

Занятие семинарского типа № 9

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Культивирование растительных клеток и тканей

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

Растения издавна являются поставщиками ценных соединений для различных отраслей народного хозяйства, получать которые путем химического синтеза очень дорого и сложно, а подчас просто не представляется возможным, вследствие сложности их строения. В этой связи ученые, воодушевленные последними успехами в области клеточной биотехнологии, вновь и вновь обращаются к царству растений. Они не только пытаются найти пути к совершенствованию способов получения известных продуктов, но и к разработке новых принципов биотрансформации и получения, таким путем, новых продуктов.

Важнейшей целью в ближайшие годы является необходимость заставить гены растений «работать» в бактериальных клетках. Сложность данного направления исследований состоит в том, что нам пока еще мало известно, даже о том как они «работают» в собственных клетках. Кроме того, вторичные метаболиты образуются в результате сложных многоступенчатых биохимических процессов, о механизмах, регуляции которых почти ничего не известно.

Таким образом, в результате использования культур растительных клеток и тканей возможна разработка принципиально новых подходов к получению ценных продуктов, в том числе и лекарственных веществ, а также по улучшению и выведению новых сортов растений.

1. Понятие о культуре растительных клеток и тканей

Под культурой клеток и тканей растения принято понимать способность растительных клеток размножаться на искусственных средах в условиях *in vitro*. Такие культуры получают путем выращивания в длительной пересадочной культуре клеток и тканей растения в виде недифференцированной каллусной массы в асептических условиях.

В настоящее время термин «культура клеток растений» превратился в широкое удобное понятие, охватывающее все виды работы в условиях *in vitro* с культурами изолированных клеток, протопластов, тканей, органов, зародышей и целых растений-регенератов. Термин «*in vitro*» (от лат. – «на живом») применяют при выращивании живого материала «в стекле», на искусственных питательных средах, в стерильных условиях. Термин «растение-регенерат» означает асептически полученное растение с развитыми корнями и побегами, сформировавшееся в культуре, т.е. в условиях *in vitro*.

В природе каллусообразование в основном встречается как ответная реакция на повреждение растения, когда на месте «раны» образуется нарост, тогда как в культуре ткани все нормальные клетки превращаются в каллусные. Каллусы растений легко образуются на эксплантах, полученных из разных органов растения: отрезках стебля, корня, проростках семян, фрагментах паренхимы ткани клубня, органах цветка, плодов, зародышей и т.п. При помещении эксплантов на питательную среду паренхимальные клетки дедифференцируются, переходят к делению, образуя однородную недифференцированную биомассу, получившую название каллус. В асептических условиях каллус отделяют и помещают на поверхность агаризованной питательной среды для дальнейшего роста, и в результате получают культуру каллусной ткани, которую можно поддерживать в течение длительного времени, периодически ее разделяя на трансплантаты и пересаживая их на свежую среду.

Одной из важнейших особенностей культуры тканей растения является сохранение способности к синтезу вторичных метаболитов, свойственных данному виду – алкалоидов, гликозидов, эфирных масел, стероидов и т.п. Данная особенность определяет практическую ценность культуры тканей растений в области выращивания биомассы клеток как принципиально нового вида лекарственного сырья.

Таким образом, в настоящее время технологии, основанные на культивировании тканей высших растений для получения редких и дорогостоящих биологически активных веществ (БАВ), включены в биотехнологические программы, разрабатываемые в России и во многих странах мира. Однако, применение таких технологий экономически выгодно только для продуктов, рыночная стоимость которых высока на международном рынке.

В настоящее время культуры тканей растений в основном выращивают двумя способами: на твердых агаризованных питательных средах или различных гелеобразующих подложках, а также в жидких питательных средах. В жидкой среде каллус легко распадается на отдельные агрегаты клеток, давая, тем самым, начало суспензионной культуре.

Культура тканей растения является источником значительной генетической изменчивости, называемой соматоклональной. Благодаря этой особенности культуру ткани стали интенсивно использовать в генетико-селекционных исследованиях для улучшения свойств растений. Соматоклональная изменчивость составляет основу для получения клеточных линий и штаммов с высокой биосинтетической способностью. Для увеличения спектра изменчивости используют мутагенез и селекцию на клеточном уровне наиболее продуктивных клеточных линий.

Культуры растительных тканей могут быть получены из любого вида растений, в результате применения разнообразных питательных сред. Изучение особенностей физиологии и биохимии данных культур тканей позволяют значительно повысить их урожайность и выход биомассы.

Перспективы развития клеточной биотехнологии представляются весьма многообещающими. Предполагается наладить производство новых лекарственных средств, подсластителей, средств защиты растений, веществ для косметической и парфюмерной промышленности и т.п.

2. Понятие о клеточной биотехнологии

Благодаря новейшим открытиям в области молекулярной биологии и генетики, а также достижениям в области генетической инженерии, растения все больше стали вовлекать в сферу биотехнологии. Этому способствует ряд особенностей их жизнедеятельности и размножения – способность к неограниченному вегетативному размножению, т.е. к регенерации полноценного растения из черенка, а в условиях биотехнологических систем – из небольшой группы клеток и даже из одной клетки. При культивировании в питательных средах растительные клетки способны в одних условиях неограниченно размножаться, быстро наращивая биомассу, а в других – дифференцироваться, образовывать корешки, стебельки, листочки (формируя в пробирке миниатюрное растение), а затем переходить к цветению и плодоношению, т.е. весь свой биологический цикл растения могут осуществлять в неполовых контролируемых условиях биотехнологических систем. Оказывая на развивающиеся в таких условиях растения физические, химические и другие воздействия, можно целенаправленно улучшать культивируемые сорта, повышать их продуктивность, использовать растительные клетки в качестве продуцентов БАВ.

Таким образом, клеточная биотехнология базируется на способности клеток к существованию и размножению в условиях *in vitro*, их тотипотентностью и способностью к регенерации. Метод культивирования изолированных тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) используют в биотехнологии для

сохранения и размножения ценных генотипов, эмбриогенезе, оздоровлении посадочного материала и т.п.

2.1. Исторические этапы становления и развития клеточной биотехнологии

Метод культуры растительных клеток и тканей возник как экспериментальная биологическая модель, позволяющая изучать физиологические, биохимические и другие процессы на уровне автономных клеток, освобожденных от регулирующего влияния целого растительного организма. Попытки культивировать изолированные от растений ткани делались давно, поэтому в истории развития этого метода можно выделить несколько ключевых этапов.

I этап (1892–1902 гг.) связан с именами таких немецких исследователей, как Г. Хаберландт, Фёхтинг, Рехингер, пытавшихся культивировать в растворе сахарозы различные растительные ткани. Для сегментов стеблей одуванчика и тополя был получен первый каллус и определен минимальный размер сегмента, способного к каллусогенезу. Не достигнув положительных результатов, эти исследователи высказали ряд идей и гипотез, подтвердившихся значительно позже. Так, Г. Хаберландт выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой растительной клетки, т.е. способности клеток реализовывать свой потенциал развития и давать начало образованию целевого растения при определенных условиях культивирования.

II этап (1902–1922 гг.) ознаменовался созданием первых питательных сред для культивирования тканей животных. Эти среды были природного происхождения и содержали, как правило, плазму крови и зародышевую жидкость. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах, содержащих растительные экстракты, оказывались неудачными, т.к. в экспериментах использовались малоподходящие для проявления ростовой активности клетки и ткани высших растений.

III этап (1922–1932 гг.): в этот период независимо друг от друга американский ученый В. Робинс и немецкий ученый Котте показали возможность культивирования на твердых питательных средах меристемы кончиков корня томатов и кукурузы. Однако через определенное время растительные ткани бурели и погибали. Подлинное развитие метода культуры тканей растений началось с 1932 г.

IV этап (1932–1940 гг.) связан с именем французского ученого Р. Готре, который показал возможность длительного культивирования растительных тканей в условиях *in vitro* за счет их периодического пересаживания на свежую питательную среду. Это открытие дало новый толчок в работе по культуре тканей, который ознаменовался нарастающим числом новых объектов, успешно введенных в культуру.

V этап (1940–1960 гг.): с открытием в 1955 г. нового класса фитогормонов – цитокининов, и в частности кинетина, была получена возможность стимулировать деление клеток кусочка ткани сердцевинной паренхимы табака, лишенной проводящих пучков и камбия. В зависимости от концентрации и соотношения роста можно было усиливать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез. В этот период было оценено положительное действие натуральных экстрактов типа эндосперма кокосового ореха, каштана, кукурузы и др. для поддержания неорганизованного клеточного роста и стимуляции процессов морфогенеза в культуре каллусных тканей и клеточных суспензий.

VI этап (1960 – 1975 гг.): наиболее важным событием данного периода стала разработка профессором Ноттингемского университета Э.К. Коккингем метода получения ферментативным путем изолированных протопластов из корней и плодов томата и их культивирования в контролируемых условиях. Позже в 1970 г. в той же лаборатории Пауэром с сотр. было осуществлено искусственное слияние протопластов, что открыло новый путь к созданию соматических гибридов. Еще один метод, разработанный в этот период, – микроразмножение растений в условиях *in vitro* с использованием меристемной

культуры. Первоначально этот метод был разработан ученым Ж. Морелем для получения оздоровленного посадочного материала орхидей.

VII этап (1975 г. – по настоящее время): продолжается быстрое развитие техники *in vitro*, изучение биологии культивируемых объектов, разрабатываются методы электрослияния изолированных протопластов, методы мутагенеза и клеточной селекции, методы получения гаплоидных растений, совершенствуется метод глубинного культивирования клеток с использованием изолированных протопластов и векторов, созданных на основе Ti- и Ri-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* и *Agrobacterium rhizogenes*. С помощью методов генной инженерии разработан эффективный метод переноса генов для двудольных растений.

Таким образом, за последние десятилетия был сделан большой шаг вперед в развитии технических приемов работы с изолированными тканями и клетками растений.

2.2. Значение клеточной инженерии

Благодаря развитию биотехнологии традиционные методы гибридизации растений, приведшие к зеленой революции (кардинальному повышению урожайности), расширились и стали реализовываться на клеточном уровне.

С помощью новых методов научились соединять (сливать) друг с другом клетки разных растений и получать на их основе новые гибридные растения. Новые методы значительно расширили границы спектра скрещиваемых растений, в которые вошли и виды, нескрещивающиеся в природных условиях. Однако техническая возможность соединения клеток очень отдаленных видов растений не всегда означает преодоление их биологической несовместимости, поэтому не все гибриды могут сохраняться.

Таким образом, клеточная биотехнология базируется на использовании культур клеток, тканей и протопластов.

Для того чтобы манипулировать клетками, необходимо выделить их из растения и создать такие условия, при которых они могли бы жить и размножаться вне растительного организма. Метод культивирования изолированных клеток и тканей на искусственных питательных средах в стерильных условиях (*in vitro*) получил название культуры изолированных тканей и приобрел особое значение в связи с возможностью его использования в биотехнологии.

Культивирование растительных клеток и тканей на искусственных средах в биореакторах помимо решения ряда экономических, экологических и технологических задач позволяет преодолеть ряд проблем:

- ✓ свести к минимуму влияние климатических, сезонных и географических условий;
- ✓ сократить посевные площади в хозяйственном обороте страны;
- ✓ получать уже известные, присущие интактному растению БАВ (никотин, кодеин, хинин, диосгенин и др.), и синтезировать новые БАВ;
- ✓ использовать культуры растительных клеток для биотрансформации конечных продуктов.

Использование новых технологий получения биомассы лекарственных растений в виде каллусных и суспензионных культур характеризуется рядом преимуществ:

- ✓ стандартность накапливаемого сырья;
- ✓ высокий выход активного начала (пример культивирования женьшеня: рентабельность производства стала возрастать при внедрении технологии получения «бородатых корней», где по условиям роста и скопления клеток возникают субпопуляции с повышенной дифференцировкой – самые продуктивные клетки по БАВ);
- ✓ сокращение сроков культивирования для накопления растительной биомассы;
- ✓ возможность промышленного производства биомассы экзотических растений, малодоступных для нашей страны (раувольфия, унгерея и др.);
- ✓ использование разных технологических режимов;

✓ использование методов иммобилизации и биотрансформации для повышения выхода продуктов вторичного метаболизма применительно к растительным клеткам.

Однако растительные клетки и ткани имеют особенности, затрудняющие работу с их культурами (по сравнению с клетками микроорганизмов):

✓ размеры клеток растений (15–1000 мкм) в 50–100 раз больше, чем клеток бактерий;

✓ в результате роста клеток растений у них появляется большая вакуоль, при этом все физические и химические константы клеток изменяются;

✓ суспензионные культуры состоят из клеток-агрегатов разного размера;

✓ культуры клеток растений имеют целлюлозную стенку, затрудняющую работу биотехнолога с такими культурами.

Промышленный способ выращивания изолированных культур позволяет за сравнительно короткий срок (30–45 сут.) получить значительный объем ценного лекарственного сырья, используя каллусные и суспензионные культуры.

2.3. Основные направления развития клеточной инженерии

Роль культуры изолированных клеток и тканей в биотехнологии следует рассматривать в трех направлениях.

Первое направление связано со способностью изолированных растительных клеток, продуцировать ценные для медицины, парфюмерии, косметологии и др. вторичные метаболиты (алкалоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др.). Такие соединения получают из каллусной ткани, выращенной на твердой (агаризованной) или жидкой (суспензионная культура) питательной среде. С применением клеточных технологий получают такие лекарственные вещества, как диосгенин из клеток диоскореи, аймолин из клеток раувольфии змеиной, тонизирующие вещества из клеток женьшеня, используемые в медицине и парфюмерии. Продуктивность культивируемых клеток в результате клеточной селекции может значительно превышать продуктивность целых растений. Преимуществом данного способа получения вторичных метаболитов является возможность использовать для этой цели растения, не произрастающие в наших природных условиях, и получать продукцию круглый год.

Второе направление связано с использованием культуры изолированных тканей для размножения и оздоровления посадочного материала от вирусов и других патогенов. Этот метод называется клональным микроразмножением растений и позволяет получать от одной меристемы сотни тысяч растений в год. Клональное микроразмножение – принципиально новый метод вегетативного размножения, основанный на получении в условиях *in vitro* неполным путем растений, генетически идентичных исходному экземпляру. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей тотипотентность, т.е. под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному организму. Этот метод имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

✓ получение генетически однородного посадочного материала;

✓ освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;

✓ высокий коэффициент размножения (10^5 – 10^6 – для травянистых, цветочных растений, 10^4 – 10^5 – для кустарниковых древесных, 10^4 – для хвойных);

✓ сокращение продолжительности селекционного процесса;

✓ ускорение перехода растений от ювенильной (период заложения, роста и развития вегетативных органов от прорастания семени или вегетативной почки до появления способности к образованию репродуктивных органов) к репродуктивной фазе развития;

✓ размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;

- ✓ возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- ✓ возможность автоматизации процесса выращивания.

Третье направление связано с использованием изолированных клеток в селекции растений. Развитие данного направления позволяет получать быстрорастущие растения, устойчивые к разным неблагоприятным факторам окружающей среды (засухе, засолению, низким и высоким температурам, фитопатогенам, тяжелым металлам и др.). Кроме того, это направление предусматривает создание новых растений путем слияния изолированных протопластов и получения неполовых (соматических) гибридов. Перенос в изолированные протопласты чужеродных генов с помощью методов генной инженерии позволяет получать в дальнейшем растения с новыми наследуемыми свойствами. Так, культивирование изолированных пыльников и семян на искусственных питательных средах позволяет получать гаплоиды, а культивирование зародышей – прием, позволяющий получать растения из невсхожих гибридных семян, оплодотворение в пробирке позволяет преодолеть нескрещиваемость некоторых растений.

Успех в применении культуры клеток и тканей, в первую очередь, зависит от оптимизации физиологических процессов, обеспечивающих нормальное деление клеток, их дифференцировку и регенерацию из них взрослых растений. Наиболее сложной является регенерация растений из отдельных клеток. В первую очередь, это касается злаковых растений, поэтому важнейшее значение имеет выяснение механизма морфогенеза *in vitro*, регенерации и процессов, лежащих в их основе.

2.4. Понятие о тотипотентности растительных клеток

Многие изолированные клетки, если их культивировать в соответствующих условиях, могут регенерировать целое растение. Клетка, обладающая такой способностью к росту и формированию ткани, из которой затем развивается полноценное растение, называется тотипотентной.

Таким образом, тотипотентность (от лат. *totus* – весь и *potentia* – сила) – свойство клеток в полной мере реализовать присущую им генетическую информацию, обеспечивающую их дифференцировку и дальнейшее развитие до целого организма.

Теоретически любая живая растительная клетка потенциально способна развиваться в организм, из которого она была изолирована, при ее культивировании в соответствующих оптимальных условиях.

Обычно универсальной тотипотентностью обладают оплодотворенные яйцеклетки растений и животных, а в случае соматических клеток, тотипотентностью обладают только клетки растений, и то преимущественно в условиях *in vitro*, тогда как культивируемые клетки животных лишены данного свойства.

На основе тотипотентных клеток легко получить протопласты, культивирование которых позволяет получить каллусную ткань, а на ее основе небольшие растеньица, размножаемые обычным путем.

3. Культура каллусных тканей

3.1. Понятие о каллусной культуре

Культура изолированных тканей обычно бывает представлена каллусными и реже – опухолевыми тканями.

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

Оторванная от коллектива себе подобных клетка в пробирке сохраняет «память», т.е. генетическую информацию, заложенную родителями. Однако специализацию она утрачивает и образует при делении нечто аморфное, напоминающее по форме морскую губку (каллус). Кроме утраты узкой специализации клетка порой начинает вести себя, словно «пациент сумасшедшего дома». Так, активные гены вдруг «застопориваются», а «спавшие», ни с того ни с сего, начинают интенсивно «работать». Клетка в пробирке может резко изменить соотношение ферментных и структурных белков. В ней увеличивается число молекул РНК, синтезирующих в обилии белки, производство которых ранее было очень ограниченным. При создании определенных условий клетка вновь приобретает специализацию, причем не обязательно «старую».

Регенерации полноценных растений из каллуса добиваются, как правило, двумя путями: дифференциацией побегов и корней путем изменения соотношения фитогормонов или образованием эмбриоидов. Впервые такой соматический (асексуальный) эмбриогенез был прослежен в 1959 г. у моркови. Со временем его стали применять при производстве жизнеспособных растений у разных видов.

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

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

- ✓ рыхлой, состоящей из сильно оvoidенных клеток, легко распадающейся на отдельные мелкие агрегаты;
- ✓ средней плотности с хорошо выраженными меристематическими очагами;
- ✓ плотной, в которой дифференцированы элементы камбия.

3.2. Этапы формирования каллусной ткани

Обязательным условием дедифференцировки растительной клетки и превращения ее в каллусную является присутствие двух групп фитогормонов: ауксинов, вызывающих процесс дедифференцировки клетки, подготавливающий ее к делению, и цитокининов, вызывающих пролиферацию (деление) дедифференцированных клеток. Если в питательную среду, не содержащую этих гормонов, поместить растительный эксплант, состоящий из специализированных (дифференцированных) клеток, то деления клеток не произойдет и каллусная ткань не образуется. Это связано с неспособностью дифференцированных клеток к делению.

Каждая клетка проходит 3 фазы развития: деление, растяжение и дифференцировку. Характерной особенностью заключительной фазы развития является утолщение вторичной клеточной оболочки и утрата клеткой способности к делению. Для того, чтобы дифференцированные клетки вновь обрели способность к делению, необходимо, чтобы произошла их дедифференцировка, т.е. клетки как бы возвратились в меристематическое состояние. Размножение дедифференцированных клеток приводит к анархическому (неорганизованному) росту, в результате образуется каллусная ткань.

Таким образом, превращение специализированной клетки в каллусную связано с индукцией клеточного деления, способность к которому она утратила в процессе дифференцировки.

Процесс перехода к каллусному росту начинается с остановки клеточных делений. Лаг-фаза продолжается 24–48 ч. В течение этого времени клетки увеличиваются в размерах и ткань разрыхляется. После лаг-фазы клетки начинают быстро делиться, образуя каллусную ткань. Таким образом, если дедифференцировка специализированной клетки связана с индукцией деления под влиянием фитогормонов, то дедифференцировка

делящейся меристематической клетки связана с остановкой делений, деспециализацией клетки и только после этого – с индукцией делений, приводящей к каллусообразованию.

Эффект, вызываемый действием одних и тех же фитогормонов, может быть различным в зависимости от физиологической характеристики ткани-мишени. Ее компетентность определяется степенью дифференцировки клеток.

Переход клетки *in vitro* из дифференцированного состояния к дедифференцировке и активным клеточным делениям обусловлен изменением активности генов (эпигеномной изменчивостью): активирование одних генов и репрессирование других приводит к изменению в белковом составе клеток. В каллусных клетках появляются специфические белки и одновременно исчезают или уменьшаются в количестве белки, характерные для фотосинтезирующих клеток. У двудольных растений процесс репрессии и дерепрессии генов, лежащий в основе дедифференцировки, происходит легче, чем у однодольных.

При переходе дедифференцированной клетки к неорганизованному анархическому размножению, приводящему к образованию каллусной ткани, в клетках происходят биохимические и цитологические изменения. Дедифференцировка начинается с использования запасных веществ и разрушения специализированных клеточных органелл. Через 6–12 ч после индукции дедифференцировки клеточная стенка разрыхляется и разбухает, увеличивается число свободных рибосом, число элементов аппарата Гольджи, а также размеры и число ядрышек. Все эти изменения предшествуют началу делений, которые начинаются через 48–72 ч. Необходимо учитывать, что в клетках экспланта в начале культивирования могут наблюдаться изменения в метаболизме, вызванные, как дедифференцировкой, так и травматическими синтезами. Для разделения этих процессов лучше проводить прединкубацию экспланта на безгормональной среде 3–6 суток. Каллусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки, включая деление, растяжение и дедифференцировку, после чего наступает старение и отмирание клетки. Каллусную дифференцировку можно назвать вторичной, но ее не следует путать со вторичной дифференцировкой клетки, лежащей в основе морфогенеза.

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

3.3. Характер ростовой кривой каллусной культуры

Наиболее важной характеристикой популяции является ее рост. Обычно рост популяции клеток *in vitro* оценивают по числу составляющих ее клеток или по их общей биомассе. В целом клетки *in vitro* проходят фазы ростового цикла, характерные для роста клеток высших растений *in vivo*.

Ростовой цикл или цикл выращивания – период от помещения инокулюма на свежую питательную среду до следующего субкультивирования. Несмотря на морфологическую и физиологическую гетерогенность внутри популяции рост клеточных культур описывается S-образной кривой. Различают несколько фаз ростового цикла (рис. 1).



Рис. 1. Модельная кривая ростового цикла

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

I. Латентная фаза — начальный период в ростовом цикле, в котором клетки не размножаются и не увеличиваются в размерах. Однако на протяжении этого периода в клетках происходят важные изменения, направленные на подготовку и вступление их в фазу активного деления. Увеличивается поглощение и экскреция веществ, объем цитоплазмы и число органелл; повышается содержание АТФ, ГТФ, НАДФН₂; активизируется дыхание, в том числе по пентозофосфатному пути. Полисомы свободные. Начинается синтез ДНК.

II. Логарифмическая фаза — ограниченный период в ростовом цикле, в ходе которого происходит экспоненциальное (логарифмическое) увеличение количества клеток за счет их интенсивного деления, и как следствие — увеличение сухого вещества. В течение этой фазы наблюдаются следующие цитологические и метаболические изменения: исчезает вакуоль и увеличивается объем цитоплазмы, гиалоплазма становится плотной; увеличивается число митохондрий и полирибосом; полисомы прикрепленные; наблюдается максимум синтеза РНК и белка; отмечается активное дыхание; происходит синтез индуцибельных ферментов и пластидный синтез липидов, углеводов, пуринов, терпенов. В течение поздней экспоненциальной фазы наблюдается замедление клеточного деления, а увеличение биомассы происходит за счет растяжения клеток.

III. Линейная фаза очень короткая. Удельная скорость роста культуры в этой фазе практически постоянная.

IV. Наступление фазы замедления роста обусловлено истощением питательной среды (в основном источников углеводного, азотного и фосфорного питания). В течение этой фазы размер клеток еще продолжает возрастать, но количество клеток не изменяется. Отмечается увеличение морфологической гетерогенности клеток и органелл. Цитологические изменения заключаются в изменении числа органелл, а также изменении формы митохондрий и др. Могут происходить выбросы этилена. Наблюдается синтез ферментов, ключевых для вторичного метаболизма, начинается синтез белков старения.

V. Стационарная фаза — период ростового цикла, в ходе которого каллусная или суспензионная культура достигает максимума сухого веса. В культуральной среде накапливаются продукты жизнедеятельности клеток, угнетающие рост культуры. В клетках резко уменьшается объем цитоплазмы, вакуоль достигает максимальной величины; наблюдается разрушение органелл; резко снижается активность дыхания; увеличивается количество свободных серина, треонина; повышается активность оксидаз и гидролаз. Для того, чтобы не наступила гибель клеток, необходима пересадка культуры на свежую питательную среду. Рост можно регулировать разными факторами и оценивать по таким показателям, как размер, объем, масса, число клеток, количество белка и ДНК. Тот или иной показатель используется в зависимости от целей эксперимента. Переход клеток из одной фазы в другую контролируется, как внутренними, так и внешними факторами. К

внутренним факторам относится пролиферативный пул, продолжительность растяжения и состояние клетки; к внешним – состав питательной среды, pH среды, содержание кислорода, температура, плотность посева и т.д.

3.4. Отличительные особенности каллусных клеток

Культивируемые каллусные клетки и ткани *in vitro* сохраняют многие физиолого-биохимические особенности, свойственные клеткам растений, из которого они были получены. Так, каллусные клетки сохраняют морозостойкость и способность к закаливанию, устойчивость к абиотическим факторам (температура, засоление, фотопериодическая реакция), и главное, хотя и в разной степени, способность к синтезу вторичных метаболитов (гормоны, алкалоиды, стероиды, кумарины и т.п.).

Вместе с тем, у каллусных клеток появляются свои, характерные только для них особенности. В них появляются специфические белки, уменьшается количество белков, характерных для фотосинтезирующих клеток или они совсем исчезают. Значительные отличия наблюдаются в энергетическом обмене каллусных клеток: они потребляют меньше кислорода по сравнению с нормальными клетками.

Кроме того, каллусные ткани отличаются генетической гетерогенностью и физиологической асинхронностью.

Физиологическая асинхронность – наиболее важное свойство неполовой популяции, заключающееся в том, что в каждый данный момент времени клетки находятся в разных фазах роста: одни делятся, другие растут, а третьи уже стареют. В этой связи общее физиологическое состояние такой популяции приятно оценивать по состоянию большинства клеток.

Причины физиологической асинхронности весьма разнообразны:

- ✓ особенности вида, сорта, генотипа индивидуального растения, а также особенности экспланта;
- ✓ стрессы культивирования, например, неоптимальная для данного вида клеток среда;
- ✓ изменение баланса эндогенных гормонов и концентрации в среде экзогенных гормонов в течение выращивания;
- ✓ генетическая гетерогенность клеток и клонов;
- ✓ аномалия митотического цикла клеток *in vitro*;
- ✓ физические факторы (температура, свет, аэрация).

Асинхронность – устойчивое свойство популяции каллусных клеток. Если с помощью специфических воздействий синхронизировать пролиферацию клеток популяции, то уже через 3–4 деления она вновь становится асинхронной.

Генетическая гетерогенность – свойство клеток соматической популяции (нестабильность генома и их генетическая гетерогенность). Генетически стабильными считаются только клетки меристематических тканей. В клетках остальных тканей при культивировании могут возникать полиплоидия, анеуплоидия, хромосомные aberrации, генные мутации. Однако генетическую гетерогенность нельзя рассматривать как недостаток, т.к. она является необходимым условием существования популяции клеток и служит основой для их адаптации.

К причинам появления генетической гетерогенности относятся:

- ✓ Генетическая гетерогенность исходного материала. В растениях клетки характеризуются различной ploидностью, диплоидны только активно делящиеся меристематические клетки.
- ✓ Нарушение коррелятивных связей при выделении первичного экспланта из растения.
- ✓ Действие компонентов питательной среды. Экзогенные гормоны и стимуляторы могут оказывать мутагенное действие. Ауксины, особенно 2, 4-дихлорфеноксиуксусная

кислота (2, 4-Д), входящие в состав питательных сред, – мутагены; цитокинины способствуют полиплоидизации клеток.

✓ Длительное субкультивирование, при котором накапливаются генетически измененные каллусные клетки.

После 5–6 пересадок новый кариотип клеточной популяции, как правило, стабилизируется, если условия культивирования остаются постоянными. В противном случае изменение физических или трофических факторов приведет к новым генетическим изменениям.

Генетическая нестабильность каллусных клеток имеет большое значение для селекционной работы, т.к. позволяет отбирать штаммы клеток с измененным генотипом. Эти клетки могут обладать уникальными свойствами: повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам, повышенной продуктивностью и т.д. Однако генетическая гетерогенность популяций каллусных клеток в культуре не влияет на сохранение в их геноме основных качеств вида и растения-донора.

Гормоннезависимость. Хотя фитогормоны и вызывают мутации, калусные ткани от большинства растений образуются только в присутствии в питательной среде и ауксинов и цитокининов. Исключение составляют, например, незрелые зародыши пшеницы и семядоли подсолнечника. Первые образуют каллусную ткань на питательной среде с 2, 4-Д, но без цитокининов. Вторые, напротив, – на среде, содержащей цитокинины, но без ауксинов. Вероятно, такая специфика связана с эндогенным содержанием фитогормонов и с компетентностью клеток. Однако при длительном культивировании практически у всех тканей может возникать специфическое свойство гормоннезависимости, т.е. автономности по отношению к ауксинам и цитокининам. Эти ткани могут расти на среде без гормонов, что делает их похожими на опухолевые клетки и резко отличает от нормальных каллусных тканей. Внешне такие гормоннезависимые ткани ничем не отличаются от каллусных.

Клетки, которые в процессе культивирования приобрели свойство автономности от присутствия в среде гормонов, называются «привыкшими». Ткани, образованные такими «привыкшими» клетками, называют «химическими опухолями» в отличие от растительных или генетических опухолей. Генетические опухоли возникают на межвидовых гибридах растений. Растительные опухоли имеют бактериальное или вирусное происхождение. Чаще всего растительные опухоли возникают при попадании в растения агробактерий. Так, *Agrobacterium tumefaciens* вызывает образование корончатых галлов, *A. rhizodenes* – бородатого корня, *A. rubi* – стеблевого галла. Превращение растительных клеток в опухолевые связано с проникновением в них ДНК бактериальной клетки, так называемой Ti-плазмиды, которая значительно изменяет свойства клетки, в том числе экспрессирует контролирующие синтез ауксинов и цитокининов. Гормоннезависимость «привыкших» клеток связана с изменением активности собственных генов, ответственных за синтез белков-ферментов, участвующих в синтезе гормонов. Таким образом, «привыкшим» тканям и растительным опухолям в равной степени свойственна гормоннезависимость, но у растительных опухолей она носит генетический характер. У «привыкших» клеток это свойство достигается главным образом за счет эпигеномных изменений. Существует еще одна особенность, позволяющая отличить «привыкшие» и опухолевые клетки от обычных каллусных. Обычно ни опухолевые, ни «привыкшие» ткани не способны к нормальной регенерации. Они могут образовывать уродливые органоподобные структуры, так называемые тератомы. В отдельных случаях у длительно культивируемых тканей удается отодвинуть порог «привыкания» благодаря изменению состава питательных сред и добиться регенерации нормального растения.

4. Культура клеточных суспензий

Под суспензионными культурами понимают культуры, выращиваемые в жидкой питательной среде во взвешенном состоянии и состоящие из отдельных клеток и их агрегатов. Для поддержания клеток во взвешенном состоянии при глубинном культивировании их перемешивают с помощью разных мешалок. Аэрация обеспечивается путем непрерывного вращения или качания среды, или путем ее продувания стерильным воздухом.

Суспензионные культуры обладают рядом преимуществ по сравнению с каллусными, выращиваемыми на агаризованной поверхности:

- ✓ более широкие возможности для изучения влияния экзогенных факторов на метаболизм и рост клеточных популяций, поскольку клетки в одинаковой степени становятся доступными для внешнего воздействия;
- ✓ надежное длительное поддержание линии вследствие простоты процессов субкультивирования;
- ✓ □ удобство для проведения биохимических и молекулярно-биологических исследований, а также быстрой регенерации растений;
- ✓ возможность неограниченного набора биомассы для получения БАВ.

Для получения суспензионных культур чаще всего используют каллусную ткань рыхлого типа, которая легко фрагментируется на отдельные клетки и небольшие агрегаты при помещении ее в перемешиваемую жидкую среду. С этой целью при культивировании каллуса из среды исключают цитокинины или снижают их концентрацию, а концентрацию ауксинов увеличивают. Первичный каллус использовать нежелательно, т.к. он содержит обычно более плотные агрегаты клеток. Возможно, получение суспензионной культуры и непосредственно из эксплантов, помещенных в жидкую среду. Возникающие на поверхности экспланта каллусные клетки могут отрываться и переходить в среду, давая начало суспензии. Однако, это длительный и малоэффективный процесс. Для некоторых исследований суспензионную культуру клеток получают путем ферментативной мацерации растительных тканей, например, из мезофилла листа, но такую суспензию невозможно поддерживать в течение длительного времени.

Для получения первичной суспензии, как правило, используют 2–3 г свежей массы каллусной ткани на 60–100 мл жидкой питательной среды. С целью избавления от крупных плотных остатков каллуса, больших клеточных агрегатов ее фильтруют через 1–2 слоя марли, нейлон или отбирают одиночные клетки и мелкие агрегаты путем осаждения крупных агрегатов при отстаивании суспензии в течение нескольких минут. Колбы помещают на качалку, скорость вращения которой обычно составляет 110–120 об/мин.

Клеточные суспензии обычно требуют регулярного и более частого субкультивирования, чем каллусные культуры. Часть суспензионной культуры, используемая для пересадки на свежую среду, называется инокулюм. Для каждой линии культуры клеток существует минимальный размер инокулюма, при уменьшении объема которого культура не растет.

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. В зависимости от степени агрегированности выделяют: слабоагрегированные (до 5–10 клеток), среднеагрегированные (более 10 клеток) и высокоагрегированные (более 50 клеток в агрегате) суспензии. В попытке получить суспензионные культуры, проявляющие высокий уровень клеточной диссоциации, чаще всего прибегают к контролю состава питательной среды. Ауксины, как правило, оказывают положительное влияние на процессы диссоциации клеток, а цитокинины, напротив, тормозят их. Следовательно, условия, благоприятствующие растяжению клеток и тормозящие их деление, способствуют

максимальной диссоциации клеток в суспензии. Природа углеводов в питательной среде, оказывая влияние на межклеточные контакты через изменение поверхностных полисахаридов, также может играть определенную роль. Так, введение в питательную среду сахарозы, галактозы и раффинозы способствовало формированию клеточных агрегатов. Выращивание клеток с добавлением целлюлолитических ферментов (мацерозим, пектиназа, целлюлаза) в сочетании с осмотиком увеличивало дисперсность суспензии. Хорошей считается суспензия, состоящая из морфологически выравненных клеток, имеющих небольшие размеры и агрегированных в мелкие группы, включающие не более 10 клеток. Оптимальная плотность клеток в суспензии, обеспечивающая хороший рост, составляет 105–106 в 1 мл среды.

Таким образом, к основным характеристика клеточных суспензий относятся:

✓ жизнеспособность клеток определяют по их окрашиванию красителями (метиленовой синью или синью Эванса): живые клетки не окрашиваются вследствие непроницаемости для красителя клеточных мембран, а в мертвые клетки краситель легко проникает, следовательно, они окрашиваются в синий цвет;

✓ плотность клеточных суспензий: число клеток суспензии определяется микроскопически с помощью счетной камеры Фукса-Розенталя после предварительной мацерации клеток, используя в качестве мацерирующего вещества хромовую кислоту (10–20 %), гидролизующую средние пластинки, соединяющие клетки;

✓ ростовая кривая: хорошо растущая суспензия имеет s-образный характер ростовой кривой. Длительность каждого пассажа составляет 14–16 дней. Основными критериями роста суспензионной культуры является: увеличение числа клеток, а также их сухой и сырой массы;

✓ степень агрегативности клеток: агрегаты должны содержать не более 10–12 клеток, а для того чтобы избавиться от крупных агрегатов, суспензии фильтруют через марлевые, нейлоновые или металлические фильтры, что позволяет, кроме того, освободиться от остатков экспланта или плотных кусков каллусной ткани.

Для выращивания клеточных суспензий используют в основном те же питательные среды, что и для каллусных культур. Однако в настоящее время разработан ряд сред, предназначенных непосредственно для выращивания суспензионных культур. При этом наблюдается тенденция к упрощению их состава и использованию простых минерально-сахарозных сред без комплексных добавок.

Культивирование клеток в жидкой среде осуществляется несколькими способами (рис. 2). Наиболее простым и распространенным является накопительное или периодическое культивирование. В этом случае размножение популяции клеток осуществляется в закрытой системе в постоянном объеме питательной среды. Создание достаточной аэрации является условием хорошего размножения клеток и их активной деятельности. В лабораторных условиях обычно используют сосуды объемом 100–250 мл, с небольшим объемом питательной среды – 20–70 мл.



Рис. 2. Способы культивирования клеточных суспензий

Крупномасштабное культивирование осуществляется в сосудах объемом до нескольких десятков литров – ферментерах. По сравнению с глубинным выращиванием в колбах на качалке при культивировании клеток в ферментерах появляются принципиально новые возможности, связанные с их конструкцией. Для культуры клеток в ферментерах можно в любой момент изменять разные факторы (температуру, свет, газовый режим, физиологически активные вещества, рН и др.) и отбирать пробы клеток для определения динамики роста и метаболизма популяции в цикле выращивания, т. е. не нарушая режима асептики, можно контролировать рост и продуктивность биомассы, изучать влияние на эти процессы разных воздействий.

Способ, при котором клетки выращиваются в проточном режиме, называется непрерывным культивированием. Непрерывное культивирование осуществляется в открытых системах, в которых происходит, с одной стороны, приток питательной среды, а с другой – отток среды или биомассы. Непрерывные культуральные системы подразделяют на полупроточные и проточные. Проточные, в свою очередь, могут быть открытыми и закрытыми.

Полупроточный режим выращивания основан на принципе отбора определенной части клеточной суспензии через определенные интервалы времени и разбавления оставшейся части свежей средой. Оно применяется для получения больших масс суспензии с целью ее дальнейшего биохимического исследования.

В закрытой проточной культуре в систему постоянно подается свежая питательная среда, а старая удаляется в том же объеме. При этом клетки остаются в системе в течение всего цикла выращивания. Такие системы могут быть применимы для оптимизации образования метаболитов, а также для изучения цитодифференцировки, поскольку в данном случае клетки будут длительный период поддерживаться в неделящемся состоянии.

Открытые проточные системы функционируют на принципе баланса между притоком свежей питательной среды и удалением равного объема клеточной суспензии. Скорость удаления части клеток из системы должна соответствовать скорости образования новых клеток, что создает равновесное состояние между ростом клеток (постоянство скорости клеточного деления) и биосинтезом (постоянство метаболической активности). Такие системы представляют большой интерес, т.к. позволяют исследовать изменения при переходе от одного равновесного состояния к другому, сравнивать биосинтетический потенциал клеток различных клонов в условиях, способствующих одинаковой скорости роста, а также выбрать оптимальный режим для получения максимального количества вторичных метаболитов.

Регуляция равновесного состояния может осуществляться по принципу турбидостата или хемостата, разработанных при культивировании микроорганизмов (рис. 3). В хемостатном режиме непрерывное культивирование зависит от лимитирующего фактора, роль которого выполняет один из компонентов питательной среды. Скорость роста и плотность клеточной популяции определяются скоростью поступления среды (скоростью разбавления), т.е. подачей лимитирующего фактора и других компонентов среды.

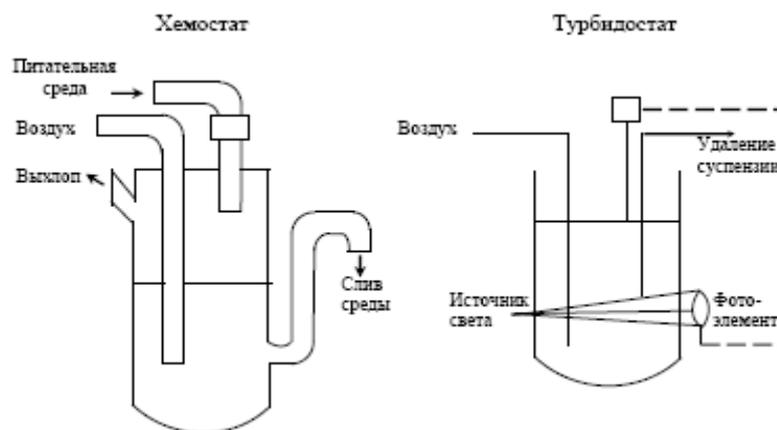


Рис. 3. Хемостатный и турбидостатный режимы культивирования клеточных суспензий

В турбидостате рост клеток популяции поддерживается на определенном уровне, благодаря регулированию оптической плотности культуры. Для этого подходят суспензии с низкой плотностью клеток и высокой удельной скоростью роста. Турбидостат снабжен фотоэлектрическим элементом, чувствительным к мутности культуры. Оптическая система, определяющая плотность клеток, связана с реле, через которое в случае увеличения плотности клеток поступает сигнал на включение протока. Таким образом, рост клеточной популяции поддерживается на определенном запрограммированном уровне автоматически. Хемостатный и турбидостатный режимы применяют с целью стабилизации суспензионной культуры в определенном состоянии роста и поддержания его неограниченное время. Препятствиями к культивированию клеток высших растений в проточном режиме являются их высокая чувствительность к повреждениям, агрегированность, длительное время генерации.

5. Культура одиночных клеток

Для генетических и физиологических исследований, а также для практического использования в клеточной селекции ценным является культивирование отдельных клеток. Получение клона-потомства одиночной клетки помогает разобраться в причинах генетической неоднородности каллусных клеток, т.к. наблюдения в данном случае проводятся на ткани, полученной не из гетерогенного экспланта, а из одной клетки.

Одиночная гибридная клетка, выделенная из культуры изолированных протопластов, при дальнейшем ее делении позволяет получить клон, состоящий из гибридных клеток. Это позволяет намного облегчить работу исследователя, т.к. устраняет необходимость отбора потомства в культуре изолированных протопластов от негибридных форм, что связано со значительными трудностями. Кроме того, сам процесс соматической гибридизации лучше наблюдать, если работа ведется с одиночными протопластами.

Одиночные клетки выделяют из клеточных суспензий, из тканей растений, из культуры изолированных протопластов после восстановления клеточной стенки.

Для получения одноклеточной фракции суспензионной культуры иногда достаточно простого отстаивания в колбе в течение 15–30 мин. При этом крупные агрегаты оседают на дно колбы, а надосадочная фракция содержит только одиночные клетки или мелкие агрегаты. Если при отстаивании не удастся получить одноклеточную фракцию, применяют мацерирующие ферменты, центрифугирование в градиенте сахарозы или фильтрования через сита (нейлоновые или металлические).

Трудности культивирования одиночных клеток связаны с тем, что отдельная клетка не делится в тех условиях, в которых хорошо растет каллусная ткань. Для того чтобы заставить одиночные клетки делиться, разработаны специальные методы. В 1960 г

Джонсон предложил метод «няньки», при котором функцию «няньки», стимулирующей деление одиночной клетки, выполняют кусочки каллусной ткани, отделенные от нее фильтровальной бумагой. В присутствии «няньки» одиночная клетка делится и дает индивидуальную колонию клеток, т.е. клон.

Другой метод основан на использовании очень малых объемов богатой по составу питательной среды и связан с культивированием одиночных клеток в микрокапле в чашке Купрака (объемом 20 мкл). Данный метод предложен академиком Ю.Ю. Глебой. Преимущество данного метода заключается в том, что в микрокаплях удобно наблюдать за получением и делением клеток при соматической гибридизации.

Для индукции клеточных делений у одиночной клетки можно использовать также «кормящий слой» (активно делящиеся клетки суспензионной культуры того же вида растения, что и одиночная клетка) (рис. 4).

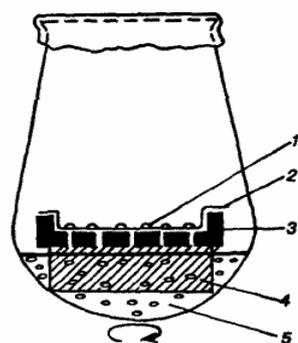


Рис. 4. Использование культуры суспензионных клеток в качестве «кормящего слоя» для выращивания одиночных клеток:

1 – колонии клеток; 2 – фильтровальная бумага; 3 – алюминиевая сетка; 4 – пенополиуретан; 5 – суспензия клеток

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

По сути, все перечисленные методы основаны на использовании выделений из делящихся клеток, т.е. кондиционирующего фактора. Химическая природа кондиционирующего фактора доказывается с помощью простого эксперимента. Если разделить одиночные клетки и ткань-«няньку» стеклянной пластиной, то деления клеток не наступает. Если вместо пластин поместить целлофан, то хоть и с задержкой начинается деление одиночных клеток.

Несмотря на многочисленные попытки определить химическую природу и раскрыть механизм действия кондиционирующего фактора на деление клеток, добиться этого пока не удалось. Однако уверенно можно сказать, что этот фактор термостабилен, водорастворим, включает низкомолекулярные вещества и не заменяется фитогормонами. Кроме того, он стабилен при pH 4–11; имеет молекулярную массу ~ 700 Д и является синергистом брассиностеороида.

Таким образом, необходимость кондиционирования среды дает основание предположить, что одиночная клетка не способна производить все необходимые метаболиты для размножения и ее развитие зависит от активности популяции окружающих клеток.

6. Культура протопластов

Протопласт – клетка, полностью лишенная клеточной стенки и имеющая только клеточную мембрану, ограничивающую цитоплазму с разными органоидами и другими включениями.

Изолированные протопласты – одни из наиболее ценных объектов в биотехнологии, несомненным преимуществом которых является удобство их использования в качестве модели для изучения транспорта различных веществ и ионов через плазмалемму, электрических свойств мембраны и воздействия на нее физических и химических факторов. В настоящее время на основе изолированных протопластов высших растений успешно развивается и используется метод пэтч-клампа, позволяющий изучать свойства одиночных ионных каналов. Однако главное их преимущество – это возможность различных генетических манипуляций, введение в них генетической информации из клеток других растений, прокариотов-симбионтов, и даже клеток животных, в том числе и млекопитающих.

Впервые протопласты растений были выделены Клернером в 1892 г. при изучении плазмолиза в клетках листа телореза во время механического повреждения ткани, поэтому метод был назван механическим. Данный метод позволяет выделить лишь небольшое количество протопластов, характеризуется низкой эффективностью и высокой трудоемкостью.

Современный ферментативный метод выделения протопластов заключается в удалении клеточной стенки с помощью ферментов, ее разрушающих (целлюлазы, гемицеллюлазы, пектиназы). Первое успешное выделение протопластов из клеток высших растений данным методом осуществлено Е. Коккином в 1960 г. По сравнению с механическим ферментативный метод имеет ряд преимуществ. Он позволяет сравнительно легко и быстро выделять большое количество протопластов, которые не испытывают сильного осмотического шока. Однако при этом плазмалемма может утрачивать ряд интактных конститутивных свойств, а также могут возникать сложности при выделении протопластов из лигнифицированных клеток.

Источниками получения протопластов служат изолированные органы растений и их части (листья, семядоли, корни, гипокотили, лепестки, пыльцевые зерна), суспензионные культуры и каллусная ткань. В клетках разных типов тканей в зависимости от функциональных особенностей, возраста, наличия вторичных утолщений соотношения разных компонентов клеточной стенки (целлюлоза, гемицеллюлоза, пектиновые вещества, белки) могут варьировать. В этой связи типы ферментных препаратов специфичны для каждого вида клеток. Наиболее адекватная составу клеточной стенки комбинация ферментов обеспечивает успех выделения протопластов.

При выделении протопластов из листьев сначала удаляют эпидермис, лист нарезают на сегменты и подвергают ферментативной обработке (рис. 5).

Важную роль при этом играет осмотический стабилизатор. 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.

Длительность инкубирования растительного материала в среде с ферментами сильно варьирует и составляет от 3–4 до 16–18 ч. После ферментативной обработки суспензия протопластов должна быть очищена от остатков неразрушенной ткани и осколков клеток, а также отмыта от ферментов. С этой целью используется техника фильтрации – центрифугирования. После удаления ферментов следует высеив протопластов на питательную среду с добавлением маннита или сорбита. Среда должна быть несколько гипертоничной, чтобы протопласты находились в слегка плазмолизированном состоянии. Наличие осмотического стабилизатора необходимо для того, чтобы предотвратить разрыв

протопластов. Кроме того, в этих условиях тормозится метаболизм и регенерация клеточной стенки.

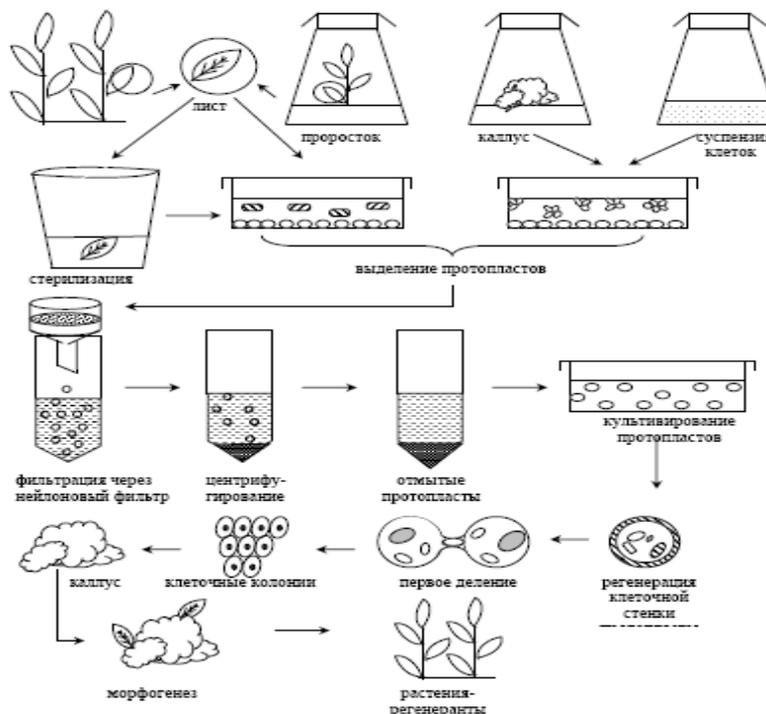


Рис. 5. Схема получения и культивирования протопластов из клеток растений

Получение протопластов из каллусных или суспензионных культур осуществляется по той же схеме. Однако в этом случае нет необходимости в стерилизации исходного материала. Хорошим выходом считается получение 10^6 жизнеспособных протопластов на 1 г свежей массы ткани растения или культивируемых клеток.

Протопласты можно культивировать разными способами. Применение того или иного метода культивирования зависит от цели эксперимента. Для успешного культивирования протопластов в жидкой среде, так же, как и изолированных клеток, требуется их высокая плотность. В большинстве случаев эта величина составляет 10^4 – 10^5 клеток/мл, а объем культуры 2,5–10 мл. Для того, чтобы обеспечить кондиционирование клеток в разбавленной культуре используют питательный (кормящий) слой или обогащенные питательные среды, или уменьшают до минимума объем культуры. Применение богатых по составу сред обеспечивает положительный эффект только для ограниченного числа видов растений. Широко используется метод культивирования протопластов в жидких каплях объемом 20–40 мкл при высокой влажности. При этом капли могут быть висячие или сидячие. С помощью автоматической пипетки протопласты распределяются по маленьким каплям на крышке или дне чашки Петри. В 1978 г. академик Ю.Ю. Глеба разработал метод культивирования единичных протопластов в микрокаплях питательной среды объемом до 1 мкл. В микрокаплях такого объема, если в них находится только одна клетка, соотношение объема клетки к объему питательной среды является таким же, как и в макрокультурах с плотностью 10^3 клеток/мл. Предварительное культивирование протопластов в течение 1–3 суток в суспензиях высокой плотности (10^4 – 10^5 клеток/мл) значительно повышает эффективность роста последующей культуры единичных протопластов.

Суспензию протопластов культивируют также в жидкой среде, наслаивая ее тонким слоем в концентрации в 2 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 °С) среды, содержащей 1,2 % агара. После застывания среды протопласты оказываются фиксированными в одном положении и физически отделены один от другого. Данный метод позволяет наблюдать за поведением каждого конкретного протопласта по мере культивирования.

Показано, что деление клеток можно стимулировать, если вместо агара в среде для платирования протопластов использовать агарозу.

По питательным потребностям изолированные протопласты сходны с целыми клетками, поэтому питательные среды, применяемые для их культивирования, подобны таковым для клеточных культур. Чаще всего используют среды Мурасиге и Скуга, Нагата и Такебе, Гамборга В5, Као и Михайлюка. Существенным их отличием является увеличение в 2–4 раза концентрации кальция и присутствие осмотиков.

Температура, при которой культивируются протопласты, варьирует в значительной степени в зависимости от специфики вида. Так, для пшеницы это 22 °С, для другого представителя злаковых – росички кроваво-красной – 30 °С. Обычно протопласты не выдерживают даже незначительного отклонения от оптимальной температуры.

Свет высокой интенсивности губительно действует на свежие выделенные протопласты. Оптимальные значения освещенности варьируют в широких пределах. Так, протопласты люцерны образуют колонии в абсолютной темноте, а протопласты немезии оптимально растут при освещенности 80 000 лк.

В процессе культивирования интактные протопласты регенерируют новую клеточную стенку и превращаются в клетки, способные делиться и давать начало каллусной ткани. Дальнейшая задача – получение из каллусной ткани растений-регенерантов. Пока не удалось получить регенеранты из протопластов многих злаковых. Однако успешно осуществляется регенерация растений из протопластов пасленовых и других культур. Так, удалось совместить протопласты и получить соматические гибриды картофеля и томата (томофель), правда с небольшим урожаем плодов и клубней. Кроме того, неожиданные результаты получены канадским исследователем К.Н. Као, которому удалось получить гетерокариотические (с совмещенными ядрами) клетки из слившихся протопластов сои и табака сизого (табачного дерева), способные к делению, а также линии клеток сои и табака с синхронным делением хромосом.

7. Меристематическая культура

Для получения меристематической культуры используют меристему – образовательную ткань растений, долго сохраняющую способность к делению и образованию новых клеток, отличающуюся высокой метаболической активностью. Для культивирования изолируют конусы нарастания побегов, корней, пазушные почки. Меристематические культуры более известны в садоводстве, т.к. позволяют получить безвирусные клоны. Из этого можно сделать вывод о том, что распределение вирусов в разных частях растения неравномерно, а меристема их вовсе лишена. Из безвирусной меристемы в большом количестве можно регенерировать генетически идентичные безвирусные растения. Этот способ применяют для выведения новых сортов картофеля, винограда, декоративных растений и др.

8. Культура гаплоидных клеток

При культивировании *in vitro* пыльников или микроспор, а также незрелых семян возможно получение гаплоидных растений. Этот уникальный феномен связан с переключением развития спорогенных клеток с обычного для них гаметофитного пути развития на принципиально иной – спорофитный путь. Интерес к данной проблеме обусловлен ее значимостью для решения задач практической генетики и селекции. Следует отметить, что у определенных видов растений, в частности, у многих злаков

микроспора представляет собой единственную легко доступную индивидуальную клетку, которая позволяет достичь ряда преимуществ при изучении деления и дифференцировки клеток. Процесс образования гаплоидного растения (спорофита) из микроспоры или клеток пыльцевого зерна получил название андрогенеза. В результате изменения программы развития гаплоидной микроспоры прекращается формирование пыльцевого зерна (мужского гаметофита) и идут процессы пролиферации клеток, приводящие к образованию эмбриоида, который разовьется в гаплоидное растение или каллуса. В соответствии с этим различают два пути регенерации гаплоидов *in vitro* – прямой и непрямой.

При непрямом андрогенезе микроспоры или клетки пыльцевого зерна образуют каллус, дающий начало растению-регенеранту после переноса на среду, индуцирующую органогенез. Более желателен путь прямого андрогенеза, при котором микроспора ведет себя как зигота и проходит целый ряд этапов эмбриогенеза, вплоть до образования на пыльнике растений. Прямое развитие эмбриоидов из пыльцевых зерен достигнуто у четырех родов из семейства *Solanaceae* – *Datura*, *Nicotiana*, *Atropa*, *Lycium*. Эмбриоиды и каллусы предложено называть андрогенными новообразованиями, т.к. они несут генотип мужской гаметы. Поскольку гаплоидные растения при андрогенезе могут образовываться из микроспор или из пыльцевого зерна, содержащего вегетативную и генеративную клетки, то возможны 4 основных пути андрогенеза:

1 путь: микроспора делится на две идентичные дочерние клетки, способные к спорофитному развитию. В данном случае не происходит формирования вегетативных и генеративных клеток.

2 путь: микроспора в результате неравного деления образует вегетативную и генеративную клетки. Спорофиты возникают в результате дальнейшего развития вегетативной клетки, а генеративная клетка дегенерирует.

3 путь: эмбриоиды формируются только из генеративной клетки. В таких случаях вегетативная клетка или вовсе не делится, или делится до известного предела.

4 путь, как и во втором случае, в результате деления одноядерной микроспоры образуются вегетативная и генеративная клетки, которые в дальнейшем делятся и участвуют в развитии спорофита.

В настоящее время более чем у 200 видов удалось получить целые растения или линии клеток из микроспор, в их числе немало хозяйственно важных культур.

Методы, позволяющие получить гаплоиды *in vitro*, подразделяются на методы культуры пыльников (на питательной среде культивируются изолированные пыльники) и методы культуры пыльцы (методы, при которых соматические ткани пыльника удаляются).

Процесс получения гаплоидов методом культуры пыльников начинается со стерилизации бутонов. Для повышения количества образующегося из микроспор материала рекомендуется после стерилизации выдерживать пыльники при пониженной температуре. Для каждого вида необходимо определить оптимальную температуру и время инкубации, которые зависят от стадии развития пыльцы. Причем для пыльцы, находящейся на более поздних стадиях развития, обычно используют более короткое время прединкубации. Воздействие низкой температуры можно рассматривать или как способ задержки процессов развития микроспор и сохранения их жизнеспособности, или как стресс, изменяющий программу развития пыльцы.

На следующем этапе осуществляется препарирование. Пыльники большинства видов растений обладают достаточным размером, поэтому относительно легко могут быть извлечены из цветков. Однако у некоторых видов (тропические злаки) препарирование сложных соцветий для удаления крошечных пыльников представляет собой длительную процедуру. В этом случае рекомендуется культивировать соцветия полностью. Во время извлечения пыльников ни в коем случае нельзя их повреждать. Поврежденные пыльники

обязательно отбрасывают, т.к. в противном случае каллус может образовываться не из пыльцы, а из соматических диплоидных клеток тканей пыльников.

После выделения пыльников осуществляется их перенос на среду для культивирования. Рекомендуемые многими авторами среды: 0,5 солей по прописи Мурасиге и Скуга (для представителей семейства пасленовых), китайская среда № 6, среда Ничей и др. Культивирование пыльников проводят на жидких, полужидких и комбинированных средах – двуслойных. Хорошие результаты дает метод плавающих пыльников Сандерленда: пыльники, помещенные на жидкую или комбинированную среду, через некоторое время раскрываются, и микроспоры высыпаются наружу, т.е. фактически микроспоры культивируются в присутствии пыльников, что положительно сказывается на ранних этапах индукции андрогенеза.

Формирование эмбриоида из микроспоры длится 3–10 недель в зависимости от вида растения. В результате последовательных делений эмбриогенной клетки, происходящих внутри оболочки пыльцевого зерна, формируется шарик из множества мелких клеток. Наконец, экзина, окружающая эмбриоид, разрывается, и он высвобождается. После этого средний размер клеток начинает увеличиваться. Далее эмбриоид развивается вполне аналогично зиготическому зародышу.

К основным недостаткам метода культуры пыльников следует отнести: невысокую эффективность, появление большого числа альбиносных растений-регенерантов, возникновение мутаций при эмбриогенезе.

Теоретическая привлекательность метода культуры пыльцы заключается в том, что он позволяет избавиться от ингибиторов, содержащихся в тканях пыльника и избежать конкурирующего с пыльцой роста соматических тканей, а также позволяет получить гомогенную популяцию многочисленных клеток пыльцы, определенной синхронности ее развития и эмбриогенеза. В настоящее время разработано несколько методов отделения пыльцы от соматических тканей пыльника: спонтанное освобождение, гомогенизация и фильтрация, разрезание пыльников.

Для культуры пыльцы наиболее широко используется среда Ничей. На индуцирование развития пыльцы в условиях культуры *in vitro* наибольший эффект оказывает воздействие пониженной температуры (5 °С) в течение 3 дней.

Недостатки метода культуры пыльцы заключаются в том, что конечный выход растений-регенерантов обычно ниже, чем из микроспор, развивающихся внутри пыльника. У некоторых видов, особенно у злаков, микроспоры невозможно отделить от тканей пыльников без того, чтобы резко не снизить их жизнеспособность, а, следовательно, выживаемость и развитие в культуре. В результате метод культуры пыльцы используется на практике реже, чем метод культуры пыльников.

Для успешной индукции андрогенеза *in vitro* важное значение имеют следующие факторы:

- ✓ характеристики растения-донора (генотип, возраст, условия выращивания, стадия развития пыльцы);
- ✓ состав питательной среды для культивирования (фитогормоны, органические добавки, наличие агара, осмотическое давление);
- ✓ условия культивирования (температура, свет, плотность посадки пыльников, др.).

Помимо андрогенеза *in vitro* возможен другой путь получения гаплоидных растений, а именно из клеток зародышевого мешка. Этот процесс получил название гиногенеза. Образующийся при этом зародыш наследует только признаки материнского организма. К преимуществам метода гиногенеза относится возможность получения гаплоидов у мужских стерильных растений, а также растений, у которых андрогенный каллус обладает низкой морфогенетической потенцией или приводит к образованию альбиносов. Кроме того, зародышевый мешок в отличие от микроспор способен к индукции спорофита на всех стадиях развития.

Техника культивирования изолированных семязпочек была разработана сначала для ячменя, затем стала применяться и для других растений. К настоящему времени метод успешно применен для получения гаплоидов сахарной свеклы, подсолнечника, кукурузы, картофеля, риса, пшеницы, райграсса пастбищного.

Гиногенетические зародыши развиваются из яйцеклетки или из антипода. Синергиды обычно разрушаются. При инокуляции семязпочек и завязей на стадии макроспор в течение 1–3 месяцев выявляется стадия зрелого восьмиядерного зародышевого мешка, в течение 5–9 месяцев возникают эмбриогенные структуры.

При культивировании семязпочек, как и при культивировании пыльников, необходима обработка холодом. Оптимальная продолжительность воздействия холода связана с генотипом экспланта, стадией инокуляции и условиями культивирования и обычно составляет минимум 1–4 суток. Увеличение продолжительности охлаждения до 10–15 суток от начала формирования макроспор при инокуляции семязпочки на стадии макроспоры приводит к их превращению в зародышевый мешок через месяц. В тех же условиях при инокуляции на стадии восьмиядерного зародышевого мешка через такое же время можно добиться появления зародышей.

К недостаткам метода гиногенеза, в первую очередь, относится низкий процент выхода эмбриоидов, поскольку развитие зародыша в проросток, как правило, блокируется в начале органогенеза в глобулярной или сердцевинной стадии. Частота образования гаплоидов, как правило, составляет 2 растения на 1000 семязпочек. Необходимость опытным путем подбирать условия для индукции формирующихся клеток гаметофита, а также возможность появления различных соматоклональных вариантов и спонтанных мутаций сдерживают широкое практическое применение данного метода.

Важный и необходимый этап работы по получению гаплоидных растений *in vitro* – их идентификация. Основными причинами образования негаплоидных растений являются следующие:

- ✓ слияние ядер при первых делениях микроспоры;
- ✓ образование регенерантов из негаплоидных клеток стенки пыльника;
- ✓ образование регенерантов из негаплоидной пыльцы, которая может образовываться у некоторых видов при нормальных условиях с низкой частотой;
- ✓ мутации в начале эмбриогенного развития.

Гаплоидные растения идентифицируются по морфологическим признакам, а также с помощью цитогенетических методов – подсчета числа хромосом в делящихся клетках кончика корня, определения числа хромосом в замыкающих клетках устьиц, определения числа ядрышек, подсчета числа хромоцентров, приходящихся на ядро в клетках листа, подсчета числа пластид в замыкающих клетках. Последний метод отличается наибольшей простотой. Он основан на том, что у гаплоидов число хлоропластов в замыкающих клетках устьиц почти в 2 раза меньше, чем у диплоидов.

9. Имобилизованные клетки растений

Каллусные культуры при поверхностном культивировании накапливают вторичные метаболиты в большем количестве, чем клетки, растущие в жидкой среде. Установлено, 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 разные 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 – это подтверждают. В этой связи в последнее время усилился интерес к иммобилизованным клеткам.

Основные условия иммобилизации – выделение метаболитов в питательную среду и свободное извлечение метаболитов, например, алкалоидов из питательной среды.

Иммобилизация клеток обеспечивает условия, приводящие к дифференциации, и способствует увеличению выхода вторичных метаболитов. Она позволяет клеткам расти в тесном физическом контакте друг с другом. При взаимном контакте клеток, в их массе, как в организме устанавливаются определенные химические и физические градиенты, регулирующие метаболизм и процессы дифференциации (градиенты регуляторов роста, питательных веществ, кислорода и углекислоты).

Растительные клетки могут быть иммобилизованы 4 способами:

1. в инертном субстрате, т.е. обволакивание клеток одной из разных цементирующих сред с альгинатом, агаром, полиакриламидом, коллагеном или комбинацией гелей;
2. адсорбция клеток на инертном субстрате;
3. ковалентное связывание клеток с инертным субстратом;
4. адсорбция клеток на инертный субстрат с помощью биологических молекул (лектины).

На практике чаще всего применяют первые два способа иммобилизации. Клетки, прикрепленные к биологическому инертному субстрату, дольше сохраняют жизнеспособность. Вокруг иммобилизованных клеток могут циркулировать большие объемы питательной среды, регулируя состав которой, замедляют рост клеток и, тем самым, повышают выход вторичных метаболитов.

Иммобилизованные клетки необходимо снабжать в большом количестве предшественниками, но в низких концентрациях. Предшественники должны быть как можно ближе к искомому продукту в цепи биосинтезов. В связи с тем, что клетки в иммобилизованном состоянии культивируются продолжительное время, то для этого используются клетки, которые сами естественным путем секретируют необходимые метаболиты в питательную среду или могут быть принуждены 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 весьма нелегкая задача с точки зрения экономичности производства.

Если иммобилизованные клетки предназначены для промышленного использования, то важную роль играет выбор типа биореактора. Наиболее удобной является колоночная культура, т.к. в данном случае экономится пространство и облегчается контроль за током питательных веществ через клетки, а в случае надобности улучшается освещенность культуры.

Иммобилизованные клетки могут быть использованы не только для синтеза, но и для биотрансформации разных БАВ. Их преимущество заключается в том, что благодаря увеличению клеток в иммобилизованном состоянии удешевляется процесс биокатализа.

А. Альферманн с сотр. провели следующий опыт: они культивировали клетки наперстянки шерстистой (*Digitalis lanata*), «окутанные» альгинатным гелем (50 шариков диаметром 4–5 мм), в колбах Эрленмейера (емкостью 100 мл) в 25 мл среды. Среду с субстратом меняли каждые 3 суток. В качестве субстрата добавлялся β -метилдигитоксин, который трансформировался клетками в β -метилдигоксин. В таких условиях культивирования клетки осуществляли биотрансформацию субстрата в продукт с постоянной скоростью в течение 170 суток. Сердечный гликозид дигоксин обладает большим терапевтическим эффектом по сравнению дигитоксином, которого в растениях содержится значительно больше. При этом дигоксин отличается от дигитоксина лишь по

дополнительной гидроксильной группе на C₁₂. Недифференцированные культуры клеток наперстянки шерстистой не образуют сердечных гликозидов, но могут осуществлять определенную реакцию трансформации субстратов, добавленных в питательную среду.

Преимущества иммобилизованных растительных клеток в сравнении с суспензионными культурами:

1. многократное использование биомассы путем сохранения клеток в биореакторе и выделения продукта из среды;
2. физическое отделение биомассы от среды;
3. увеличение продолжительности культивирования на стадии активного биосинтеза;
4. получение большего количества вторичных метаболитов;
5. сокращение времени ферментации;
6. увеличение срока работы клеток (иммобилизованные клетки с низкой скоростью роста способны к интенсивной выработке метаболитов);
7. возможность эффективной биотрансформации.

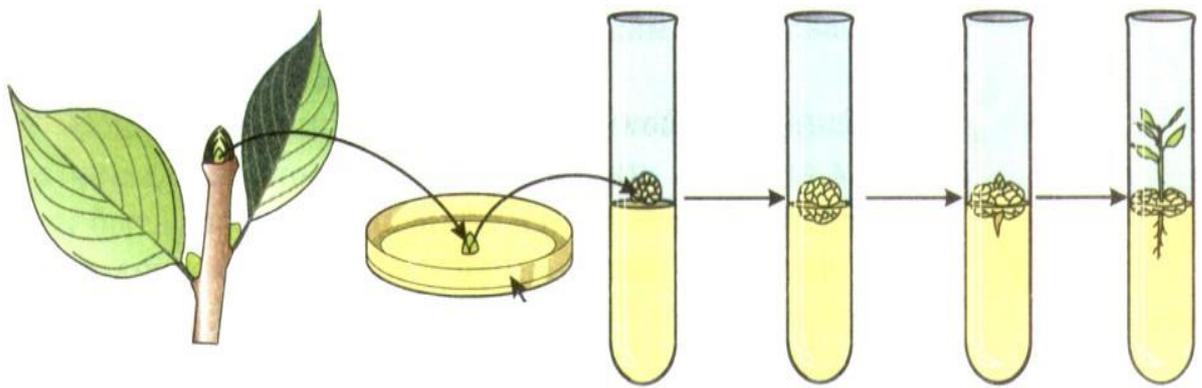


Рис. 1. Схема регенерации растения

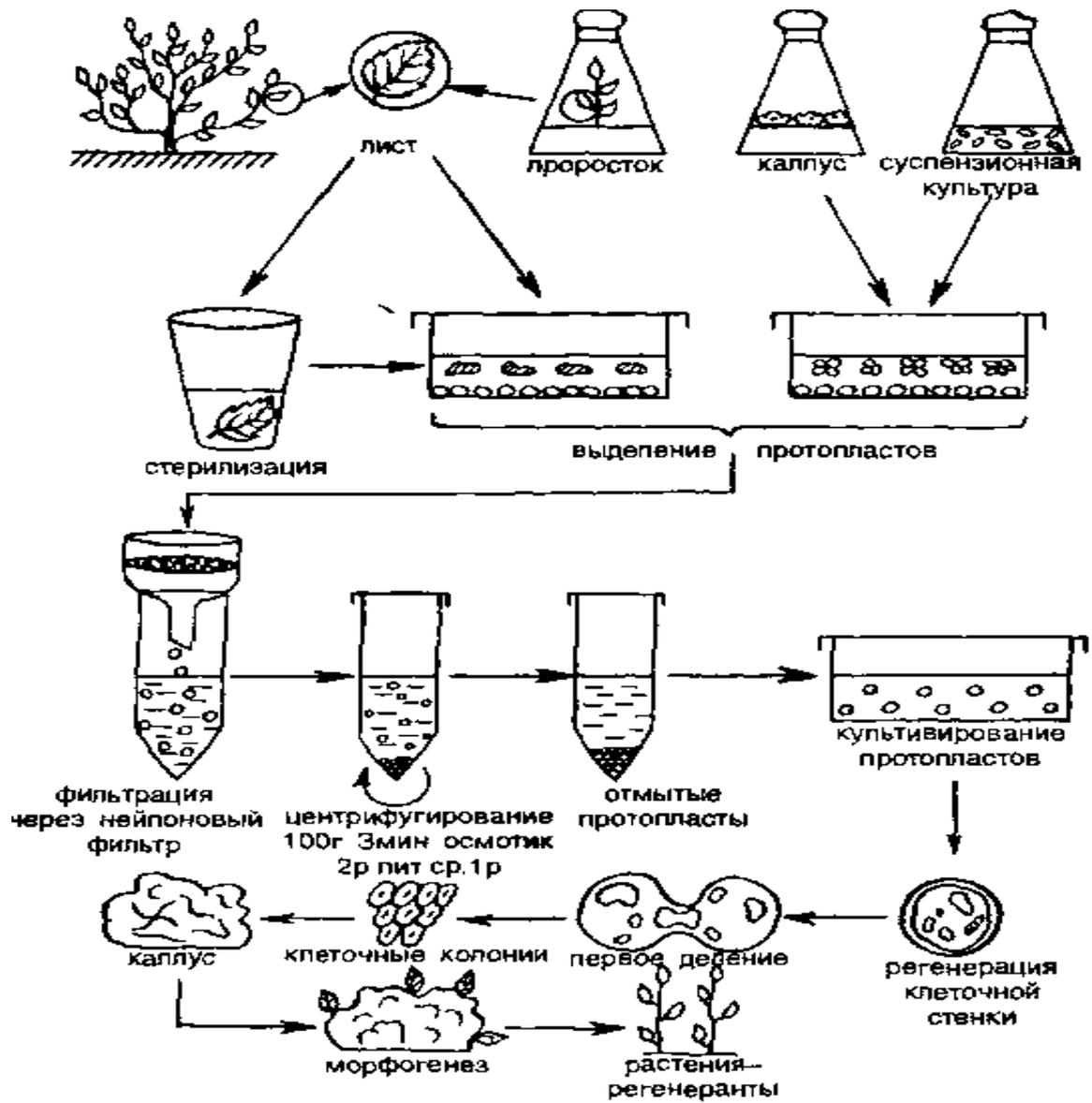


Рис. 2. Схема получения и культивирования протопластов из клеток растений