дело с растительным материалом. Главные трудности связаны со спецификой растительных клеток и с самим процессом глубокого замораживания. Растительные клетки, имеющие большие размеры, большие вакуоли и много воды, сильнее повреждаются при замораживании и последующем оттаивании. Повреждение клеток связано с образованием льда как внутри клеток, так и снаружи. Лед обычно образуется сначала во внешнем растворе вокруг клеток. Точка замерзания цитоплазмы минус 1°C , но клетки остаются не замерзшими до $-10...-15^{\circ}\text{C}$, так как до этого плазмалемма еще предотвращает проникновение внутрь кристаллов льда, растущих во внешнем растворе. Рост кристаллов льда внутри клетки разрушает ее мембраны. Если температура снижается медленно, то клетка успевает потерять часть свободной воды, которая выходит из нее и замерзает на поверхности медленно растущих кристаллов во внешнем растворе. Очень быстрое замораживание не сопровождается дегидратацией и приводит к возникновению кристаллов льда в цитоплазме. Медленное замораживание может полностью исклю-

чить кристаллизацию воды в клетке, но при этом неизбежно происходит значительная дегидратация и сжатие протоплазмы. Обезвоживание клетки происходит вследствие концентрирования внешнего раствора из-за образования в нем льда. Чрезмерный плазмолиз и вызванный им осмотический стресс (особенно при последующем деплазмолизе) приводит клетку к гибели.

Таким образом, причиной гибели клеток при замораживании является образование льда внутри клетки и механическое повреждение ее мембран, а также осмотический стресс, обусловленный сильным обезвоживанием клетки. Выживание клеток растений зависит от целого ряда условий: генетических и морфофизиологических их особенностей и способности к холодовому закаливанию, состава и количества природных или искусственно добавляемых криопротекторов, уровня проницаемости этих веществ и воды, скорости снижения температуры и условий оттаивания.

Работа по криосохранению культуры клеток состоит из следующих этапов:

- подготовка культуры клеток,
- добавление криопротектора,
- программное замораживание,
- хранение в жидком азоте,
- быстрое оттаивание,
- удаление криопротектора,
- рекультивирование и регенерация растений.

Экспериментально показана возможность хранения при сверхнизких температурах культивируемых клеток, изолированных меристем, кончиков побегов, зародышей, пыльцы. Однако для криосохранения столь различающихся между собой объектов, конечно, требуются различные подходы и условия, начиная с самого начального этапа работы. Лучше всего методы криосохранения разработаны для суспензионных культур. Мелкие меристематические клетки более устойчивы к замораживанию, чем крупные вакуолизованные клетки. То же касается мелкодисперсных суспензий с рыхлыми агрегатами клеток по сравнению

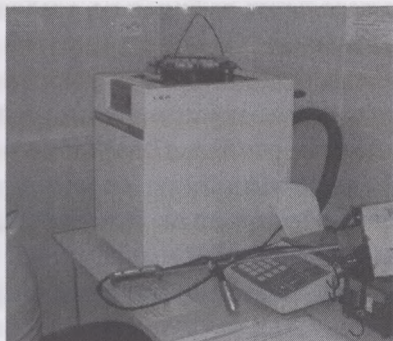
с большими плотными массами клеток. Клетки тропических видов растений могут оказаться менее устойчивыми, чем клетки растений умеренной зоны. Для более сложно организованных структур, таких как меристемы, зародыши, эмбриониды, требуется оптимизация условий каждого этапа.

Особое значение имеет специальная подготовка культуры, целью которой является обогащение ее клетками меристематического типа. Длительное культивирование в осмотике, синхронизация деления клеток, сокращение сроков пересадки способствуют уменьшению размеров клетки и увеличивают их выживаемость. Для суспензионных культур важным моментом подготовки является концентрирование.

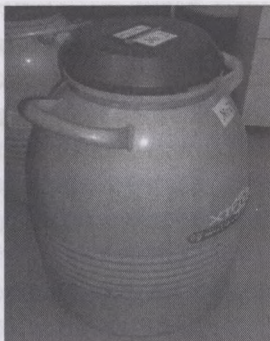
Криопротекторы – это вещества, которые снижают точку заморзания, связывают внутриклеточную воду и защищают клетки от механического и осмотического стресса. К ним относятся диметилсульфоксид (ДМСО), глицерин, пролин и сахароза, которая является для растений естественным криопротектором. Сами криопротекторы тоже могут вызвать осмотический стресс, поэтому подбираются их оптимальные концентрации и сочетания. ДМСО обладает уникальной проникающей способностью, это особенно важно для крупных плотных организованных структур, например меристем. Для них этап подготовки заключается, главным образом, в предварительном культивировании с добавлением в среду 5% ДМСО. Это обеспечивает создание эффективных криозащитных концентраций по всему апексу, размер которого около 0,3-0,5 мм.

Наряду с выбором криопротекторов, причем именно для данных клеток, очень важно найти оптимальную программу замораживания. Различают *медленное постепенное замораживание, быстрое и сверхбыстрое*. При медленном постепенном замораживании температура в интервале от 0° до -40° снижается со скоростью 0,5-1° в мин. При быстром замораживании объект в ампуле с криопротектором погружается сразу в жидкий азот. При сверхбыстром замораживании сам объект непосредственно вводится в жидкий азот. Пыльцу можно замораживать в сухом

виде, запечатанную в специальные пластмассовые ампулы, погружая их в жидкий азот в специальный сосуд Дьюара (рис. 16).



А



В

Рисунок 16. Аппараты, используемые для криоконсервации: программный замораживатель (А) и сосуд Дьюара (В)

Более успешные результаты дает программированное замораживание. Для этого требуются специальные конструкции с рабочей камерой, охлаждаемой с запрограммированной скоростью введением паров жидкого азота. В другом типе замораживателей образцы охлаждаются путем погружения в камеру, заполненную жидкостью с низкой температурой плавления, которая охлаждается с помощью электрической холодильной установки. Установка может быть термостатирована на определенную конечную температуру, достижение которой происходит со скоростью, зависящей от объема камеры, заполненной жидкостью. Кроме того, температура может регулироваться с помощью программного устройства. Еще проще устроены аппараты, в которых используются сосуды Дьюара или коробки из пенопласта. Возможно также суспендирование образцов в парах жидкого азота или погружение в охлажденную баню, проводимые при одной определенной отрицательной температуре. Лабораторные морозильники (-20°C) и камеры с сухим льдом (-78°C) для хранения

материала непригодны, особенно морозильники, в которых невозможно контролировать внутриклеточное замораживание.

Оттаивание и восстановление роста культур – ответственные и часто критические этапы процесса. При слишком медленном оттаивании клеток в них происходит повторное образование льда, оказывающее повреждающее действие. Быстрое оттаивание предотвращает это. Оттаивание производят, погружая ампулы в теплую баню (+40°C) либо капая на замороженные объекты теплую воду или среду для культивирования. Однако в исключительных случаях более целесообразным оказывается медленное оттаивание. После оттаивания удаляется криопротектор, что обычно делается на холоде. Основная часть физических изменений в клетках происходит при замораживании и оттаивании, однако, только что оттаявшие клетки сильно предрасположены к дальнейшим повреждениям и поэтому требуют тщательного «выживания». Это начинается с прямого пересаживания клеток на восстанавливающую среду без промывки с сохранением в клетках криопротекторов. Зачастую криопротектор удаляется специальными условиями отмывки. Когда материал находится на криосохранении, состояние культур оценить невозможно. Оценка проводится после оттаивания и нужна для использования культур. Для быстрой оценки культур наиболее пригодны тесты на жизнеспособность. Тесты желательно проводить не сразу после оттаивания, а на следующий день. Тесты проводят периодически в процессе возобновления роста для контроля за увеличением содержания жизнеспособных клеток или живой ткани.

Для образцов, видимых под микроскопом в проходящем свете, т.е. клеточных суспензий, протопластов, небольших каллусных и организованных структур, используют окрашивание флуоресцеиндиацетатом, синим Эванса и феносафранином. Для каллусов и плотных крупных организованных структур используют соли тетразолия. Изучают рост культивируемых клеток, используя любые стандартные методы измерения роста, включая прирост сырой и сухой массы, объем осевших клеток, оптическую плотность клеток, прямое микроскопическое наблюдение. Стандарт-

ные цитологические методы позволяют оценить степень повреждений и восстановительных процессов, происходящих в тканях. Еще более точные данные получают при исследовании ультраструктуры в электронном микроскопе. Учитывая гетерогенность культур клеток, их подготовку к замораживанию, нельзя полностью исключить возможность проявления селективных преимуществ для какой-нибудь субпопуляции, в особенности при низкой выживаемости после оттаивания. Поэтому бывает нужна генетическая, физиологическая и биохимическая проверка.

На этапе рекультивирования иногда применяют известные приемы интенсификации роста клеток во избежание селекции возможных мутантных холодоустойчивых клеток. Установлено, что хранение в жидком азоте не влияет на выживание и возобновление клеточных культур. Возобновленные культуры характеризуются той же скоростью роста и полным сохранением их морфогенетического, биосинтетического и биотрансформирующего потенциалов. Рекультивированные после хранения в жидком азоте клеточные культуры в основном идентичны исходным и пригодны для биотехнологического применения. Регенерировали целые растения из клеток моркови и других растений, из меристемы 16 видов растений, в том числе картофеля, томатов, гвоздики, плодовых. Глубокое замораживание сохраняет жизнеспособность и фертильность пыльцы, например, картофеля.

Таким образом, криобанк клеток, меристем, пыльцы обеспечивает сохранение генофонда не только культивируемых *in vitro* штаммов-продуцентов, но и редких и исчезающих видов, что особенно важно для вегетативно размножаемых растений. Генофонд растений *in vitro* – ценный источник для научных исследований и биотехнологии, поэтому работы по созданию криобанков ведутся во всем мире.

Вопросы для контроля:

1. Способы сохранения генофонда *in vitro*.
2. В чем преимущество криосохранения клеток?
3. Почему клетки повреждаются под воздействием низких температур?

4. Как надо подготовить клетки к криосохранению?
5. Что такое криопротектор?
6. Как проводят замораживание и оттаивание клеток?

9.1 Тестовые задания к главе 9 «Сохранение *in vitro* генофонда. Криоконсервация»

1. *Какие вещества не относятся к криопротекторам?*

- A) осмотики;
- B) глицерин;
- C) ДМСО;
- D) сахароза;
- E) ПААГ.

2. *При какой температуре проводят глубокое замораживание предварительно подготовленного растительного материала?*

- A) +5...+7° C;
- B) -5...-7° C;
- C) -100° C;
- D) -196° C;
- E) -96° C.

3. *При использовании какого метода происходит глубокое замораживание материала при очень низкой температуре (температуре жидкого азота)?*

- A) клеточная инженерия;
- B) клеточная селекция;
- C) криоконсервация;
- D) трансплантология;
- E) все ответы правильные.

4. *Какие вещества относятся к криопротекторам?*

- A) пролин;
- B) глицерин;
- C) диметилсульфоксид;
- D) сахароза;
- E) все ответы правильные.

5. Криоконсервация – это длительное хранение клеток, тканей и органов растений:

- А) в холодильнике, при низких положительных температурах;
- Б) в морозильнике, при низких отрицательных температурах;
- В) в жидком азоте;
- Г) лиофильно высушенных;
- Д) все ответы верны.

6. Какой из перечисленных этапов криосохранения происходит быстро?

- А) замораживание;
- Б) хранение в жидком азоте;
- В) размораживание;
- Г) проверка на жизнеспособность;
- Д) все ответы верны.

7. Какие вещества относятся к криопротекторам?

- А) осмотики;
- Б) ферменты;
- С) фитогормоны;
- Д) белки;
- Е) антитела.

8. При какой температуре происходит глубокое замораживание предварительно обработанного растительного материала?

- А) абсолютная температура;
- Б) температура жидкого азота;
- С) 0° С;
- Д) комнатная температура;
- Е) -96° С.

9. К криопротекторам относится:

- А) колхицин;
- Б) 2,4-Д;
- С) ДМСО;
- Д) кинетин;
- Е) зеатин.

10. Укажите криопротекторы:

- А) иммуноглобулины;
- В) ауксины;
- С) гиббереллины;
- Д) глицерин;
- Е) эфирные масла.

11. Какой углевод чаще добавляется в питательную среду в качестве источника углерода?

- А) Маннит;
- В) Сахароза;
- С) Крахмал;
- Д) Агар;
- Е) Амилоза.

12. Какие органы могут появляться в длительно культивируемой каллусной культуре *in vitro*?

- А) Почки;
- В) Побеги;
- С) Стебли;
- Д) Цветы;
- Е) Корни.

13. Следствием чего является витрификация?

- А) следствием нарушения азотного обмена растения;
- В) следствием нарушения водного режима растений *in vitro*;
- С) следствием нарушения обмена серы в растении;
- Д) следствием накопления полифенолов в растении;
- Е) следствием накопления алкалоидов в растении.

14. Какая из нижеприведенных структур является биополярной?

- А) Корни;
- В) Стебли;
- С) Почки;
- Д) Каллус;
- Е) Эмбрионид.

15. Витрификация – это:

- А) Высыхание и растрескивание агаризованной питательной среды;
- В) Явление «остекленения» клеток *In vitro* в результате повышенной влажности воздуха в культуральном сосуде;
- С) Возникновение беловатого каллуса;
- Д) Возникновение зародышеподобной структуры после слияния протопластов;
- Е) Образование раневой меристемы в месте поражения растения.

9.2 Практические задачи к главе «Сохранение *in vitro* генофонда. Криоконсервация»

Задача 1

Рассчитайте плотность клеточной суспензии табака, если известно, что количество клеток, подсчитанное в камере Горяева составляло 767 клеток, при степени разбавления равной 10.

Задача 2

Определите какой объем (мл) микроэлементов необходимо взять из 100-кратно концентрированного сток-раствора микроэлементов объемом 400 мл для приготовления 1 литра питательной среды Шенка-Хильдебрандта?

Примечание: расчет можно произвести по сульфату марганца $MnSO_4 \cdot H_2O$, концентрация которого по прописи составляет 10 мг/л.

Задача 3

Рассчитайте в каком количестве макроэлементов (мл) необходимо взять из 10-кратно концентрированного сток-раствора макроэлементов, объем которого составляет 500 мл, для приготовления двух литров питательной среды Лисмайер Скуга.

Примечание: расчеты можно произвести по сульфату магния $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, концентрация которого по протоколу составляет 370 мг/л.

РАЗДЕЛ II

АЛГОРИТМ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ. КЛЮЧИ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

1.1 Ключи ответов к тестовым заданиям по главе «История развития биотехнологии»

Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ
1	Е	10	С	19	А
2	Е	11	А	20	Д
3	В	12	В	21	А, D, G
4	А	13	А	22	В, F, H
5	Е	14	Д	23	В, F, G
6	В	15	Е	24	А, В, С
7	В	16	Е	25	С, G, H
8	Е	17	С		
9	Е	18	Е		

1.2 Ключи ответов к тестовым заданиям по главе «История развития биотехнологии»

Вариант 1 (Т 1)		
№	Номер вопроса	Ответ
1	1	В
	2	А
	3	С
2	4	В
	5	А
	6	Д
	7	С
3	8	С
	9	А
	10	В
4	11	В, С
	12	Д
	13	А
5	14	В
	15	А
	16	Д
	17	Е
	18	С

Вариант 2(Т 1)		
№	Номер вопроса	Ответ
1	1	В
	2	А
	3	Д
	4	С
	5	Е
2	6	В
	7	С
	8	А
3	9	В
	10	А
	11	Д
	12	С
4	13	В
	14	С
	15	А
5	16	В
	17	С
	18	А

2.1 Ключи к тестовым заданиям по главе «Принципы и методы культивирования клеток растений *in vitro*»

Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ
1	Е, F, G	23	С	45	А
2	С, F, G	24	С	46	С
3	Е, F, H	25	Е	47	Д
4	А, G, H	26	Е	48	С
5	В, F, G	27	А	49	С
6	А, С, Е	28	С	50	Д
7	А, D, F	29	С	51	Е
8	Д, F, G	30	Д	52	Д
9	Д, F, G	31	В	53	А
10	Д, F, G	32	В	54	В
11	А, F, H	33	В	55	В

12	D, F, H	34	E	56	A
13	A, F, H	35	A	57	D
14	C, G, H	36	B	58	B
15	A, D, G	37	E	59	E
16	A, B, D	38	E	60	C
17	A, C, E	39	B	61	A, C, E
18	A	40	E	62	A
19	A	41	E	63	B
20	D	42	C	64	C
21	A	43	B	65	E
22	D	44	C		

2.2 Решение и правильные ответы к заданиям по главе «Принципы и методы культивирования клеток растений *in vitro*»

Задание 1

Расчеты подобных задач проводятся по формуле:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2,$$

$$C_1 = C_2 \times V_1 / V_2$$

$$V_1 = C_1 \times V_2 / C_2$$

Для решения данной задачи необходимо вначале посчитать какое количество (в мг) сухого вещества приходится для приготовления 2 л питательной среды Мурасиге-Скуга (на примере KNO_3 , концентрация которого по прописи составляет 1900 мг/л), т.е.

$$1900 \text{ мг} - 1000 \text{ мл}$$

$$X - 2000 \text{ мл},$$

$$x = 1900 \times 2000 / 1000 = 3800 \text{ мг } KNO_3$$

Поскольку stock-раствор макроэлементов приготовлен из расчета 100-кратной концентрации макроэлементов, приведенных в прописи, растворенных в 500 мл бидистиллированной воды, то с учетом массы нитраты калия, необходимой для приготовления 2 л среды составляем вторую пропорцию:

$$1900 \text{ мг} * 10\text{-кратно} - 500 \text{ мл}$$

$$3800 \text{ мг}$$

$$- x,$$

$$x = 3800 \times 500 / 1900 \times 10 = 100 \text{ мл МаЭ}$$

Ответ: для приготовления 2 л питательной среды Мурасиге-Скуга необходимо из 10-кратно концентрированного раствора объемом 500 мл отобрать 100 мл раствора макроэлементов.

Задание 2

Расчет проводится в одно действие, т.к. объем приготавливаемой среды равен 1 литру (примечание: концентрации, которые приводятся в прописи любой среды указываются в миллиграммах на 1 литр среды)

$$\begin{array}{rcl} 10 \text{ мг} * 100\text{-кратно} & - & 300 \text{ мл} \\ 10 \text{ мг} & - & x, \quad x = 10 * 300 / 10 * 100 = 3 \text{ мл МиЭ}, \end{array}$$

где первая строка пропорции соответствует концентрации stock-раствора (увеличенная в 100-крат навеска микроэлемента, растворенная в 300 мл бидистиллированной воды), вторая строка пропорции соответствует концентрации одного из микроэлементов (в данном случае, расчет проводится на примере 10 мг/л MnSO_4).

Ответ: для приготовления 1 литра питательной среды Гамборга-Эвелега В5 из концентрированного stock-раствора микроэлементов необходимо отобрать 3 мл.

Задание 3

Эквивалентом элемента называют количество вещества в молях, которое соединяется с молем атомов водорода или замещает то же количество атомов водорода в химических реакциях. Например, в молекулах HCl и NaCl 1 моль атомов водорода (1,0079 г) эквивалентен 1 моль атомов натрия (22,9897 г).

Эквивалентная масса – это масса одного эквивалента вещества, выраженная в граммах на моль. Например, эквивалентная масса кислорода составляет 8 г/моль.

Эквивалентная масса элемента равна молярной массе атомов элемента, деленной на его валентность в данном химическом соединении.

Решение: Молярная и эквивалентная массы составляют: $M(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 106$ г/моль, $\mathcal{E}(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 53$ г/моль. Т.к. молярная и эквивалентная концентрации относятся к 1 л раствора, определим массу 1 л: $m = \rho \cdot V = 1,102 \cdot 1 = 1,102$ кг. В 100 г раствора содержится 10 соли, а 1,102 кг раствора - 110,2 г, что составляет $C_M = 110,2/106 = 1,04$ моль/л, $C_{\text{н}} = 110,2/53 = 2,08$ н.

Ответ: Молярная и эквивалентные концентрации составляют $C_M = 110,2/106 = 1,04$ моль/л, $C_{\text{н}} = 110,2/53 = 2,08$ н.

3.1 Ключи к тестам по разделу «Биологически активные вещества и биотехнология получения продуктов растительного происхождения»

Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ
1	Е	6	С	11	Д
2	В	7	В	12	Е
3	Е	8	А	13	Д
4	Е	9	С	14	Д
5	Е	10	С	15	Д

3.2 Решение и правильные ответы к заданиям по разделу «Биологически активные вещества и биотехнология получения продуктов растительного происхождения»

Задание 1

Прирост сырой биомассы каллуса рассчитывается по формуле

$$W = \frac{W_1 - W_0}{W_0} \quad \text{где } W_1 - \text{конечная сырая масса каллуса,} \\ W_0 - \text{начальная сырая масса каллуса.}$$

Таким образом, прирост сырой биомассы каллусной ткани моркови составляет: $W = 2100 - 200 / 200 = 9,5$ мг

Задание 2

Митотический индекс рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{\text{количество клеток в П+М+А+Т фазах} * 100\%}{\text{Общее количество клеток}}$$

т.е. митотический индекс в делящейся каллусной ткани табака подсчитывается следующим образом:

среднее значение количества клеток в интерфазе

$$= 65+86+78/3 = 76,33$$

$$\text{в профазе} = 130+153+145/3 = 96,66$$

$$\text{в метафазе} = 375+420+510/3 = 435$$

$$\text{в анафазе} = 280+178+140/3 = 199,33$$

$$\text{в телофазе} = 150+163+127/3 = 146,66, \text{ соответственно.}$$

$$\text{Митотический индекс} = \text{П+М+А+Т/И+П+М+А+Т} * 100\% = 96,66+435+199,33+146,66/953,98 * 100\% = 0,919 * 100\% = 91,99\%$$

Ответ: митотический индекс делящихся клеток каллусной ткани табака равен 91,99%.

Задание 3

Плотность суспензии клеток рассчитывают по формуле:

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

где X – плотность (количество клеток в определенном объеме суспензии), M – среднее количество клеток, подсчитанное в камере, n – степень разбавления.

$$X = 576 * 2 * 1000 / 3,2 = 360000 \text{ клеток/мл}$$

Ответ: плотность суспензии каллусной культуры картофеля составляет $3,6 * 10^5$ кл/мл

Задание 4

Раствором называют гомогенную систему, состоящую из двух или нескольких компонентов, один из которых растворитель, остальные – растворенные вещества.

Насыщенный раствор – это раствор, который находится в равновесии с твердой фазой растворенного вещества.

Ненасыщенный раствор – это раствор, концентрация которого меньше концентрации насыщенного раствора.

Пересыщенный раствор – это раствор, в котором растворяемого вещества содержится больше, чем в насыщенном при данной температуре.

Решение: Молярная концентрация $C_M = m/(M \cdot V)$, где m – масса растворенного вещества, г; M – молярная масса растворенного вещества, г/моль; V – объем раствора, л.

$$M_{H_2SO_4} = 98 \text{ г/моль}$$

$$C_M = 196/(98 \cdot 0,5) = 4 \text{ моль/л}$$

Эквивалентная концентрация определяется по формуле: $C_H = m/(\mathcal{E} \cdot V)$, где m – масса растворенного вещества, г; \mathcal{E} – эквивалентная масса растворенного вещества, г/моль; V – объем раствора, л.

$$\mathcal{E}_{H_2SO_4} = 49 \text{ г/моль}$$

$$C_H = 196/(49 \cdot 0,5) = 8 \text{ моль/л}$$

Ответ: молярная концентрация раствора серной кислоты составляет – 4 моль/л, эквивалентная концентрация составляет – 8 моль/л

Задание 5

Коэффициент растворимости – это количественный показатель растворимости твердых веществ и жидкостей, выражается массой вещества растворяемого в 1 л растворителя с образованием насыщенного раствора.

Растворимость газов определяется объемом газа, растворяющегося при постоянной температуре в одном объеме растворителя с образованием насыщенного раствора.

Решение: По условиям задачи $a^{25} = 360$ г/л. Коэффициент растворимости выражается соотношением $a^t = m/V$, где m – масса растворенного вещества, V – объем растворителя. Отсюда, $m = a^t \cdot V = 360 \cdot 2 = 720$ г.

Ответ: 720 г хлорида натрия растворится в 2 л воды при 25° С

4.1 Ключи к тестам по разделу «Технология клонального микроразмножения и оздоровления растений»

Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ
1	Е	13	А	25	А
2	В	14	Е	26	А
3	Д	15	В	27	Е
4	Д	16	В	28	Е
5	Е	17	А	29	Е
6	С	18	Д	30	С
7	А	19	Е	31	А
8	Д	20	Д	32	Д
9	С	21	В	33	Е
10	А	22	Д	34	В
11	С	23	Е		
12	Д	24	Д		

4.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим заданиям по главе «Технология клонального микроразмножения и оздоровления растений»

Задание 1

Это задание решается с помощью двух пропорций. Поскольку концентрация ИУК, которая необходима для стимулирования каллусообразования дана в миллиграммах на 1 литр среды, то вначале рассчитаем количество (в мл) ИУК, взятое из 1% сток-раствора, необходимое для приготовления 1 л питательной среды МС:

1% раствор соответствует 1 грамму (1000 мг) вещества, растворенного в 100 мл воды, таким образом

$$1000 \text{ мг} - 100 \text{ мл}$$

$$2 \text{ мг} - X, \quad X = 2 \times 100 / 1000 = 0,2 \text{ мл ИУК,}$$

т.е. для приготовления 1 л среды необходимо было бы добавить 0,2 мл ИУК для стимуляции каллусообразования в культуре клеток табака. Однако, по условиям задачи объем питательной среды

составляет 1,5 л (1500 мл), поэтому с учетом этого составляем вторую пропорцию:

$$0,2 \text{ мл} - 1000 \text{ мл}$$

$$X - 1500 \text{ мл}, \quad X = 0,2 \times 1500/1000 = 0,3 \text{ мл ИУК.}$$

Ответ: Для стимулирования каллусообразования в культуре клеток табака при приготовлении 1,5 л питательной среды Мурасиге-Скуга из 1% сток-раствора ИУК необходимо отобрать объем, равный 0,3 мл ИУК.

Задание 2

Это задание можно решать вышеприведенным способом, а также другим путем, а именно:

1) Вначале рассчитываем сколько (в мг) ИУК и кинетина необходимо взвесить для приготовления 2 литров питательной среды Гамборга-Эвелега (B_5):

Для ИУК

$$1 \text{ мг} - 1000 \text{ мл}$$

$$X - 2000 \text{ мл}, \quad X = 1 \times 2000/1000 = 2 \text{ мг ИУК}$$

Для кинетина

$$3 \text{ мг} - 1000 \text{ мл}$$

$$X - 2000 \text{ мл}, \quad X = 3 \times 2000/1000 = 6 \text{ мг кинетина,}$$

таким образом, для приготовления 2 литров питательной среды Гамборга-Эвелега, необходимо взвесить 2 мг ИУК и 6 мг кинетина.

2) Учитывая, что концентрация сток-раствора ИУК равна 1%, необходимо рассчитать какой объем маточного раствора ИУК и кинетина будет эквивалентен 2 мг и 6 мг ИУК и кинетина, соответственно:

$$\text{ИУК: } 1000 \text{ мг} - 100 \text{ мл (1\%)}$$

$$2 \text{ мг} - X, \quad X = 2 \times 100/1000 = 0,2 \text{ мл ИУК}$$

$$\text{Кинетин: } 1000 \text{ мг} - 100 \text{ мл (1\%)}$$

$$6 \text{ мг} - X, \quad X = 6 \times 100/1000 = 0,6 \text{ мл кинетина}$$

Ответ: Для индукции процессов гемо-ризогенеза в каллусной культуре картофеля из 1% сток-раствора кинетина и ИУК необходимо отобрать 0,2 мл ИУК и 0,6 мл кинетина.

Задание 3

Митотический индекс рассчитывается по следующей формуле:

$$X = \frac{П+М+А+Т * 100\%}{\text{Общее количество клеток}},$$

где П, М, А, Т – количество клеток, находящихся в профазе (П), в метафазе (М), анафазе (А), телофазе (Т) митоза. Общее количество клеток включает в себя количество митотически делящихся клеток и количество клеток, находящихся в интерфазе.

Митотический индекс в делящейся каллусной ткани табака подсчитывается как отношение суммы средних значений митотически делящихся клеток к общему количеству анализируемых клеток:

среднее значение количества клеток в интерфазе = $65 + 86 + 78/3 = 76,33$

в профазе = $130 + 153 + 145/3 = 96,66$

в метафазе = $375 + 420 + 510/3 = 435$

в анафазе = $280 + 178 + 140/3 = 199,33$

в телофазе = $150 + 163 + 127/3 = 146,66$, соответственно.

Митотический индекс = $\frac{П + М + А + Т}{И + П + М + А + Т} \times 100\% = \frac{96,66 + 435 + 199,33 + 146,66}{953,98} \times 100\% = 0,919 \times 100\% = 91,99\%$

Ответ: митотический индекс делящихся клеток каллусной ткани табака равен 91,99%.

Задание 4

Прирост каллусной биомассы рассчитывается по следующей формуле:

$$W = \frac{W_t - W_0}{W_0}, \quad \text{где } W_t - \text{конечная сырая масса каллуса,} \\ W_0 - \text{начальная сырая масса каллуса.}$$

Подставляя в формулу соответствующие значения конечной и начальной сырой биомассы, получаем

$$W = 1720 - 356/356 = 1364 / 356 = 38,31 \text{ мг}$$

Ответ: прирост сырой биомассы каллуса риса составляет 38,31 мг.

5.1 Ключи к тестовым заданиям по главе «Гаплоидная технология»

Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ
1	Е, F, G	8	D	15	B
2	B, F, H	9	C	16	A, D, F
3	Е, F, G	10	A	17	B, F, G
4	D, F, G	11	A	18	A, F, H
5	C, F, G	12	C	19	E
6	B, F, G	13	D	20	C
7	E	14	A		

5.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим заданиям по главе «Гаплоидная технология»

Задание 1

Известно, что 1% раствор эквивалентен 1000 мг вещества, растворенного в 100 мл дисгоды. В соответствии с этим положением для приготовления 0,1% раствора колхицина объемом 200 мл, необходимо навеску, равную 200 мг, растворить в 200 миллилитрах дисгоды.

Ответ: для приготовления 0,1% раствора колхицина объемом 200 мл необходимо взвесить 200 мг сухого порошка колхицина

Задание 2

Для того, чтобы определить сколько миллилитров необходимо добавить из 5% сток-раствора ИУК, эквивалентного по содержанию 1,5 мг/л ИУК для приготовления 2 литров питательной среды Potato вначале по пропорции рассчитаем сколько миллиграмм сухого ИУК необходимо взять для приготовления 2 литров среды:

$$1) 1,5 \text{ мг} - 1000 \text{ мл}$$

$$X, \text{ мг} - 2000 \text{ мл},$$

$$X = 1,5 \text{ мг} \times 2000 \text{ мл} / 1000 \text{ мл} = 3 \text{ мг}$$

2) Вторую пропорцию составляем, учитывая концентрацию сток-раствора ИУК. Зная, что 5% раствор ИУК эквивалентен 5000 мг ИУК, растворенных в 100 мл дисгоды, рассчитываем количество ИУК (в мл):

$$5000 \text{ мг} - 100 \text{ мл}$$

$$3 \text{ мг} - X, \text{ мл}$$

$$X = 3 \text{ мг} \times 100 \text{ мл} / 5000 \text{ мг} = 0,06 \text{ мл}$$

Ответ: для приготовления 2 литров питательной среды Potato из 5% сток-раствора ИУК необходимо взять 0,06 миллилитров

Задание 3

При приготовлении 1% раствора колхицина навеску, равную 1 грамм колхицина, растворяют в объеме 100 мл дистиллированной воды. В соответствии с этим положением для приготовления 0,1% раствора колхицина необходимо взвесить 100 мг колхицина и растворить его в 100 мл дистиллированной воды.

Ответ: для приготовления 0,1% раствора колхицина, применяемого для дигаплоидизации гаплоидных растений, необходимо взвесить 100 мг колхицина

Задание 4

Для решения данного задания вначале рассчитаем сколько миллиграмм витамина В₁ необходимо взвесить для приготовления 1,5 литра питательной среды Гамборга-Эвелега В₅:

$$10 \text{ мг} - 1000 \text{ мл}$$

$$X, \text{ г} - 1500 \text{ мл}$$

$$x = 10 \text{ мг} \times 1500 \text{ мл} / 1000 \text{ мл} = 15 \text{ мг} \text{ витамина В}_1$$

Составив вторую пропорцию, мы узнаем какой объем (в мл), взятый из 5% сток-раствора, будет эквивалентен 15 мг витамина В₁:

$$5000 \text{ мг} - 100 \text{ мл} (5\%)$$

$$15 \text{ мг} - x, \text{ мл}$$

$$x = 15 \text{ мг} \times 100 \text{ мл} / 5000 \text{ мг} = 0,3 \text{ мл}$$

Ответ: для приготовления 1,5 литров питательной среды Гамборга-Эвелегга В₅ из 5%-го сток-раствора витамина В₁ необходимо взять 0,3 мл.

Задание 5

На примере, известной нам из условия задачи, концентрации макросоли КС1 рассчитаем какой объем (в мл) макроэлементов мы возьмем из концентрированного сток-раствора макросолей для приготовления 1 литра питательной среды Уайта.

$$65 \text{ мг} \times 10(\text{кратно}) - 200 \text{ мл}$$

$$65 \text{ мг} \quad \quad \quad - x, \text{ мл}$$

$$X = 65 \text{ мг} \times 200 \text{ мл} / 650 \text{ мг} = 20 \text{ мл}$$

Соответственно, для приготовления среды Уайта объемом 0,5 литра количество макроэлементов будет в 2 раза меньше, чем для среды, рассчитанной на 1 литр, т.е. будет равно 10 миллилитрам.

Ответ: для приготовления 0,5 литров питательной среды Уайта необходимо взять 10 мл концентрированного сток-раствора макроэлементов.

6.1 Ключи к тестовым заданиям по главе «Клеточная инженерия»

Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ
1	С, F, G	10	С, E, G	19	E, G, H	28	A
2	E, F, G	11	A, F, H	20	F, G, H	29	E
3	D, F, G	12	D, G, H	21	F, G, H	30	A
4	A, F, H	13	E, F, H	22	E, G, H	31	E
5	B, C, D	14	D, F, H	23	F, G, H	32	C
6	A, B, C	15	E, G, H	24	B, F, G	33	C
7	A, F, H	16	A, B, C	25	E, F, G	34	E
8	D, F, H	17	D, G, H	26	E	35	C
9	E, H, F	18	A, E, F	27	C		

6.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим заданиям по главе «Клеточная инженерия»

Задание 1

Для приготовления 100 мл 0,4 М раствора сахарозы необходимо произвести расчеты по формуле:

$$C_M = \frac{v}{V}; \quad v = \frac{m}{M}; \quad C_M = \frac{m}{V * M} \quad \Rightarrow \quad m = C_M * V * M$$

$$M(C_{12}H_{22}O_{11}) = 342,3 \text{ г}$$

$$m = 0,4 \text{ М} \times 0,1 \text{ л} \times 342,3 \text{ г} = 13,692 \text{ г}$$

Ответ: для приготовления 100 мл 0,4 М раствора сахарозы необходимо взвесить 13,692 г сахарозы.

Задание 2

Для приготовления 100 мл 100 мМ CaCl₂, используемого в химическом методе слияния протопластов, необходимо произвести следующие расчеты:

$$C_M = \frac{v}{V}; \quad v = \frac{m}{M}; \quad C_M = \frac{m}{V * M} \quad \Rightarrow \quad m = C_M * V * M$$

$$M(CaCl_2) = 75,5$$

$$m = 0,1 \text{ М} \times 0,1 \text{ л} \times 75,5 = 0,755 \text{ г}$$

Ответ: для приготовления 100 мл 100 мМ CaCl₂ необходимо взвесить 0,755 г хлорида кальция.

Задание 3

Данная задача решается следующим образом:

1) во-первых, рассчитаем массу (в мг) фитогормона, необходимого для приготовления 2 литров среды Шенка-Хильдербрандта:

$$6 \text{ мг} - 1000 \text{ мл}$$

$$X, \text{ мг} - 2000 \text{ мл},$$

$$X = 6 \text{ мг} \times 2000 \text{ мл} / 1000 \text{ мл} = 12 \text{ мг зеатина},$$

т.е. на 2 литра среды Шенка-Хильдербрандта необходимо добавить 12 мг зеатина;

2) во-вторых, зная концентрацию сток-раствора зеатина, рассчитаем какой объем его (в мл) будет эквивалентен 12 мг фитогормона:

$$1000 \text{ мг} - 100 \text{ мл (1\%)}$$

$$12 \text{ мг} - X, \text{ мл}$$

$$X = 12 \text{ мг} \times 100 \text{ мл} / 1000 \text{ мл} = 0,12 \text{ мл зеатина}$$

Ответ: для индукции геммогенеза в каллусной культуре ячменя необходимо взять 0,12 мл из 1%-го сток-раствора зеатина.

7.1 Ключи к тестовым заданиям по главе «Генная инженерия»

Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ
1	В, F, G	21	А, F, G	41	А
2	В, E, G	22	С	42	Е
3	А, В, D	23	А	43	В
4	D, F, H	24	Е	44	А
5	Е, G, H	25	В	45	А
6	В, F, H	26	В	46	А
7	С, E, G	27	В	47	В
8	А, С, H	28	С	48	С
9	В, F, H	29	С	49	D
10	А, В, D	30	А	50	Е
11	С, F, G	31	В	51	А
12	Е, F, G	32	D	52	В
13	D, F, H	33	А	53	Е
14	Е, F, H	34	Е	54	С
15	D, F, H	35	D	55	В
16	А, E, F	36	В	56	А
17	А, F, G	37	А	57	В
18	F, G, H	38	Е	58	С
19	А, F, H	39	С	59	D
20	F, G, H	40	Е	60	В

7.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим задачам по главе «Генная инженерия»

Задание 1

Применяя BamHI рестриктазу получают 2 фрагмента:

- 1) 5'-ЦТГААТТАГ-3'
3'-ГАЦТТААТЦЦТАГ-5'
- 2) 5'-ГАТЦЦАГГЦААТАГТГТГ-3'
3'-ГТЦЦГТТАТЦАЦАЦ-5'

С помощью EcoRI рестриктазы получают 2 фрагмента:

- 1) 5'-ЦТГААТТАГГАТ-3'
3'-ГАЦТТААТЦЦТАГГТЦЦ-5'
- 2) 5'-ЦЦАГГЦААТАГТГТГ-3'
3'-ГТТАТЦАЦАЦ-5'

Задание 2

ДНК: 5'-CCCATGCCGGT-3'
3'-GGGTACGGCCA-5'

мРНК: 5'-CCC AUG CCG GU-3'

белок: пролин-метионин-пролин

Вследствии влияния УФ лучей получают:

ДНК: 5'-CCCTGCCGGT-3'
3'-GGGACGGCCA-5'

мРНК: 5'-CCC UGC CGG U-3'

белок: пролин-цистеин-аргинин

Задание 3

В кольцевой плазмиде pBR322 благодаря ферменту Hind III рестрицирующей эндонуклеазы можно получить фрагмент

5'-ЦЦТТААГЦТТАГГЦТААГГЦААТАГААГЦТТТЦААТГ-3'
3'-ГГААТТЦГААТЦЦГАТТЦЦГТТАТЦТТЦГАААГТТАЦ-5'

Задание 4

ДНК: 5'-CCCAAAAAGATA-3'

мРНК: 5'-CCC AAA AAG AUA -3'

белок: пролин-лизин-лизин-изолейцин

Если удалить второй нуклеотид, то получают:

ДНК: 5'-ССАААААGАТА-3'

мРНК: 5'-ССА ААА АGА UА-3'

белок: пролин-лизин-аргинин

Задание 5

белок: – серин – глицин – серин – изолейцин – треонин – пролин – серин –

мРНК: 5'-UCU GGU UCU AUU ACU CCU UCU-3'

при замене С → U

мРНК: 5'-UGU GGU UGU AUU AGU GGU UGU-3'

белок: -цистеин-глицин-цистеин-изолейцин-серин-глицин-цистеин

8.1 Ключи к тестовым заданиям по главе: «Клеточная селекция и изменчивость клеток, культивируемых *in vitro*»

Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ
1	С, D, H	6	F, G, C	11	B	16	A, F, G
2	A, F, H	7	B	12	C	17	B, D, F
3	B, F, G	8	E	13	B	18	B, D, E
4	A, B, C	9	D	14	A	19	B, C, F
5	A, B, E	10	E	15	B	20	A, F, G

8.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим заданиям по главе «Клеточная селекция и изменчивость клеток, культивируемых *in vitro*»

Задание 1

Массовая доля ω – число единиц массы растворенного вещества, содержащихся в 100 единицах массы раствора. Так, 20% раствор содержит 20 единиц массы растворенного вещества в 100 единицах массы раствора.

растворенного вещества, содержащихся в 1 л раствора. Так, 2М раствор содержит 2 моли растворенного вещества в 1 л раствора.

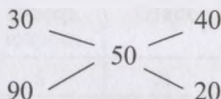
Эквивалентная концентрация (или нормальность) C_H – число эквивалентов растворенного вещества, содержащихся в 1 л раствора.

Решение: Массовая доля выражается соотношением $\omega = (m / m_1) \cdot 100\%$, где m – масса растворенного вещества, m_1 – масса раствора. Соответственно, по условию задачи $\omega = (80/500) \cdot 100 = 16\%$.

Ответ: массовая доля равна 16%.

Задание 2

Используя «правило креста», в точке пересечения обозначают необходимую концентрацию, слева указывают концентрации составных частей, а справа – разности концентраций:



Из схемы следует, что для приготовления 50% раствора гидроксида калия требуется взять 40 г 30% раствора и 20 г 90% раствора гидроксида калия.

Задание 3

Раствором называют гомогенную систему, состоящую из двух или нескольких компонентов, один из которых растворитель, остальные – растворенные вещества.

Насыщенный раствор – это раствор, который находится в равновесии с твердой фазой растворенного вещества.

Ненасыщенный раствор – это раствор, концентрация которого меньше концентрации насыщенного раствора.

Пересыщенный раствор – это раствор, в котором растворимого вещества содержится больше, чем в насыщенном при данной температуре.

Решение: Молярная концентрация рассчитывается по формуле:

$$C_M = m / (M \times V),$$

где m – масса растворенного вещества, г; M – молярная масса растворенного вещества, г/моль; V – объем раствора, л.

$$M_{H_2SO_4} = 98 \text{ г/моль}$$

$$C_M = 196 / (98 \times 0,5) = 4 \text{ моль/л}$$

Эквивалентная концентрация определяется по формуле:

$$C_H = m / (\mathcal{E} \times V),$$

где m – масса растворенного вещества, г; \mathcal{E} – эквивалентная масса растворенного вещества, г/моль; V – объем раствора, л.

$$\mathcal{E}_{H_2SO_4} = 49 \text{ г/моль}$$

$$\mathcal{E}_M = 196 / (49 \times 0,5) = 8 \text{ моль/л.}$$

Ответ: молярная концентрация раствора серной кислоты составляет – 4 моль/л, эквивалентная концентрация составляет – 8 моль/л.

Задание 4

Прирост каллусной сырой биомассы определяют по формуле:

$$W = \frac{W_t - W_0}{W_0}, \quad \text{где } W_t \text{ – конечная масса каллуса}$$

$$W_0 \text{ – начальная масса каллуса}$$

Подставляя в формулу соответствующие значения конечной и начальной сырой биомассы, получаем:

$$W = 0,985 - 0,210 / 0,210 = 0,0369 \text{ грамм}$$

Ответ: прирост сырой биомассы каллуса картофеля составляет 0,0369 г.

Задание 5

Для решения данной задачи вначале определяют молекулярную массу безводной соли хлорида кальция $CaCl_2$ и двух-водной соли $CaCl_2 \times 2H_2O$, а затем рассчитывают сколько $CaCl_2$ (мг) необходимо взвесить для 1 литра среды (т.к. концентрация соли в стандартном протоколе указывается в мг/л).

$$M(CaCl_2 \times 2H_2O) = 40 + (2 \times 35,5) + 2 \times (2 \times 1 + 16) = 146 \text{ г}$$

$$M(\text{CaCl}_2) = 40 + (2 \times 35,5) = 110 \text{ г}$$

$$146\,000 \text{ мг} - 440 \text{ мг}$$

$$110\,000 \text{ мг} - X, \text{ мг}$$

$$X = 110000 \text{ мг} \times 440 \text{ мг} / 146000 \text{ мг} = 331,50 \text{ мг}$$

Соответственно для приготовления двух литров питательной среды МС необходимо взять в 2 раза больше количества макросоли, чем рассчитано ее для 1 литра среды, т.е. 663 миллиграмм ($331,50 \text{ мг} \times 2 = 663 \text{ мг}$)

Ответ: для приготовления 2 литров питательной среды Мура-сиге-Скуга (МС) необходимо взвесить 663 миллиграмм (мг) сухой соли CaCl_2 .

9.1 Ключи к тестовым заданиям по главе «Сохранение in vitro генофонда. Криоконсервация»

Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ	Номер вопроса	Ответ
1	Е	6	А	11	В
2	Д	7	А	12	Е
3	С	8	В	13	В
4	Е	9	С	14	Е
5	С	10	Д	15	В

9.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим заданиям по главе «Сохранение in vitro генофонда. Криоконсервация»

Задание 1

Плотность клеточной суспензии рассчитывается по формуле:

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

где X – количество клеток, M – среднее количество клеток в камере, n – степень разведения, 3,2 – коэффициент дезагрегации.

Учитывая степень разведения равную 10, а также зная среднее количество клеток, подсчитанное в камере Горяева, равное 767, мы можем рассчитать плотность суспензии, т.е. количество клеток в 1 миллилитре суспензии:

$$X = 767 \times 10 \times 1000/3,2 = 2396875 \text{ клеток /мл}$$

Ответ: плотность клеточной суспензии табака составляет $2,3 \cdot 10^6$ кл/мл.

Задание 2

Для решения этой задачи рассчитаем какой объем (мл) из концентрированного раствора микроэлементов необходимо взять для приготовления 1 литра питательной среды Шенка-Хильдебрандта на примере микросоли $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:

$$10 \text{ мг} \times 100(\text{кратно}) - 400 \text{ мл}$$

$$10 \text{ мг} \quad \quad \quad - X, \text{ мл}$$

$$X = 10 \text{ мг} \times 400 \text{ мл} / 10 \text{ мг} \times 100 = 4 \text{ мл}$$

Ответ: для приготовления 1 литра питательной среды Шенка-Хильдебрандта из сток-раствора микроэлементов необходимо взять 4 мл.

Задание 3

Определим объем макроэлементов, необходимый для приготовления 1 литра питательной среды Лисмайер-Скуга, с учетом концентрации сток-раствора (на примере макросоли $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$):

$$370 \text{ мг} \times 10(\text{кратно}) - 500 \text{ мл}$$

$$370 \text{ мг} \quad \quad \quad - X, \text{ мл}$$

$$X = 370 \text{ мг} \times 500 \text{ мл} / 370 \text{ мг} \times 10 = 50 \text{ мл}$$

Соответственно для приготовления двух литров питательной среды Лисмайер-Скуга необходимо взять в 2 раза больше объема макросоли, чем рассчитано ее для 1 литра среды, т.е. 100 мл ($50 \text{ мл} \times 2 = 100 \text{ мл}$).

Ответ: для приготовления 2 литров питательной среды Лисмайер-Скуга необходимо добавить 100 мл концентрированного раствора макроэлементов.

ГЛОССАРИЙ

Ауксотрофы – это биохимические мутанты клеток, которые вследствие мутации утратили способность расти на обычной питательной среде и требуют добавления какого-либо вещества, синтез которого у них блокирован мутацией.

Биотехнология (гр. Bios – живой, techne – изобретение, техника, logos – наука) – отрасль науки и производства, основанная на использовании биологических процессов и объектов для производства экономически важных веществ и создания высокопродуктивных сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов.

Истинная гибридная клетка (ядерный гибрид) – гибридная клетка, образуемая при слиянии ядер двух протопластов.

Вектор – это специфические в отношении клетки-хозяина способные к репликации структуры, которые могут присоединять к себе те или иные гены и переносить их в другие клетки. Вектор – это нуклеотидная последовательность, способная включаться в ДНК, не нарушая ее целостности.

Гетерокарион – гибридная клетка, образуемая при слиянии двух протопластов, в которых слияние ядер не происходит.

Генетическая инженерия – это конструирование функционально активных генетических структур в виде рекомбинантных (гибридных) молекул ДНК.

Детерминация – приобретение клеткой состояния готовности к реализации определенных наследственных свойств. Детерминация приводит к развитию по определенному пути с одновременным ограничением возможности развития в других направлениях (определение пути развития каждой клетки, при котором вступление на тот или иной путь развития определяется особым набором белков).

Дедифференциация – процесс перехода специализированных неделящихся клеток к пролиферации.

Дифференциация – это комплекс процессов, приводящих к различиям между материнскими и дочерними клетками, а также между дочерними клетками, связанный с их функциональной специализацией.

Инокулюм – это часть суспензионной культуры, используемая для пересадки на свежую среду.

In vitro (лат. in vitro – в стекле) – в переводе с латинского языка означает «в стекле», в искусственных условиях.

In vivo (лат. in vivo – в составе живого организма) – в переводе с латинского языка означает в природных, естественных условиях, в неизменном виде, в составе организма.

Каллус – ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток.

Суспензионная культура клеток – культура клеток растений, выращиваемая глубинным способом в жидкой среде, при котором для поддержания клеток во взвешенном состоянии их перемешивают путем непрерывного вращения или качания среды, либо путем продувания жидкой среды стерильным воздухом.

Непрерывное культивирование – способ культивирования, при котором клетки выращиваются в проточном режиме.

Закрытая проточная система культивирования – система культивирования, при которой суспензионная культура непрерывно снабжается свежей средой, при этом приток ее сбалансирован оттоком равного количества использованной среды.

Полупроточная система культивирования клеток – система выращивания клеток, при которой определенная часть суспензии время от времени отбирается и оставшаяся часть разбавляется свежей средой.

Открытая проточная система культивирования клеток – система культивирования, при которой обеспечивается баланс между притоком свежей питательной среды и удалением равного объема клеточной суспензии.

Культивирование клеток в режиме турбидостата – режим выращивания клеток, который предусматривает непрерывное культивирование без внешнего лимитирования, рост клеток популяции поддерживается на определенном уровне регулированием оптической плотности культуры.

Культивирование клеток в режиме хемостата – режим выращивания клеток, при котором непрерывное культивирование идет под воздействием лимитирующего рост фактора.

Клеточная инженерия – это метод конструирования клеток нового типа на основе их культивирования, гибридизации и реконструкции.

Клеточная селекция – это процесс возрастающего доминирования в культуре клеток определенного типа.

Клеточные линии – это потомство от нескольких клеток, например, составляющих один агрегат в суспензионной культуре.

Клон (от греч. *klon* – отпрыск, ветвь) – растение, полученное путем бесполого, т. е. вегетативного размножения.

Клональное микроразмножение – это массовое бесполое размножение в культуре тканей и клеток, при котором возникшие растения генетически идентичны исходному экземпляру.

Цикл выращивания – это период от помещения инокулюма в свежую среду до следующего субкультивирования.

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

Протопласт – клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

Соматоклональные варианты – это растения-регенеранты, отклоняющиеся

ПРИЛОЖЕНИЕ

Состав питательных сред, широко применяемых для
культивирования клеток растений *in vitro*

Компоненты среды	Концентрация, мг/л					
	Среда Мурасиге-Скуга	Среда Уайта	Среда Шенка-Хиль-дербрандта	Среда В ₃	Среда Хеллера	Среда Линсмайера-Скуга
Макроэлементы						
Ca(NO ₃) ₂	-	142	-	-	-	-
KNO ₃	1900	81	2500	3000	-	1900
NaNO ₃	-	-	-	-	600	-
NH ₄ NO ₃	1650	-	-	-	-	1650
NH ₄ H ₂ PO ₄	-	-	300	-	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	134	-	-
MgSO ₄ x 7H ₂ O	370	74	400	500	250	370
CaCl ₂ x 2H ₂ O	440	-	200	150	75	440
KCl	-	65	-	-	750	-
KH ₂ PO ₄	170	12	-	-	-	170
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	-	-	-	150	125	-
Микроэлементы						
MnSO ₄ x H ₂ O	-	-	10	10	-	-
MnSO ₄ x 4H ₂ O	22,3	-	-	-	0,1	22,3
KJ	0,83	-	1	0,75	0,01	0,83
H ₃ BO ₃	6,2	-	5	3	1	6,2
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,6	-	1	2	1	8,6
CuSO ₄	-	-	0,2	0,25	-	-
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,025	-	-	-	0,03	0,025
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,25	-	0,1	0,25	-	0,25

CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,025	-	0,1	0,025	-	0,025
AlCl ₃	-	-	-	-	0,03	-
NiCl ₂ x 6H ₂ O	-	-	-	-	0,03	-
Хелат железа						
FeCl ₃ x 6H ₂ O	-	-	-	-	1	-
FeSO ₄ x 7H ₂ O	27,8	-	15	-	-	27,86
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	2,46	-	-	-	-
Сиквестрен-330 Fe	-	-	-	28	-	-
Na ₂ ЭДТА	37,3	-	20	-	-	37,26
Органические вещества						
Мезоинозит	100	-	1000	100	-	100
Тиамин-HCl	0,1	-	5	10	-	0,4
Никотиновая кислота	0,5	-	0,5	1	-	-
Пиридоксин-HCl	0,5	-	0,5	1	-	-
Дрожжевой экстракт	-	100	-	-	-	-
Сахароза	30000	20000	30000	20000	20000	30000
pH	5, 6 - 5,8	-	5,9	5,5	-	5,8

Литература

Основная:

1. Алмагамбетов К.Х. Основы биотехнологии. – Астана, 2006. – 223 с.
2. Валиханова Г.Ж. Биотехнология растений. – Алматы: Қонжық, 1996. – 272 с.
3. Егорова Т.А. и др. Основы биотехнологии / Т.А. Егорова, С.М. Клунова, Е.А. Живухина. – 3-е изд. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 208 с.
4. Швелуха В.С. и др. Сельскохозяйственная биотехнология / В.С. Швелуха, Е.А. Калашникова, С.В. Дегтярев и др. – М.: Высш. шк., 2004.
5. Антипова Л.В. и др. Прикладная биотехнология / Л.В. Антипова, А.И. Жаринов. – Воронеж.: ВГТА, 2001. – 332 с.

Дополнительная:

1. Кершанская О.В. Генетическая инженерия растений. Практический подход. – Алматы, 2007. – 152 с.
2. Сазыкина Ю.А. и др. Биотехнология: учеб. пособие / Ю.А. Сазыкина, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева, под ред. А.В. Катлинского. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 256 с.
3. Тихонов И.В. и др. Биотехнология / И.В. Тихонов, А.И. Рубан и др. – СПб.: ГИОРД, 2005. – 792 с.
4. Глик Б. и др. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак. – М.: изд. Мир, 2002.

Оглавление

Введение	3
----------------	---

РАЗДЕЛ I

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ БИОТЕХНОЛОГИИ
РАСТЕНИЙ. ТЕСТОВЫЕ И ПРАКТИЧЕСКИЕ ЗАДАНИЯ,
ПРЕДНАЗНАЧЕННЫЕ ДЛЯ КОНТРОЛЯ
САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ СТУДЕНТОВ

Глава 1

ИСТОРИЯ РАЗВИТИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ	6
1.1 Тестовые задания к главе «История развития биотехнологии»	14
1.2 Задания к главе «История развития биотехнологии»	19

Глава 2

ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ IN VITRO	25
2.1 Тестовые задания к главе «Принципы к главе и методы культивирования растительных клеток in vitro»	49
2.2 Практические задания к главе «Принципы к главе и методы культивирования растительных клеток in vitro»	62

Глава 3

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА И БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОДУКТОВ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	63
3.1 Тестовые и практические задания к главе 3 «Биологически активные вещества и биотехнологии для получения продуктов растительного происхождения»	77

3.2 Практические задания и задачи к главе «Биологически активные вещества и биотехнологии для получения продуктов растительного происхождения»	82
--	----

Глава 4

ТЕХНОЛОГИЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ И ОЗДОРОВЛЕНИЯ РАСТЕНИЙ	84
---	----

4.1 Тестовые задания к главе 4 «Технология клонального микроразмножения и оздоровления растений»	100
4.2 Практические задания и задачи к главе 4 «Технология клонального микроразмножения и оздоровления растений»	106

Глава 5

ГАПЛОИДНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ	108
-----------------------------	-----

5.1 Тестовые задания к главе 5 «Гаплоидная технология»	120
5.2 Практические задачи к главе 5 «Гаплоидная технология»	124

Глава 6

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ	126
---------------------------	-----

6.1 Тестовые задания к главе 6 «Клеточная инженерия»	147
6.2 Практические задания к главе 6 «Клеточная инженерия»	156

Глава 7

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ	158
---------------------------------------	-----

7.1 Тестовые задания к главе 7 «Генетическая инженерия растений»	180
7.2 Практические задачи к главе 7 «Генетическая инженерия растений»	195

Глава 8

КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ IN VITRO	197
---	-----

8.1 Тестовые задания к главе 8 «Клеточная селекция и изменчивость клеток, культивируемых in vitro»	208
8.2 Практические задания к главе «Клеточная селекция и изменчивость клеток, культивируемых in vitro»	214

Глава 9	
СОХРАНЕНИЕ IN VITRO ГЕНОФОНДА	
КРИОКОНСЕРВАЦИЯ	215
9.1 Тестовые задания к главе 9	
«Сохранение in vitro генофонда. Криоконсервация»	223
9.2 Практические задачи к главе	
«Сохранение in vitro генофонда. Криоконсервация»	228

РАЗДЕЛ II

АЛГОРИТМ РЕШЕНИЯ ЗАДАЧ.

КЛЮЧИ К ТЕСТОВЫМ ЗАДАНИЯМ

1.1 Ключи ответов к тестовым заданиям по главе	
«История развития биотехнологии»	228
1.2 Ключи ответов к тестовым заданиям по главе	
«История развития биотехнологии»	228
2.1 Ключи к тестовым заданиям по главе «Принципы и	
методы культивирования клеток растений in vitro»	229
2.2 Решение и правильные ответы к заданиям по главе	
«Принципы и методы культивирования клеток	
растений in vitro»	230
3.1 Ключи к тестам по разделу «Биологически активные	
вещества и биотехнология получения продуктов	
растительного происхождения»	232
3.2 Решение и правильные ответы к заданиям по разделу	
«Биологически активные вещества и биотехнология	
получения продуктов растительного происхождения»	232
4.1 Ключи к тестам по разделу «Технология клонального	
микроразмножения и оздоровления растений»	235
4.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим	
заданиям по главе «Технология клонального	
микроразмножения и оздоровления растений»	235
5.1 Ключи к тестовым заданиям по главе	
«Гаплоидная технология»	238
5.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим	
заданиям по главе «Гаплоидная технология»	238

6.1 Ключи к тестовым заданиям по главе «Клеточная инженерия»	240
6.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим заданиям по главе «Клеточная инженерия»	241
7.1 Ключи к тестовым заданиям по главе «Генная инженерия»	242
7.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим задачам по главе «Генная инженерия»	242
8.1 Ключи к тестовым заданиям по главе: «Клеточная селекция и изменчивость клеток, культивируемых <i>in vitro</i> »	244
8.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим заданиям по главе «Клеточная селекция и изменчивость клеток, культивируемых <i>in vitro</i> »	244
9.1 Ключи к тестовым заданиям по главе «Сохранение <i>in vitro</i> генофонда. Криоконсервация»	247
9.2 Алгоритм решения и правильные ответы к практическим заданиям по главе «Сохранение <i>in vitro</i> генофонда. Криоконсервация»	247
Глоссарий	249
Приложение	252
Литература	254

Учебное издание

Турашева Светлана Казбековна
Оразова Салтанат Болатовна
Валиханова Гульжаннет Жансултановна

**Учебно-методическое пособие
для самостоятельной работы студентов
по дисциплине
«ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ:
БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ»**

Редактор *А. Маукеева*
Компьютерная верстка *А. Калиева*
Дизайнер обложки *Р. Шангараев*

ИБ № 7489

Подписано в печать 14.08.2014. Формат 60x84 1/16. Бумага офсетная.

Печать цифровая. Объем 16,12. Тираж 100 экз. Заказ №1638.

Издательский дом «Казак университети» Казахского национального
университета им. аль-Фараби. 050040, г. Алматы, пр. аль-Фараби, 71.

Отпечатано в типографии издательского дома «Казак университети».

НОВЫЕ КНИГИ ИЗДАТЕЛЬСКОГО ДОМА «ҚАЗАҚ УНИВЕРСИТЕТІ»

Базарбаева Ж.М. и др. Биология индивидуального развития: сборник тестов: учебное пособие. – 2014. – 134 с.

ISBN 978-601-04-0649-0

Сборник тестов по курсу «Биология индивидуального развития» предназначен для студентов биологических факультетов и охватывает все основные разделы учебной программы. Данные тесты могут быть использованы для текущего, рубежного и итогового контроля знаний студентов.

Nesterova S.G. et al. Laboratory course on "Biodiversity of plants": educational textbook. – 2014. – 142 pages.

ISBN 978-601-04-0227-0

In the educational textbook outlines the practical material, methodic recommendations and assignment for performing laboratory works on biodiversity of plants, questions for selfcontrol.

This edition contains the bibliography, glossary and a sufficient number of pictures.

Laboratory workshop is designed for students of the speciality biotechnology, ecology, biology of faculty of natural Sciences of the universities and other institutions of higher education.

Microbiology And Virology: educational manual. – 2014. 158 с.

ISB N 978-601-04-0322-21

Methodological handbook was worked out in accordance with standard study program on «Microbiology and virology» on specialty «5B070100 – Biotechnology».

Methodological handbook «Microbiology and virology. Lectures and Labs» was written in English and is to be used not only by university students, master degree students, teachers and science staff, who study and conduct the course «Microbiology and virology» in English language, but by everybody interested in the problems of biology and virology.

Торманов Н., Атанбаева Г.Қ. Адам және жануарлар физиологиясы: оқу-әдістемелік кешен. – 2014. – 159 б.

ISBN 978-601-04-0564-6

Оқу-әдістемелік кешенде пәннің оқу бағдарламасы, силлабус, тиісті әдебиеттер мен оқу-әдістемелік құралдары, ағымдағы білімін, аралық білімін, қорытынды білімін тексеруге арналған сұрақтар мен тестік тапсырмалар, студенттердің өзіндік жұмыстары және зертханалық жұмыстың әдістемелік нұсқаулықтары қарастырылған, сонымен қатар дәрістер берілген. Сондай-ақ мұғалімнің басқаруымен өткізілетін студенттердің өзіндік жұмысының

Абдиева Г.Ж. және т.б. Тағамдық өнімдерді санитарлы-микробиологиялық бақылау: оқу-әдістемелік құрал. Г.Ж. Абдиева, А.С. Кистаубаева, И.С. Савицкая. – Алматы, 2014. – 114 б.

ISBN 978-601-04-0323-9

Бұл еңбекте биотехнологияның негізгі аумағына, биотехнологиялық өндіріске қажет шикізаттарға сипаттама берілген. Микробиологиялық синтездеумен дайын өнімді бөліп алу әдістері, негізгі үрдістер мен биотехнологиялық өндіріс салалары қарастырылған.

Оқу-әдістемелік құралы жоғарғы оқу орындарының студенттері мен биотехнолог мамандарына арналған.

По вопросам приобретения обращаться в отдел продаж и маркетинга издательского дома «Қазак университеті». Контактные тел.: 8(727) 377-34-11. E-mail: baspa@kaznu.kz, сайт: www.read.kz, www.magkaznu.com

