

**ГОУ ВПО ИГМУ РОСЗДРАВА**  
**Кафедра технологии лекарственных форм**

**Т.П. Зюбр, В.А. Пешкова, И.А. Мурашкина**

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ В  
БИОТЕХНОЛОГИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**  
**Учебно-методическое пособие**

**Иркутск, 2008**



## Содержание

1. Использование культуры растительных клеток .....	4
2. Культура клеток и тканей, краткая история метода.....	8
3. Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений.....	10
4. Дедифференцировка как основа каллусогенеза.....	16
5. Общая характеристика каллусных клеток.....	18
6. Методы культивирования изолированных клеток и тканей.....	22
7. Культура протопластов.....	30
8. Использование метода культуры изолированных клеток и тканей в создании современных технологий. Синтез вторичных метаболитов.....	40
9. Трансгенные растения.....	45
Тесты .....	59
Терминологический словарь.....	62
Ответы на тесты.....	67
Список литературы.....	68

## 1. Использование культуры растительных клеток

Одним из главных механизмов, поддерживающим стабильность жизни на Земле, является сохранение разнообразия, взаимосвязанного и взаимозависимого сосуществования человека и природы. Так, академик Г. Ф. Гаузе доказал, что устойчивость сообщества тем выше, чем больше число составляющих его видов. Рост городов, вырубка лесов, ухудшение экологии, усиленная эксплуатация дикорастущих и плантационных растений - традиционного источника лекарственных средств - приводят к растущему дефициту сырья. Многие виды растений находятся на грани вымирания. Использование культур клеток и тканей растений помогает спасти от уничтожения ставших уже редкими тысячи дикорастущих растений, которые синтезируют необходимые для жизнедеятельности человека вещества.

Культивирование растительных клеток и тканей на искусственной питательной среде в биореакторах помимо решения ряда экономических, экологических и технологических задач позволяет, в частности, 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 вещества, например никотин, кодеин, хинин, диосгенин и синтезировать новые биологически активные вещества;
- использовать культуры растительных клеток для биотрансформации конечных продуктов.

Использование новых технологий получения лекарственных растений (содержащих то или иное активное начало) в виде каллусных (лат. *callus* – толстая кожа, мозоль) и суспензионных культур имеет ряд преимуществ:

- стандартность накапливаемого сырья;
- высокий выход активного начала (на примере культивирования женьшеня: рентабельность производства стала возрастать при внедрении технологии по-

лучения «бородатых корней», где по условиям роста и скопления клеток возникают субпопуляции с повышенной дифференцировкой - самые продуктивные клетки по биоактивным веществам);

- сокращение сроков культивирования для накопления растительной биомассы;

- возможность промышленного производства биомассы экзотических растений, малодоступных для нашей страны, например, таких как раувольфия, диоскорея, 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 свои 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, что весьма затрудняет работу биотехнолога с такими культурами.

Культуры клеток высших растений имеют две сферы применения:

1. Изучение биологии клетки, существующей вне организма, обуславливает ведущую роль клеточных культур в фундаментальных исследованиях по генетике и физиологии, молекулярной биологии и цитологии растений. Популяциям растительных клеток присущи специфические особенности: генетические, эпигенетические (зависящие от дифференцированной активности генов) и физиологические. При длительном культивировании гетерогенной по этим признакам популяции идет размножение клеток, фенотип и генотип которых соот-

ветствуют данным условиям выращивания, следовательно, популяция эволюционирует. Все это позволяет считать, что культуры клеток являются новой экспериментально созданной биологической системой, особенности которой пока мало изучены. Культуры клеток и тканей могут служить адекватной моделью при изучении метаболизма и его регуляции в клетках и тканях целого растения.

2. Культивируемые клетки высших растений могут рассматриваться как типичные микрообъекты, достаточно простые в культуре, что позволяет применять к ним не только аппаратуру и технологию, но и логику экспериментов, принятых в микробиологии. Вместе с тем, культивируемые клетки способны перейти к программе развития, при которой из культивируемой соматической клетки возникает целое растение, способное к росту и размножению.

Можно назвать несколько направлений создания новых технологий на основе культивируемых тканей и клеток растений:

1. Получение биологически активных веществ растительного происхождения:

- традиционных продуктов вторичного метаболизма (токсинов, гербицидов, регуляторов роста, алкалоидов, стероидов, терпеноидов, имеющих медицинское применение);
- синтез новых необычных соединений, что возможно благодаря исходной неоднородности клеточной популяции, генетической изменчивости культивируемых клеток и селективному отбору клеточных линий со стойкими модификациями, а в некоторых случаях и направленному мутагенезу;
- культивируемые в суспензии клетки могут применяться как мультиферментные системы, способные к широкому спектру биотрансформаций химических веществ (реакции окисления, восстановления, гидроксирования, метилирования, деметилирования, гликолизирования, изомеризации). В результате биотрансформации получают уникальные биологически активные продукты на основе синтетических соединений или веществ промежуточного обмена растений других видов.

2. Ускоренное клональное микроразмножение растений, позволяющее из одного экспланта получать от 10000 до 1000000 растений в год, причем все они будут генетически идентичны.

3. Получение безвирусных растений.

4. Эмбриокультура и оплодотворение *in vitro* часто применяются для преодоления постгамной несовместимости или щуплости зародыша, для получения растений после отдаленной гибридизации. При этом оплодотворенная яйцеклетка вырезается из завязи с небольшой частью ткани перикарпа и помещается на питательную среду. В таких культурах можно также наблюдать стадии развития зародыша.

5. Антерные культуры – культуры пыльников и пыльцы используются для получения гаплоидов и дигаплоидов.

6. Клеточный мутагенез и селекция. Тканевые культуры могут производить регенеранты, фенотипически и генотипически отличающиеся от исходного материала в результате соматического варьирования. При этом в некоторых случаях можно обойтись без мутагенной обработки.

7. Криоконсервация и другие методы сохранения генофонда.

8. Иммобилизация растительных клеток.

9. Соматическая гибридизация на основе слияния растительных протопластов.

10. Конструирование клеток путем введения различных клеточных оргanelл.

11. Генетическая трансформация на хромосомном и генном уровнях.

12. Изучение системы «хозяин – паразит» с использованием вирусов, бактерий, грибов и насекомых.

## **2. Культура клеток и тканей, краткая история метода**

Бурное развитие клеточной инженерии приходится на 50-е годы прошлого века, хотя первые попытки выращивания изолированных кусочков ткани были сделаны гораздо раньше. В конце XIX – начале XX в. немецкие ученые Х. Фехтинг (1893), С. Рехингер (1893), Дж. Хаберландт (1902) сделали первую

неудачную попытку стимуляции роста растительных тканей и органов, помещенных на фильтровальную бумагу, пропитанную сахарозой. Несмотря на отсутствие положительного результата, их работы представляют большой интерес. В них были высказаны идеи, которые намного опередили развитие науки того времени и которые нашли свое подтверждение несколько десятилетий спустя. Так, Фехтинг предположил, что полярность присуща не только организму или органу растения, но и самой клетке. Рехингер определил минимальный размер сегмента, образующего каллус. Согласно его исследованиям, в кусочках ткани тоньше 1,5 – 2,0 мм клетки не делились. Хаберландт впервые четко сформулировал идеи о возможности культивирования *in vitro* изолированных клеток растений и о тотипотентности клеток, т. е. способности любой соматической клетки полностью реализовывать свой потенциал развития. Иначе говоря, о способности каждой растительной клетки давать начало целому организму.

Первые успехи были получены в 1922 г. американским ученым В. Роббинсом и немецким ученым В.Котте. Независимо друг от друга они показали возможность выращивания меристем кончиков корней томатов и кукурузы на синтетической питательной среде. Считается, что их работы легли в основу метода культуры изолированных корней растения.

Настоящее развитие метода культуры тканей и клеток высших растений началось в 1932 г. с работ французского ученого Р. Готре и американского исследователя Ф. Уайта. Они показали, что при периодической пересадке на свежую питательную среду кончики корней могут расти неограниченно долго. Кроме того, ими были разработаны методы культивирования новых объектов: тканей древесных растений камбиального происхождения, каллусных тканей запасающей паренхимы (Р. Готре), а также тканей растительных опухолей (Ф. Уайт). Результаты чужих и собственных экспериментов Уайт обобщил в монографии «Культура растительных тканей», которая была переведена на русский язык и издана в СССР в 1949 году. В ней он выделяет несколько периодов в истории развития метода культуры клеток, тканей и органов растений:



1. 1834 -1900 гг. - создание и разработка клеточной теории.
2. 1900 –1922 гг. - сформулирована идея культуры тканей.
3. 1922 –1934 гг. - безуспешные поиски методов, обеспечивающих длительное культивирование тканей.
4. 1934 - 1939 гг. - детальная разработка техники культуры растительных тканей.

С этого момента начинаются массовые исследования по разработке новых питательных сред, включающие даже такие неконтролируемые компоненты, как березовый сок или эндосперм кокоса, и по введению в культуру новых объектов. Период 1940 - 1960 гг. значительно расширил список видов, выращиваемых *in vitro*. К 1959 г. насчитывается уже 142 вида высших растений, выращиваемых в стерильной культуре.

В 1955 г. после открытия Ф. Скугом и С. Миллером нового класса фитогормонов – цитокинов – оказалось, что при совместном их действии с другим классом фитогормонов – ауксинами – появилась возможность стимулировать деление клеток, поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез в контролируемых условиях.

В 1959 г. был предложен метод выращивания больших масс клеточных суспензий. Важным событием стала разработка Е. Коккингем (Ноттингемский университет, Великобритания) в 1960 г. метода получения изолированных протопластов из тканей корня и плодов томатов путем обработки их смесью пектолитических и целлюлолитических ферментов. Также с сотрудниками были определены условия культивирования изолированных протопластов, при которых они образуют клеточные стенки, делятся и дают начало клеточным линиям, способным к морфогенезу. Это послужило толчком к получению соматических гибридов, введению в протопласты вирусных РНК, клеточных органелл, клеток прокариот. В это же время Дж. Морелом и Р.Г. Бутенко был предложен метод клонального микроразмножения, который сразу же нашел широкое практическое применение. Весьма важным достижением в развитии технологий культивирования изолированных тканей и клеток стало культиви-

рование одиночной клетки с помощью ткани-«няньки». Этот метод был разработан в России в 1969 г. в Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН под руководством Р.Г. Бутенко. В последние десятилетия продолжается быстрый прогресс технологий клеточной инженерии, позволяющих значительно облегчить селекционную работу. Большие успехи достигнуты в развитии методов получения трансгенных растений, технологий использования изолированных тканей и клеток травянистых растений, начато культивирование тканей древесных растений.

### **3. Особенности культивирования изолированных клеток и тканей растений**

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

#### **Асептика**

Культивирование фрагментов ткани или органов растения – эксплантов, а тем более отдельных клеток требует соблюдения полной асептики. Микроорганизмы, которые могут попасть в питательную среду, выделяют токсины, ингибирующие рост клеток и приводящие культуру к гибели. Поэтому при всех манипуляциях с клетками и тканями при культивировании *in vitro* соблюдают определённые правила асептики в ламинар-боксе или в асептических комнатах. В первом случае асептика достигается подачей профильтрованного стерильного воздуха, направленного из ламинар-бокса наружу, на работающего. Асептические комнаты стерилизуют с помощью ультрафиолетовых ламп, а работают в таких помещениях в стерильной одежде. Рабочая поверхность столов в асептических комнатах и инструменты перед работой дополнительно стерилизуют спиртом.

Чистую посуду, предварительно завёрнутую в бумагу или фольгу, инструменты, бумагу, вату стерилизуют сухим жаром в сушильном шкафу при температуре 160°C в течение 1,5 - 2 часа. Питательные среды стерилизуют в автоклаве при температуре 120°C и повышенном давлении в течение 15 – 20

мин. Если в состав питательных сред входят вещества, разрушающиеся при автоклавировании, их следует стерилизовать путём фильтрации через бактериальный фильтр. Затем стерильные профильтрованные компоненты добавляют в проавтоклавированную среду, охлаждённую до температуры 40°C.

Растительные ткани сами по себе могут служить серьёзным источником заражения, так как на их поверхности всегда находится эпифитная микрофлора. Поэтому необходима поверхностная стерилизация, которую проводят следующим образом. Предварительно часть растения, из которой будет извлечён эксплант, промывают водой с мылом и споласкивают чистой водой. Затем растительный материал стерилизуют в растворах дезинфицирующих веществ. Некоторые из этих веществ, а также время стерилизации представлены в таблице 1.

Таблица 1

Стерилизация исходного растительного материала (по Р.Г. Бутенко, 1999)

Объект	Время стерилизации, мин		
	Диацид	Сулема 0,1%	Перекись водорода 10-12%
1	2	3	4
Семена сухие	15-20	10-15	12-15
Семена набухшие	6-10	6-8	6-8
Ткани стебля	20-40	20-25	-
Листья	1-3	0,5-3	3-5
Апексы	1-10	0,5-7	2-7

После выдерживания эксплантов в дезинфицирующем растворе их несколько раз промывают в дистиллированной воде и скальпелем удаляют наружный слой клеток на срезах эксплантов, так как он может быть повреждён при стерилизации.

Микроорганизмы могут находиться и внутри растительной ткани. Наиболее часто внутреннее инфицирование встречается у тропических и субтропических растений. Поэтому кроме поверхностной стерилизации иногда приходится применять антибиотики, которые и убивают микробную флору внут-

ри ткани. Следует, однако заметить, что подобная обработка не всегда приводит к стерилизации внутренних тканей, так как трудно выбрать направленно действующий антибиотик.

### **Питательные среды**

Изолированные клетки и ткани культивируют на многокомпонентных питательных средах. Они могут существенно различаться по своему составу, однако, в состав всех сред входят необходимые растениям макро- и микроэлементы, углеводы, витамины, фитогормоны и их синтетические аналоги. Углеводы (обычно это сахароза или глюкоза) входят в состав любой питательной смеси в концентрации 2-3 %. Они необходимы в качестве питательного компонента, так как большинство каллусных тканей лишено хлорофилла и неспособно к автотрофному питанию. Поэтому их выращивают в условиях рассеянного освещения или в темноте. Исключение составляет каллусная ткань мандрагоры, амаранта и некоторых других растений.

Обязательными компонентами питательных сред должны быть ауксины, вызывающие дедифференцировку клеток экспланта и цитокинины, индуцирующие клеточные деления. При изменении соотношения между этими фитогормонами и при добавлении других фитогормонов могут быть вызваны разные типы морфогенеза.

Высокое содержание нитратов, ионов аммония, калия, фосфатов способствуют быстрому росту клеток. Истощение среды значительно снижает рост и процессы вторичного метаболизма. Однако изначально низкое содержание фосфатов в питательной среде способно стимулировать синтез вторичных метаболитов. Установлено, что культивирование каллусов солодки голой на среде с половинной концентрацией азота и фосфора в темноте увеличивает содержание фенольных соединений в 1,6 раза по сравнению с каллусами, растущими на полной среде. В среду могут быть добавлены эндоспермы незрелых зародышей (кокосовый орех, конский каштан и др.), патока некоторых деревьев, различные экстракты (солодовый, дрожжевой, томатный сок). Введение их в среду дает интересные результаты, но такие эксперименты трудно воспроиз-

водимы, так как действующий компонент, как правило, точно неизвестен. Например, добавление в питательную среду отдельных фракций кокосового молока не давало никаких результатов, в то время как нефракционированный эндосперм вызывал деление клеток.

При приготовлении твёрдых питательных сред для поверхностного выращивания каллусных тканей используют очищенный агар-агар – полисахарид, получаемый из морских водорослей. В настоящее время известно большое число различных по составу питательных сред (таблица 2).

Среда Мурасиге и Скуга - самая универсальная. Она пригодная для образования каллусов, поддержания неорганизованного каллусного роста, индукции морфогенеза у большинства двудольных растений. Так, изменение соотношения ауксина и кинетина приводит к образованию либо корней (преобладание ауксина), либо стеблевых культур (преобладание кинетина).

Среда Гамборга и Эвелега хорошо подходит для культивирования клеток и тканей бобовых растений и злаков, среда Уайта обеспечивает укоренение побегов и нормальный рост стебля после регенерации, а среда Нича и Нич пригодна для андрогенеза в культуре пыльников.

Таблица 2

Состав питательных сред, применяемых при культивировании клеток и тканей (по Р.Г. Бутенко, 1999)

Компонент сред	Концентрация			
	Мурасиге и Скуга, 1962	Гамборга и Эвелега, 1968	Уайта, 1939	Нича и Нич, 1974-1975
1	2	3	4	5
$KNO_3$	1900	3000	81	950
$NH_4NO_3$	1650	-	-	72
$Ca(NO_3)_2$	-	-	142	-
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	-	-	-	-
$(NH_4)_2SO_4$	-	134	-	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	500	74	185

CaCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	-	166
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	150	-	-
KCl	-	-	65	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	-	12	68
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	150	-	-
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	10	-	-
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	-	-	25
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	8,6	-	-	-
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	2	-	10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3	-	10
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,075	-	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	-	0,25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	27,8	-	-	27,8
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	37,3	-	-	37,3
NaEDTA·2H <sub>2</sub> O	-	28	-	-
Секвестрен 330-Fe	100	-	-	200
Мезоинозит	-	-	-	3
Аскорбиновая кислота	-	-	-	3
Тиамин – HCl	0,5	-	-	1
Пиридоксин - HCl	0,5	-	-	-
Никотиновая кислота	0,5	-	-	60000
Сахароза	30000	20000	2000	7000
Агар «Дифко», гелрит, агароза	-	-	-	-

## Физические факторы

На рост и развитие растительных тканей *in vitro* большое влияние оказывают физические факторы – свет, температура, аэрация, влажность.

**Свет.** Большинство каллусных тканей могут расти в условиях слабого освещения или в темноте, так как они не способны фотосинтезировать. Вместе с тем свет может выступать как фактор, обеспечивающий морфогенез и активирующий процессы вторичного синтеза. В качестве источника света используют люминесцентные лампы. Для большинства травянистых растений оптимум освещённости составляет примерно 1000 люкс. Слишком низкая (300 люкс) или высокая (3000- 10000 люкс) освещённость подавляет рост. Освещение может влиять на метаболизм каллусных клеток. Так, в культурах чайного растения под действием света увеличивался биосинтез полифенолов. Напротив в культуре клеток *Scopolia parviflora* свет подавлял образование алкалоидов. Кроме интенсивности освещённости на культуру ткани и её физиологические особенности влияет качество света. Так, более 20 флавонов и флавоновых гликозидов образуется в культурах клеток петрушки после освещения её непрерывным люминисцентным светом «холодный белый». Вместе с тем синтез флавоновых гликозидов активируется при последовательном облучении ультрафиолетовым светом, а затем светом, лежащим в области «красный - длинноволновый красный».

**Температура.** Для большинства каллусных культур оптимальна температура 26°C. В то же время каллусы и культуры клеток диоскореи дельтавидной хорошо растут даже при температуре 32°C. В отличие от роста культур клеток и тканей индукция их морфогенеза требует более низких температур (18-20°C). Влияние температуры на метаболизм клеток *in vitro* изучено слабо. Есть данные, что в каллусных культурах максимальное образование алкалоидов наблюдалось при температуре 25°C, а при повышении температуры резко снижалось. В суспензионных культурах клеток *Iromoea* содержание жирных кислот значительно увеличивалось, если их выращивали при субоптимальных температурах роста (15°C). Поэтому при выращивании культуры *in vitro* необ-

ходимо тщательно изучать влияние всех абиотических факторов, в том числе температурного на рост и метаболизм клеток.

**Аэрация.** Для выращивания суспензионных культур большое значение имеет аэрация. Особенно важно снабжение воздухом культивируемых клеток в больших объемах ферментеров.

При сравнении разных типов ферментеров было показано, что синтез вторичных метаболитов в суспензионной культуре был наибольшим при подаче воздуха снизу. При выращивании клеток в малых объемах (в колбах) нормальная аэрация достигается при постоянном перемешивании суспензии.

**Влажность.** Оптимальная влажность в помещении, где растут культуры, должна составлять 60 -70%.

Таким образом, культивирование клеток и тканей зависит от многих факторов внешней среды, и действие их не всегда хорошо известно. Поэтому при введении в культуру нового вида растений необходимо, прежде всего, тщательно изучить влияние физических факторов на рост и физиологические характеристики этой культуры.

#### **4. Дедифференцировка как основа каллусогенеза**

Культура изолированных тканей обычно представлена каллусными и гораздо реже опухолевыми тканями. Каллусная ткань образуется в результате повреждения на целых растениях, а также в стерильной культуре на эксплантах - фрагментах ткани или органа, используемых для получения первичного каллуса. Возникновение каллуса связано с неорганизованным делением (пролиферацией) дедифференцированных клеток. Дедифференцировка - основа создания каллусной ткани. В процессе дифференцировки клетки теряют способность делиться. Дедифференцировка – это возвращение клеток в меристематическое состояние, при котором они сохраняют способность к делению. У интактных растений дедифференцировка и индукция каллусогенеза возникают вследствие образования раневых гормонов (травматиновая кислота) при механическом повреждении. Обязательное условие дедифференцировки тканей экспланта и превращения их в каллусные клетки, помимо повреждения, - при-



сутствие ауксинов и цитокининов. Среди ауксинов чаще всего используют 2,4-D (2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту), ИУК (индолил-3-уксусную кислоту), НУК (альфа-нафтилуксусную кислоту), причем наибольшую активность проявляет 2,4-D. Из цитокининов в искусственные питательные среды обычно вносят кинетин, 6-БАП (6-бензиламинопурин), зеатин. Наиболее активны 6-БАП и зеатин. Функции этих двух групп гормонов в каллусогенезе разные, но они тесно связаны между собой. Ауксины вызывают процессы дедифференцировки клетки, подготавливают ее к делению. Затем цитокинины инициируют деление клеток. Последние исследования свидетельствуют, что ауксины индуцируют синтез главной протеинкиназы клеточного деления  $P_{34}^{cdc2}$ , а цитокинины - циклинов. Таким образом, действие этих гормонов проявляется только при последовательном или одновременном внесении их в среду. Кроме того, оно будет зависеть от физиологического состояния клеток экспланта, от их компетентности к действию тех или иных внешних факторов. Результаты исследований показали, что полисахариды и какие-то неизвестные индукторы тоже могут вызывать деление клеток, приводящее к образованию каллуса.

Во время процесса дедифференциации, который у всех клеток сходен, клетки должны утратить характерные черты исходной ткани. В первую очередь они теряют запасные вещества - крахмал, белки, липиды. В них разрушаются специализированные клеточные органеллы, в частности хлоропласты, но возрастает число амилопластов. Кроме того, разрушается аппарат Гольджи, перестраиваются эндоплазматический ретикулум и элементы цитоскелета.

Через несколько часов после перенесения экспланта в условия *in vitro* начинается новый синтез белка. Он связан, вероятно, с механическим повреждением и действием гормонов, сохранившихся в экспланте с момента его изоляции из растения. Когда данные гормоны израсходуются, синтез белка прекращается. Если в это время клетки будут культивироваться на питательной среде, содержащей ауксины и цитокины, то начнется каллусогенез, т. е. в результате дедифференцировки и деления клеток будет образовываться первичный каллус. Таким образом, специализированная клетка растительной ткани

становится каллусной в результате дедифференцировки, т. е. восстановления у нее способности к делению.

### **5. Общая характеристика каллусных клеток**

Каллусная клетка имеет свой цикл развития, аналогичный циклу всех других клеток: деление, растяжение, дифференцировку, старение и отмирание. Дифференцировку каллусных клеток принято называть вторичной. Однако ее не следует путать с вторичной дифференцировкой, на которой основан морфогенез. Рост каллусных тканей подчиняется общим закономерностям. Кривая роста каллусных тканей также имеет характер S-образной кривой (ростовая кривая Сакса) и включает пять фаз, длительность которых неодинакова у разных видов растений.

Первая фаза - латентная, или лаг-фаза, заключается в подготовке клеток к делениям. Вторая - фаза экспоненциального роста (логарифмическая). В это время митотическая активность наибольшая, рост идет с ускорением, масса каллуса увеличивается. Третья фаза - линейная, характеризуется постоянной скоростью роста каллусной массы. Четвертая фаза замедленного роста, во время которой интенсивность деления клеток резко снижается. Во время пятой фазы - стационарной - масса каллуса не увеличивается, так как начавшееся отмирание клеток еще компенсируется за счет их деления. Далее следует отмирание каллуса.

Культивируемые каллусные клетки и ткани сохраняют многие физиологические особенности, свойственные клеткам растения, из которого они были получены. Сохраняются, например, такие свойства, как морозостойкость, устойчивость к абиотическим факторам (температура, засоление, фотопериодическая реакция), а главное, хотя и в разной степени, способность к синтезу вторичных метаболитов. Наряду с общими у каллусных клеток появляются свои, характерные только для них особенности. Например, длительно культивируемые *in vitro* клетки высших растений, как каллусные, так и суспензионные, образуют специфическую популяцию, относящуюся к типу неполовых - популяцию соматических клеток. Наиболее характерные свойства этой попу-

ляции - физиологическая асинхронность и генетическая гетерогенность.

**Физиологическая асинхронность** - наиболее важное свойство неполовой популяции. Оно заключается в том, что в каждый данный момент времени клетки находятся в разных фазах роста: одни делятся, другие растут, а третьи уже стареют. Поэтому общее физиологическое состояние такой популяции принято оценивать по состоянию большинства клеток.

Причины возникающей асинхронности весьма разнообразны:

1. Особенности вида, сорта, генотипа индивидуального растения, а также особенности экспланта.
2. Стрессы культивирования, например неоптимальная для данного вида клеток среда.
3. Изменение баланса эндогенных гормонов и концентрации в среде экзогенных гормонов в течение выращивания.
4. Генетическая гетерогенность клеток и клонов.
5. Аномалия митотического цикла клеток *in vitro*.
6. 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, так как она является необходимым условием существования популяции клеток и служит основой для их адаптации.

В качестве причин появления генетической гетерогенности можно назвать следующие:

1. Генетическая гетерогенность исходного материала. В растениях клетки характеризуются различной ploидностью, диплоидны только активно делящиеся меристематические клетки.

2. Нарушение коррелятивных связей при выделении первичного экспланта из растения.

3. Действие компонентов среды. Экзогенные гормоны и стимуляторы могут оказывать мутагенное действие. Ауксины, особенно 2,4-D, входящие в состав питательных сред, - мутагены; цитокинины способствуют полиплоидизации клеток.

4. 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, так как 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 гормоны и вызывают мутации, каллусные 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-D, 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 культивирова-

нии 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 же 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 гены, 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.

## **6. Методы культивирования изолированных клеток и тканей**

### **Твердофазный способ культивирования. Каллусные культуры**

При этом способе культивирования используются так называемые твердые питательные среды, содержащие гелеобразующий компонент, чаще всего агар-агар как наиболее близкий по природе субстрат растительного происхождения. Такая среда имеет вид плотного геля, и каллусные клетки находятся на ее поверхности.

Для получения каллусных культур небольшие фрагменты тканей разных органов высших растений помещают на поверхность питательной среды (пробирки, колбы). Через 4-6 недель культивирования экспланта образуется первичный каллус (масса недифференцированных клеток), который необходимо разделить и перенести на свежую питательную среду. Каллусная ткань, выросшая на твердой питательной среде, имеет рыхлую аморфную структуру в виде массы тонкостенных клеток белого или желтоватого цвета. Качественный химический состав каллусной ткани обычно незначительно отличается от соответствующего интактного растения.

Твердофазный способ культивирования чаще используется в лабораторных условиях для первичного получения изолированных растительных культур, предварительной оценки культур в качестве возможных продуцентов БАВ, а также для выращивания посевного материала. За 4-6 недель среда истощается, что определяет необходимость производить пересев. В противном случае ткани могут погибнуть.

Высшие растения состоят из множества дифференцированных клеток с различными функциями: клетки зеленой ткани листа создают органические вещества в результате фотосинтеза, клетки корня поглощают из почвы минеральные вещества и подают их в другие части растения и т.д. Но все дифференцированные клетки образовались от одной оплодотворенной яйцеклетки материнского растения - зиготы. Эта клетка содержит в себе всю генетическую основу целого растения. Из нее образуются специализированные ткани, различные по химизму происходящих в них процессов, форме и структуре.

Клетка-зигота является родоначальником целого растения, она тотипотентна, т.е. многофункциональна. Кроме зиготы тотипотентность в природных условиях могут проявлять и специализированные клетки. Пример тому – вегетативное размножение черенками, от листа и др. Тотипотентность реализуется также при травмах растений. На раневой поверхности в результате неорганизованной пролиферации клеток происходит образование нароста – каллуса, способствующего заживлению ран (от лат. *callus* – мозоль, толстая кожа).

При образовании каллуса *in vitro* происходит неорганизованный рост клеток и их дедифференциация, т.е. потеря первоначальных функций, свойственных ткани или органу, из которых был получен каллус. Клетки как бы обезличиваются, их функции практически одинаковы и существуют за счет питательной среды. Однако при изменении условий культивирования можно вызвать вторичную дифференциацию и получить целое растение. По сравнению с клетками животных и человека растительные клетки обладают большим преимуществом. Они способны в определенных условиях и на соответствующих питательных средах регенирировать целое растение. Решающую роль во вторичном образовании органов (корней и почек) из изолированных клеток и тканей играет соотношение фитогормонов (ауксинов и цитокининов) и их концентрация в питательной среде.

Как бы долго ни выращивались клетки в изолированной культуре, они твердо «помнят» свое происхождение: клетки моркови образуют зародыш целого растения моркови и т.д. Культивируемые клетки высших растений – это уникальная клеточная популяция, в которой каждая клетка представляет собой отдельный организм, способный к автономному развитию. При регулярном пассивировании способность клеток к делению и росту может поддерживаться очень долго. Есть ткани, которые поддерживаются в культуре *in vitro* по 60-70 лет.

### **Глубинное суспензионное культивирование**

Суспензионные культуры – это одиночные клетки, мелкие, средние и крупные агрегаты (группы клеток), выращиваемые в жидкой питательной сре-

де при постоянной аэрации (доступ кислорода) в асептических условиях. Суспензии получают из каллусов. Для инициации суспензионной культуры необходимо 2-3 г свежей рыхлой массы каллусных клеток на 60-100 мл жидкой питательной среды. Для отделения крупных агрегатов клеточную массу перед пересевом фильтруют через нейлоновые или металлические сита. Первичную суспензию культивируют в колбах с жидкой питательной средой на круговых качалках со скоростью 100-120 об./мин. В таких условиях обеспечивается аэрация тканей и нарастающая масса клеточных агрегатов распадается на отдельные фрагменты.

### **Фазы ростового цикла в периодической суспензионной культуре**

Ростовой цикл, или цикл выращивания - это период от помещения инокулюма (части суспензионной культуры) на свежую среду до следующего субкультивирования.

Суспензионная культура представляет собой популяцию отдельных клеток и небольших клеточных агрегатов, которые, в свою очередь, являются субпопуляциями, состоящими из нескольких клеток.

Модельная кривая роста суспензии имеет S-образную форму и включает: лаг-фазу, экспоненциальную фазу, стационарную фазу и фазу деградации (рис.1).

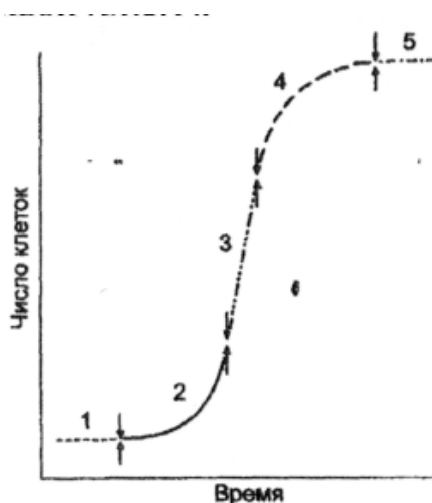


Рис. 1. Рост клеточной популяции при культивировании в накопительном режиме: 1 - латентная фаза; 2 - экспоненциальная фаза; 3 - линейная фаза роста; 4 - фаза замедления роста; 5 - стационарная фаза



Различают следующие фазы ростового цикла:

Латентная фаза (лаг-фаза). В этот период клетки не размножаются, отсутствует их видимый рост, но происходит активный процесс поглощения воды и питательных веществ.

Экспоненциальная (логарифмическая) фаза роста. Это ограниченный период в ростовом цикле периодической (накопительной) культуры, в ходе которого происходит экспоненциальное (логарифмическое) увеличение количества клеток за счет их интенсивного деления, и как следствие - увеличение сухого вещества.

Различают раннюю и позднюю экспоненциальные фазы. В течение ранней экспоненциальной фазы наблюдается ряд цитологических изменений: в клетках исчезает большая вакуоль, происходит увеличение объема цитоплазмы, увеличивается число полирибосом и митохондрий. Наряду с цитологическими изменениями имеет место и активация клеточного метаболизма: увеличивается содержание РНК, белка, ДНК, интенсивность поглощения кислорода. Все эти процессы приводят к активному делению клеток и образованию клеточных агрегатов.

В течение поздней экспоненциальной фазы роста суспензионной культуры наблюдается замедление клеточного деления, но происходит увеличение размера клеток. Таким образом, увеличение биомассы в этот период происходит в основном за счет растяжения клеток.

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

Фаза замедления роста (ранняя стационарная фаза). В этот период средний размер клеток продолжает возрастать, отмечается гетерогенность клеточной популяции и начало синтеза вторичных веществ.

Стационарная фаза. К этому периоду ростового цикла суспензионная культура достигает максимума сухого веса. В культуральной среде накапливаются продукты жизнедеятельности клеток, угнетающие рост культуры. Культуральная среда истощается по наличию основных компонентов, обеспечиваю-

щих азотное, фосфорное, углеводное питание. С тем чтобы не наступила гибель клеток, необходимо субкультивирование суспензионной культуры на свежую среду.

В среднем от начала культивирования до стационарной фазы роста проходит 21 -28 дней.

Продолжительность ростового цикла зависит от условий культивирования, исходной плотности, возраста инокулюма, состава и объема питательной среды, видоспецифичности исходной культуры

Форма реальных ростовых кривых отличается продолжительностью фаз. Это зависит от генетики популяции, количества инокулюма и состава питательной среды. Скорость нарастания биомассы колеблется от 15 до 70 суток. Истощение питательной среды и накопление продуктов жизнедеятельности клеток определяют необходимость обновления культурной среды или пересева культуры на свежую питательную среду.

Промышленное производство биологически активных веществ методом суспензионного культивирования представлено на рисунке 2.

В промышленных условиях используется метод непрерывного культивирования ферментерах (биореакторах) различной конструкций, имеющих конструктивные особенности, которые учитывают специфику растительных клеток. Метод основан на поддержании баланса между разбавлением среды и удалением части суспензии.

Если в культурную систему периодически добавлять свежую среду, то деление клеток может поддерживаться неограниченно долго. Это послужило основой для создания систем, позволяющих осуществлять непрерывное культивирование.

Культуральные системы, функционирующие непрерывно, разделяют на полупроточные и проточные. При полупроточном режиме выращивания через определённые интервалы времени производится отбор части суспензии свежей средой. Культивирование в ферментерах такого типа может продолжаться несколько месяцев.

Проточный режим культивирования позволяет осуществлять непрерывное снабжение культуральной системы свежей питательной средой с одновременным удалением равного объёма клеточной суспензии. В таком режиме автоматизированные ферментеры могут функционировать в течение нескольких лет.

Глубинное культивирование в ферментерах имеет ряд преимуществ по сравнению с твёрдофазным статическим способом:

- автоматически поддерживаются все необходимые параметры: температура, рН среды, степень аэрации, скорость работы мешалки и пр.;
- постоянный контроль содержания в культурной среде основных элементов питания;
- культуральная система периодически пополняется свежей питательной средой;
- постоянно осуществляется микробиологический контроль с целью предотвращения инфицирования и гибели культур;
- контроль активности роста и деления клеток;
- контроль образования БАВ.

Необходимо отметить, что для получения БАВ может использоваться не только биомасса клеток, но и культуральная среда. В некоторых случаях получают штаммы и клеточные линии, почти полностью выделяющие БАВ в культуральную среду, что значительно облегчает процесс их выделения из такого специфического вида сырья.

# Промышленное производство биологически активных веществ методом суспензионного культивирования



## Рисунок 2. Схема метода суспензионного культивирования.

Суспензии используют для получения важных химических веществ: органических кислот, ферментов, алкалоидов, красителей, белков, аминокислот, которые применяются в фармакологии, парфюмерии, пищевой и химической промышленности, сельском хозяйстве.

Суспензионные культуры имеют большое значение для генетики и особенно молекулярной биологии: из суспензионных клеток получают протопласты, необходимые для соматической гибридизации, генетической инженерии, а также для изучения метаболизма клеток.

### **7. Культура протопластов**

Впервые термин «изолированные протопласты» был предложен Д. Ханстейном в 1880 г. Изолированный протопласт - это содержимое растительной клетки, окруженное плазмалеммой. Целлюлозная стенка у данного образования отсутствует. Такая «голая» потенциально способна восстанавливать новую оболочку, делиться, образовывать клеточные агрегаты, из которых можно получить клеточную культуру с новыми свойствами, а затем новое растение – регенерант.

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

#### **Применение изолированных протопластов**

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

1. Изучение химии и структуры клеточной стенки (и при разрушении, и при синтезе «de novo»).
2. Изучение свойств плазмалеммы, трансмембранных перемещений.

3. «Мягкое» выделение органелл.

4. Наблюдение за закономерностями дифференцировки клеток при слиянии протопластов, отслеживание взаимодействия ядра и цитоплазмы в полученной гибридной клетке, изучение соматических гибридов.

5. Введение чужих органелл.

6. Введение чужеродных генов в растительную клетку (трансгенез).

### **Получение протопластов**

Впервые протопласты в 1892 г. выделил Дж. Клеркер, который использовал механический способ. При этом способе у плазмолированных клеток разрезают клеточную стенку, протопласты выходят в среду. В настоящее время метод улучшен, но имеет ряд ограничений:

- невысокая производительность;
- можно использовать ткани только с экстенсивным плазмолизом;
- трудоемкость и длительность.

Другой метод выделения протопластов - энзиматический, с использованием ферментов. В 1952 году Салтон с помощью фермента лизоцима впервые разрушил клеточную стенку бактерий. В 1960 году Коккинг обработал кончики корней томата гидролитическим ферментом из культуральной жидкости плесневых грибов (*Mucortheccium verrucaria*) и впервые получил изолированные протопласты высших растений энзиматическим способом.

Преимущества энзиматического метода по сравнению с механическим:

- одновременно выделяется большое количество протопластов (до 10 млн. из грамма ткани или клеток);
- клетки не подвергаются сильному осмотическому стрессу;
- клетки не повреждаются;
- метод сравнительно быстрый.

Для удаления клеточной стенки используют ферменты трех типов: целлюлазы, гемицеллюлазы и пектиназы. Комбинация ферментов и их соотношение специфично для каждого типа клеток.

Выделение протопластов проводят в три этапа:

- обработка ферментами;
- выделение протопластов из клеточных стенок;
- отделение интактных протопластов от клеточных осколков.

Стандартная методика получения протопластов (по Такебе) из тканей листа *Nicotiana tabacum* представлена ниже.

Зрелый, сформировавшийся лист отделяют от взрослого растения в возрасте 60 - 80 дней, окунают в 70% этанол, а затем помещают на 15 - 20 минут в 10% раствор гипохлорита кальция и многократно промывают дистиллированной водой. С помощью пинцета нижний эпидермис снимают, очищенные от эпидермиса листья разрезают скальпелем на небольшие кусочки площадью 4 кв. см. Для лучшего снятия эпидермиса листья должны немного подвять, можно также ограничить снабжение водой перед срезанием листьев.

Далее ткань обрабатывают последовательно или одновременно пектиназой, вызывающей мацерацию, и целлюлазой, разрушающей клеточные стенки. Оптимальная концентрация ферментов, как и время обработки, индивидуальны для разных тканей. Протопласты должны находиться в растворе ферментов минимальное количество времени, после чего следует тщательная промывка. Ферменты стерилизуют через бактериальные фильтры.

Регуляция водообмена клетки связана с наличием клеточной стенки. Когда протопласт "голый", один из компонентов регуляции водообмена теряется, поэтому важное значение приобретают осмотические свойства среды выделения и культивирования. Среда должна быть немного гипертонической, чтобы протопласты находились в слегка плазмолизированном состоянии. Эти условия тормозят метаболизм и регенерацию клеточной стенки. В качестве осмотических стабилизаторов используют сахара (глюкозу, маннит, сорбит, ксилозу), ионные осмотики ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{KCl}$ ) в концентрации 0,3 - 0,8 моль/литр. Концентрации подбираются индивидуально для каждого растительного объекта.

Удобнее обрабатывать ткани ферментами в чашке Петри, которую держат под углом 15°. Смесь ферментов с протопластами переносят в центрифужные

пробирки. Отделить протопласты от ферментативной смеси можно двумя способами: либо фильтрацией с центрифугированием, либо флотацией.

При фильтрации смесь пропускают через фильтры с размерами пор 40 мкм. На фильтре при этом остаются комки клеток и их большие осколки. При дальнейшем центрифугировании оседают протопласты, осколки остаются в супернатанте. При повторном центрифугировании идет отмывка от фермента, после чего протопласты переносятся в среду для культивирования.

Метод флотации предложен О. Гамборгом с сотрудниками в 1981 году, и предназначается для ослабленных протопластов. Он основан на том, что протопласты имеют более низкую плотность, чем органеллы или остатки клеточных стенок. К исходной смеси добавляют раствор сахарозы и центрифугируют при скорости от 40 – 80 до 350 г. Чистые протопласты плавают, осколки оседают на дно.

Протопласты можно выделять также из суспензионных и клеточных культур. Лучше всего - в поздней стадии логарифмического роста, когда клеточные стенки легче поддаются разрушению, протопласты наиболее жизнеспособны.

Далее протопласты культивируют в тех же условиях, что и клетки. Состав солей может быть несколько изменен. Среда состоит из осмотического стабилизатора, неорганических соединений, источника углерода, азота, витаминов, фитогормонов. Условия культивирования: рН среды 5,4 - 5,8; температура 22 - 28°C; невысокая освещенность (не более 2000 лк).

### **Способы культивирования протопластов**

Существуют два способа культивирования протопластов: метод жидких капель и метод платирования.

В первом случае суспензию протопластов в виде капель помещают на пластиковые чашки Петри. Вариацией этого способа является культивирование единичных изолированных протопластов в микрокаплях объемом 1 мкл, предложенное Ю. Глебой в 1978 г.



Во втором - суспензию протопластов наливают в пластиковые чашки Петри, добавляют равный объем той же среды с 1% агаром при температуре не выше 45°C. После остывания чашки Петри переворачивают и культивируют при 28°C. В данном случае протопласты фиксированы в одном положении и физически отделены друг от друга. Это дает возможность наблюдать за развитием интактного протопласта: формированием клеточной стенки, делением, ростом и развитием растения.

Вариантом этой техники является использование кормящих протопластов или клеток, подвергнутых воздействию рентгеновского или  $\gamma$ -излучения, что блокирует их способность к делению. Такие протопласты или клетки смешивают с жизнеспособными протопластами и они поддерживают и стимулируют их рост.

Сразу после удаления раствора фермента начинается образование клеточной стенки. Труднее добиться деления клеток и регенерации растений. Регенерация растений осуществляется либо через эмбриогенез, либо через развитие каллуса с дальнейшей индукцией морфогенеза. Добиваются этого добавлением в среду ауксинов или сочетания ауксинов с цитокининами.

На пролиферацию клеток, возникших из протопластов, влияет 4 фактора:

- видовая специфичность и физиологическое состояние исходной ткани растения;
- способ и условия выделения протопластов;
- плотность высева протопластов;
- состав питательной среды.

### **Слияние протопластов - соматическая гибридизация**

Изолированные протопласты, еще не образовавшие клеточной стенки, могут сливаться между собой. Слияние протопластов - своеобразный метод гибридизации, так называемая парасексуальная, или соматическая гибридизация. В отличие от обычной, где сливаются половые клетки (гаметы), при соматической гибридизации половая совместимость клеток исходных растений не

имеет существенного значения. Техника соматической гибридизации может позволить:

- объединение геномов клеток разных видов и родов, которое протекает только в искусственных условиях;
- получение асимметричных гибридов, несущих генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами, органеллами или цитоплазмой другого;
- слияние трех и более клеток;
- получение гибридов, представляющих сумму генотипов родителей;
- перевод мутаций в гетерозиготное состояние, что позволяет получать жизнеспособные формы при слиянии протопластов, поскольку мутагенез довольно часто дает дефектное по морфогенезу растение;
- получение растений, гетерозиготных по внеядерным генам и др.

Слияние бывает спонтанным (чаще у протопластов из молодых тканей или суспензионных культур) и индуцированным. Для стимуляции слияния протопластов предложен ряд методов, как физических, так и химических.

При физическом способе слияния протопластов, разработанном Г. Циммерманом с сотрудниками в 1981 году, протопласты помещают в камеру с неоднородным электрополем. На электродах образуются агрегаты из 2 - 3 протопластов, либо цепочки из 5 - 6 протопластов между электродами. Дополнительный единичный импульс постоянного тока приводит к образованию пор в сильно сжатых мембранах, происходит перетекание цитоплазмы, так как переменный ток удерживает протопласты вместе некоторое время, и протопласты в таких агрегатах сливаются. Затухающий ток приводит к возвращению сферической формы у слившихся протопластов.

В основе слияния лежит различное действие постоянного и переменного электрического тока на плазмалемму. Постоянное эклектическое поле сжимает мембраны, ведя к их локальному разрушению, а переменное электрополе вызывает латеральную диффузию белков мембраны, образуя свободные от гли-

копротеидов липидные области, где противоположные мембраны могут установить контакт.

Чаще для индукции слияния протопластов используют методику "ПЭГ - высокие значения рН - высокая концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ ", которая дает до 50% слившихся протопластов (рН 9 - 11, концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  100 - 300 ммоль/л). В присутствии полиэтиленгликоля наблюдается сильная адгезия протопластов, после удаления полиэтиленгликоля и добавления кальция - их слияние. Предполагают, что рН и ионы кальция увеличивают текучесть мембран, что связано с их жидкостно-мозаичной структурой.

При слиянии протопластов различных растений, например, А и В, могут с равной вероятностью образовываться комбинации АА, ВВ и АВ. Желаемый продукт слияния - АВ, поэтому разрабатываются способы увеличения частоты слияния именно такого типа и избирательного выделения только продукта слияния АВ. Один из таких методов заключается в следующем. Поверхность протопласта обычно несет отрицательный заряд. Путем обработки ее фосфолипидом, несущим положительный заряд, можно временно придать поверхности протопласта положительный заряд. Если теперь протопласты А, имеющие положительный заряд, смешать с необработанными протопластами В, несущими отрицательный заряд, то будут в основном образовываться комбинации АВ в результате притяжения разноименных зарядов.

Разработаны также методы маркирования протопластов того или иного растения с помощью разных флуоресцентных красителей. Если обработать протопласты одного растения флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), а протопласты другого растения родаминизотиоцианатом (RITC), то можно, не изменяя активности клеток, пометить их желто-зеленой (FITC) или красной (RITC) флуоресценцией. Гибриды, образовавшиеся путем слияния разных типов клеток, будут иметь оба цвета флуоресценции - желто-зеленый и красный.

Протопласты могут сливаться как попарно, так и в большем количестве. Многоядерные продукты слияния, как правило, разрушаются. Первое сообщение о получении соматических гибридов на уровне растений появилось в 1972

году (Карлсон и коллеги), в нашей стране подобное осуществили в лаборатории Бутенко Р.Г. в 1975 году.

Слияние протопластов приводит либо к образованию гибрида, либо к образованию цибрида. Соматический гибрид - продукт слияния и цитоплазмы, и ядра обоих протопластов. Цибрид (цитоплазматический гибрид) - растение-регенерант, содержащее цитоплазму обоих родителей и ядро одного из них. Цибриды получают, облучая перед слиянием один из протопластов  $\gamma$ -лучами для разрушения ядра. Скрининг таких клеток проводится по генам-маркерам ядерного и цитоплазматических (митохондриального и хлоропластного) геномов. Есть указания на рекомбинацию ДНК митохондрий и хлоропластов в гибридных клетках.

При слиянии могут образовываться и так называемые асимметричные гибриды – продукты слияния, имеющие полный хромосомный набор одного из партнеров и часть хромосом другого партнера. Такие гибриды часто возникают при слиянии клеток организмов, филогенетически удаленных друг от друга. В этом случае вследствие неправильных делений клетки, обусловленных некоординированным поведением двух разнородных наборов хромосом, в ряду поколений теряются частично или полностью хромосомы одного из родителей. Асимметричные гибриды бывают устойчивее, плодовитее и жизнеспособнее, чем симметричные, несущие полные наборы генов родительских клеток. В целях асимметричной гибридизации возможна избирательная обработка клеток одного из родителей для разрушения части его хромосом. Возможен прицельный перенос в клетку нужной хромосомы.

Гибриды могут быть получены путем слияния трех и более родительских клеток. Из таких гибридных клеток могут быть выращены растения – регенеранты.

Слиянием протопластов получен гибрид томата и картофеля – «томофель», гибриды некоторых лекарственных растений: дурмана индийского и белладонны, скополии гималайской и белладонны, гибрид двух видов дурма-

на, содержащий на 25% больше тропановых алкалоидов, чем родительское растение.

### **Конструирование клеток**

Протопласты широко используются также в качестве реципиентов для клеточных органелл. В 1973 году И. Потрикусс и Ф. Хоффман успешно трансплантировали изолированные ядра петунии в протопласты табака. Каким образом можно ввести ядро или другие клеточные органеллы в протопласт?

При использовании сэндвич-метода трансплантацию проводят в условиях слабого деплазмолиза протопласта. Перед введением протопласты и ядра обрабатывают лизоцимом, который модифицирует клеточную мембрану. Далее осуществляют попеременное осаждение ядер и протопластов центрифугированием. В результате центрифугирования в пробирках формируется несколько чередующихся слоев. Центрифужные пробирки заполняют раствором осмотика (маннита) без лизоцима и центрифугируют полчаса при 140 g, оставляют на 2 часа при температуре +4°C. Осадок ресуспендируют и просматривают под микроскопом. Ядра можно обнаружить и в цитоплазме, и в вакуолях. В некоторых случаях при поглощении ядра образуются жизнеспособные гибриды, в других - в клеточном цикле происходит потеря интеграции между чужеродным ядром и ядром хозяина.

Клеточные органеллы можно также переносить посредством упаковки в липосомы - таким способом переносят в протопласты чужеродную ДНК. Широкий спектр одно- и многоламелльных частиц, которые сливаются с мембранами протопластов, получен с применением таких веществ, как фосфатидилсерин, холестерол и т.д. Можно также переносить органеллы путем микроинъекций. Этот метод широко используется для введения в клетку ДНК, РНК, а недавно был успешно использован и для переноса клеточных органелл у растений.

Кроме ядра трансплантируют и другие органеллы, такие как митохондрии и хлоропласты. Выбор этих органелл объясняется их полуавтономностью, то есть наличием собственной ДНК и способностью делиться самостоятельно, не-

зависимо от деления самой клетки. Кроме того, эти органеллы контролируют важнейшие физиологические процессы растительной клетки, такие как фотосинтез и дыхание. Например, перенос хлоропластов может использоваться для выведения новых форм хозяйственно важных сортов растений. Трансплантация высокоэффективных хлоропластов может способствовать активации фотосинтеза и повышению продуктивности растения.

Одним из важных моментов является сохранение клеточных органелл, поэтому для переноса их в последнее время используются субпротопласты – фрагменты, полученные из протопластов. Они могут содержать большую часть цитоплазмы, но без ядра (цитопласты), ядро с небольшим количеством цитоплазмы (кариопласты), часть хромосом с небольшим количеством цитоплазматического материала (микропротопласты).

Биологическое конструирование на уровне клетки может оказаться полезным и перспективным для создания клеток, клеточных систем и целых растений, удовлетворяющих потребности человека. Под биологическим конструированием следует понимать не только введение отдельных органелл. Аналогичным образом в клетку можно вводить и чужеродный генетический материал как в виде фрагментов ДНК, так и в виде отдельных хромосом. Кроме того, в изолированные протопласты можно вводить клетки микроорганизмов, создавая искусственные ассоциации.

## **8. Использование метода культуры изолированных клеток и тканей в создании современных технологий.**

### **Синтез вторичных метаболитов**

Культуры клеток и тканей растений считаются потенциальным источником специфических вторичных метаболитов, к которым относятся такие соединения, как алкалоиды, стероиды, масла и пигменты. Многие из этих веществ до сих пор получают путем экстракции из растений. Не ко всем видам растений в настоящее время применимы методы микробиологической промышленности. За исключением некоторых видов растений, суспензионные и каллусные культуры клеток синтезируют вторичные метаболиты в меньших

количествах, чем целые растения. При этом рост биомассы в ферментере может быть значительным.

Биологически активные вещества принадлежат к продуктам вторичного обмена, которые называют вторичными метаболитами или вторичными продуктами биосинтеза. В настоящее время известно более 100000 вторичных метаболитов, продуцируемых растениями. Многие из них являются экономически важными продуктами и используются в фармакологической, косметической и пищевой промышленности (таблица 3).

Таблица 3

Промышленное использование некоторых растительных продуктов

Промышленное производство	Растительный продукт	Вид растения
1	2	3
Фармацевтические средства	Кодеин (алкалоид)	<i>Papaver somniferum</i>
	Диосгенин (стероид)	<i>Dioscorea deltoidea</i>
	Хинин (алкалоид)	<i>Cinchona ledgeriana</i>
	Дигитоксин (сердечный гликозид)	<i>Digitalis lanata</i>
	Скополамин (алкалоид)	<i>Datura stramonium</i>
	Винкристин (алкалоид)	<i>Catharanthus roseus</i>
Агрохимикаты	Пиретрин	<i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>
Производство продуктов питания	Хинин (алкалоид)	<i>Cinchona ledgeriana</i>
	Тауматин (халькон)	<i>Thaumatococcus danielli</i>
Косметические	Жасмин	<i>Jasminum sp</i>

Таблица 4

Десять наиболее употребляемых лекарственных веществ, получаемых из растений

Лекарственное вещество	Активность	Растение – источник
1	2	3
Стероиды из диосгенина	Противозачаточные средства	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Кодеин	Болеутоляющее	<i>Papaver somniferum</i>
Атропин	Антихолинэргическое	<i>Atropa belladonna</i> L.
Резерпин	Снижающее давление	<i>Rauwolfia serpentina</i> L.
Геосциамин	Антихолинэргическое	<i>Hyosciamus niger</i> L.
Дигитоксин	Тонизирующее сердечную деятельность	<i>Digitalis lanata</i> L.
Скополамин	Антихолинэргическое	<i>Datura metel</i> L.
Дигитоксин	Сердечно-сосудистые	<i>Digitalis purpurea</i> L.
Пилокарпин	Холинэргическое	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Хинидин	Антималерийное	<i>Cinchona ledgeriana</i>

Новым подходом, направленным на увеличение выхода вторичных метаболитов, является иммобилизация клеток и тканей растений, т. е. помещение их в определенный носитель или адсорбция в нем. Носитель с клетками помещают в питательную среду. Клетки остаются живыми. Они прекращают рост, но продолжают синтез метаболитов, выделяя их в среду.

Первая удачная попытка зафиксировать целые клетки была осуществлена в 1966 г. Мосбахом. Он зафиксировал клетки лишайника *Umbilicaria pustulata* в полиакриламидном геле. На следующий год Ван Вецель выращивал клетки эмбрионов животных, иммобилизованных на микрошариках ДЭАЭ (диэтиламиноэтил сефадекса, на основе декстрана). После этого клетки были иммобилизованы на разных субстратах. В основном это были клетки микроорганизмов.

Методы иммобилизации клеток делят на 4 категории:

1. Иммобилизация клеток или субклеточных органелл в инертном субстрате. Например, *Catharanthus roseus*, *Digitalis lanata* в альгинатных, агароз-



ных шариках, в желатине и т.д. Метод предполагает обволакивание клеток одной из различных цементирующих сред – альгинат, агар, коллаген, полиакриламид.

2. Адсорбция клеток на инертном субстрате. Клетки прилипают к заряженным шарикам из альгината, полистирола, полиакриламида. Метод применялся в экспериментах с животными клетками, а также клетками *Saccharomyces uvarum*, *S. cerevisiae*, *Candida tropicalis*, *E. coli*.

3. Адсорбция клеток на инертном субстрате с помощью биологических макромолекул (таких, как пектин). Применяется редко, есть сведения об экспериментах с различными линиями клеток человека, эритроцитами крови барана, адсорбированными на покрытой белком агарозе.

4. Ковалентное связывание с другим инертным носителем типа КМЦ. Очень редко применяется, известна удачная иммобилизация для *Micrococcus luteus*. В основном проводились эксперименты по иммобилизации клеток животных и микроорганизмов. В последнее время интерес к иммобилизации клеток растений значительно возрос, это связано с тем, что иммобилизованные клетки имеют определенные преимущества перед каллусными и суспензионными культурами при использовании их для получения вторичных метаболитов:

- многократное использование;
- четкое отделение биомассы от продуктов метаболизма;
- увеличение продолжительности культивирования на стадии активного биосинтеза;
- получение большего количества вторичных метаболитов;
- сокращение времени ферментации;
- увеличение срока работы клеток (иммобилизованные клетки с низкой скоростью роста способны к интенсивной выработке метаболитов).

Довольно часто синтез вторичных метаболитов в суспензионной культуре останавливается на промежуточных этапах, не доходя до необходимого продукта. Получение продукта возможно благодаря процессу биотрансформа-

ции. Сущность его состоит в изменении промежуточных метаболитов с помощью культур других растений или клеток бактерий. Биотрансформация очень эффективна в бактериальных клетках, поэтому растительные клетки используют, когда процесс не осуществляется в клетках микроорганизмов. Вводимые в эти культуры вещества могут подвергаться гидроксированию, эпоксицированию, гликозилированию, этерификации, а также присоединяться к аминокислотам. Например, культура клеток женьшеня корневого происхождения способна трансформировать (гликозилировать) фенольные соединения - продукты деятельности суспензионной культуры клеток корня *Panax ginseng*. Культуры клеток лебеды и картофеля могут биотрансформировать индолил-3-уксусную кислоту в индолил-3ацетил-L-аспарагиновую кислоту.

Еще один пример - биотрансформация карденолидов, гликозиды которых используют в медицине для лечения болезней сердца. Недифференцированные культуры клеток *Digitalis lanata* сами по себе не образуют сердечных гликозидов, но могут осуществлять реакции биотрансформации субстратов, добавленных в питательную среду. Растения наперстянки (*Digitalis lanata*) в большом количестве синтезируют дигитоксин вместо необходимого дигоксина. Для соответствующей биотрансформации с успехом используют недифференцированную суспензионную культуру наперстянки. Имобилизованные клетки этой культуры способны долгое время с постоянной скоростью трансформировать метилдигитоксин в метилдигоксин (за счет реакции 12-гидроксирования, катализируемой ферментом, находящимся в клетках *Digitalis lanata*).

Таким образом, использование суспензионных культур для синтеза вторичных метаболитов в промышленных масштабах имеет большие перспективы, и не только с точки зрения экономической выгоды получения более дешевой продукции в запланированных количествах. Важно, что использование культуры клеток спасет от уничтожения тысячи дикорастущих растений, ставших уже редкими, которые синтезируют необходимые человеку вещества. Увеличение выхода продукта может быть достигнуто благодаря дальнейшей

исследовательской работе по селекции специализированных популяций клеток и оптимизации условий культивирования. Большой интерес представляет также дальнейшее развитие методов биотрансформации метаболитов и иммобилизации культивируемых клеток.

## 9. Трансгенные растения

Трансгенными могут называться те виды растений, в которых успешно функционирует ген (или гены) пересаженные из других видов растений или животных. Делается это для того, чтобы растение реципиент получило новые удобные для человека свойства, повышенную устойчивость к вирусам, к гербицидам, к вредителям и болезням растений. Пищевые продукты, полученные из таких генноизмененных культур, могут иметь улучшенные вкусовые качества, лучше выглядеть и дольше храниться. Также часто такие растения дают более богатый и стабильный урожай, чем их природные аналоги.

Наиболее перспективные направления решения задачи защиты урожая от болезней и вредителей в последние два десятилетия связаны с успехами биотехнологий и генной инженерии — с созданием и производственным освоением трансгенных растений.

За 16 лет после создания первого трансгенного растения (ТГР) в 1983г. проведено более 40 тысяч опытов с 60 культурами более чем в 45 странах. В 1998 площади выращивания ТГР достигли 30 млн. га, а в 1999 — уже 40 млн. га, что превышает размеры такой страны как Великобритания.

Основным направлением биотехнологии растений остается повышение продуктивности с/х культур и их защита от различных биотических и абиотических стрессовых факторов.

На сегодняшний день сконструирован ряд хозяйственно-ценных ТГР, устойчивых к фитопатогенным микроорганизмам и вирусам. Созданы ТГР, устойчивые к насекомым и другим вредителям, в т.ч. к нематодам. При этом происходит успешное сокращение использования фунгицидов и инсектицидов. Так, например, выращивание трансгенного хлопчатника в Испании привело к

снижению использования пестицидов, способствовало повышению численности полезных организмов и росту урожайности на 2 ц/га.

Успешно развивается направление по созданию ТГР, устойчивых к гербицидам. В настоящее время получены ТГР важнейших с/х культур с повышенной устойчивостью к широкому ряду гербицидов: глифосату, сульфонмочевине, атразину, бромксинилу, биалафосу, 2,4-Д и др. Происходит все большее расширение посевных площадей под эти культуры. Так, например, в 1996 г соя, устойчивая к глифосату, выращивалась на 404 тыс. га, в 1997 — 3642 тыс. га, 1998г. — 11332 тыс. га. Кукуруза, устойчивая к глифосату, в 1998г выращивалась на 1618 тыс. га, в 1999 — на 20235 тыс. га.

Продолжаются работы по созданию ТГР с аллелопатическими свойствами, т.е. самостоятельно борющимися с сорняками, с помощью выработки растениями АХ (аллелохимикатов).

Ведутся работы по составлению карт генома культурных растений с целью их использования при клонировании генов, устойчивых к болезням и вредителям.

Первые генетически модифицированные продукты (ГМП) появились в продаже в США в 1994г. Это были томаты с замедленным созреванием, созданные фирмой "Calgen", а также гербицидоустойчивая соя компании «Monsanto». Уже через 1—2 года биотехнологические фирмы поставили на рынок целый ряд генетически измененных растений: томатов, кукурузы, картофеля, табака, сои, рапса, хлопчатника и др.

В США генетически модифицированные растения составляют сейчас ок. 50% посевов кукурузы и сои и более 30—40 % посевов хлопчатника. Это говорит о том, что генно-инженерная биотехнология растений уже стала важной отраслью производства продовольствия и др. полезных продуктов.

В ближайшие годы ожидается дальнейшее быстрое увеличение площадей занятых ТГР. Такой бурный рост во многом вызван необходимостью прокормить быстро увеличивающееся население планеты, которое к 2020 г. составит, согласно подсчетам, 7,7 млрд. чел. Для обеспечения себя продовольствием че-

ловечество должно увеличить к этому времени производство зерна минимум на 41%, мяса - на 63%, клубней и корнеплодов - на 40%. Обеспечить столь значительный подъем только с помощью традиционных агротехнических приемов, таких как увеличение площадей посадки, использование химических средств подкормки и защиты растений, выведение новых сортов путем классической селекции и т.д., представляется маловероятным. Поэтому, особые надежды возлагаются на генную инженерию, которая по сути продолжает направление традиционной селекции по улучшению генотипов полезных растений, но достигает тех же целей более эффективным и быстрым путем.

Помимо решения чисто практических задач, генетическая инженерия представляет ученым новые возможности для познания молекулярных процессов, определяющих рост, развитие и жизнедеятельность организмов. В настоящее время редкое крупное фундаментальное исследование физиологии и биохимии растений обходится без применения генной технологии. Генетическая инженерия позволяет прямым путем выяснить функцию изучаемых белков (ферментов) и соответствующих генов.

Таким образом, успехи биотехнологии и генной инженерии открывают громадные перспективы дальнейшего прогресса сельского хозяйства. В то же время, практическое использование результатов с/х биотехнологии сдерживаются сегодня опасением негативного воздействия ГМ-продуктов на окружающую среду и человека.

Однако, пока в Европе продолжается полемика относительно потенциальной опасности использования ТГР, последние уже принесли заметную пользу в тех странах, где они выращиваются в достаточно больших масштабах, в частности, благодаря значительному сокращению применения пестицидов.

Согласно оценкам на биобезопасность проведенными Институтом питания РАМН, нет никаких оснований считать, что ГМ-продукт (из сои или картофеля) вреднее или опаснее аналогичного традиционного. В то же время, в России вводится обязательная маркировка таких ГМ-продуктов, единственной

целью которой является более полное информирование покупателя о происхождении приобретенного товара. При ввозе в страну партии продовольствия (или фуража) импортер должен указать в сопроводительных документах наличие и конкретное содержание трансгенного ингредиента. И хотя существующие пока методы тестирования не способны выявлять все случаи примесей генетической модификации, имеющиеся в продуктах, тем не менее органы санитарного контроля оставляют за собой право проводить выборочную проверку таких деклараций.

По-прежнему наиболее сложным вопросом, связанным с интродукцией ТГР в атмосферу является неконтролируемый перенос генетической информации в окружающую среду. Несмотря на многочисленные исследования, этот вопрос пока не до конца разработан.

### **Трансгенные растения как биопродуценты белков медицинского назначения**

Успехи в области генетической инженерии растений открыли новые возможности для получения рекомбинантных белков. Для этой цели широко используются клетки бактерий, дрожжей, млекопитающих и насекомых. Однако такие системы имеют ряд существенных недостатков. В клетках прокариот не происходят посттрансляционная модификация и правильная укладка (фолдинг) полипептидных цепей многих эукариотических белков. Клетки дрожжей, млекопитающих и насекомых лишены подобных недостатков, но их использование в качестве биопродуцентов ограничено высокой себестоимостью выхода рекомбинантных белков.

По сравнению с вышеупомянутыми системами экспрессии растения имеют ряд особенностей и преимуществ. Прежде всего необходимо отметить, что в клетках высших растений происходят гликозилирование и фолдинг белков, сходные с таковым в клетках млекопитающих. Культивирование растений не требует дорогостоящего оборудования, а сельскохозяйственные масштабы продукции гарантируют доступность рекомбинантного препарата в количествах, достаточных для клинических испытаний и широкого терапевтического

использования. В отличие от животных, растительные клетки не содержат в своём составе патогенные для человека вирусы, а также прионы и, таким образом, могут служить безопасным источником рекомбинантных белков медицинского назначения. Хотя стоимость выделения и очистки целевого белка из растений-продуцентов может быть сопоставима с таковой для других систем, наработка сырого материала обходится значительно дешевле. В ряде случаев, например, при использовании трансгенных растений в качестве "съедобных вакцин" выделение белка в чистом виде не требуется. В дополнение ко всему перенос фрагментов экзогенной ДНК в растительный геном и регенерация у растений происходят значительно проще по сравнению с животными.

Известно, что аппарат транскрипции и трансляции у растений является универсальным и может быть адаптирован не только для накопления гомологичных белков, не синтезируемых данным видом растения, но и для синтеза гетерологичных белков как бактериального, так и животного происхождения. С другой стороны, сами растения *in vivo* могут служить благоприятной средой для развития различных организмов - бактерий и вирусов, геном которых может быть модифицирован и адаптирован для синтеза соответствующих гетерологичных белков. Анализируя данные литературы, необходимо отметить, что поиск различных систем для экспрессии чужеродных генов за последние десять лет был связан с развитием трёх основных подходов.

Первым из них был предложен путь использования трансгенных растений, в ядерный геном которых перенесены гены, контролирующие синтез соответствующих гетерологичных белков. Получение таких растений было основано на природной способности почвенной бактерии *Agrobacterium tumefaciens* переносить часть своей собственной ДНК в виде Т-области мегаплазмиды в растительные клетки. Именно эта часть Тi-плазмиды была использована учёными для переноса генноинженерных конструкций, включающих различные целевые гены. В качестве целевых можно было использовать и гены гетерологичных белков медицинского назначения. Необходимо отметить, что использование только агробактериального переноса

в значительной степени сужало круг растений-реципиентов и ограничивало его, как правило, до двудольных. Поэтому дальнейшее развитие идеи использования растительного генома для синтеза гетерологичных белков стимулировало поиск новых способов переноса фрагментов экзогенной ДНК в геном растений. Были разработаны методы прямой доставки чужеродных генов в растительный геном, такие, как микроинъекции, электропорация и методы биобаллистики. В этом случае для переноса использовалась очищенная плазмидная ДНК, в которой содержались генетические конструкции с целевыми генами.

При переносе в геном растения чужеродные гены, как правило, стабильно интегрируются и передаются потомкам в последующих поколениях согласно законам Менделя.

Хотя идея внедрения экзогенной ДНК в растительный геном для наработки соответствующих продуктов в растении представляется весьма перспективной, этот подход не лишен и некоторых недостатков. Среди них необходимо отметить низкий уровень экспрессии перенесенных генов, даже при использовании очень сильных промоторов. Содержание сывороточного альбумина человека в трансгенных тканях табака составило 0,02 % от суммарного белка. Ещё меньшие значения были получены для эритропоэтина (0,003 %) и  $\beta$ -интерферона (0,001%). Одной из причин этого, по-видимому, является увеличение скорости деградации мРНК чужеродного гена, когда её уровень достигает порогового значения. Этот механизм, возможно, служит одним из способов защиты растения от РНК-содержащих вирусов. Второй причиной низкого уровня продукции является протеолиз чужеродных белков в цитоплазме растительной клетки. Введение в полипептидную цепь целевого белка сигнальных последовательностей, направляющих его накопление в эндоплазматической сети или секрецию в апопласт, где частота протеолиза значительно ниже, позволяет достичь повышения продуктивности трансгенных растений в 100 раз. Экспрессия целевых белков в запасной ткани семян, где уровень биодеградации ниже, чем в обводнённых тканях (листья,



плоды), способствует повышению продуктивности на 2-3 порядка. Так, содержание химерного энкефалина человека в семенах трансгенного *Arabidopsis thaliana* составило 2,9 % от суммарного белка. Этого удалось достичь введением в полипептидную цепь энкефалина сигнальной последовательности глютелина (запасного белка риса), направляющей его транспортировку в компартменты накопления запасных белков. Химерный ген находился под контролем промотора гена глютелина, который направлял его тканеспецифичную транскрипцию в клетках запасной ткани семян. Интеграция чужеродных генов в ядерный геном растения сопряжена и с рядом проблем биобезопасности использования генетически модифицированных организмов. При получении трансгенных растений в сельскохозяйственных масштабах существует опасность утечки трансгена в окружающую среду (выход из-под контроля) в результате переопыления с близкородственными дикорастущими видами. Для повышения уровня биобезопасности рядом исследователей было предложено использовать для трансгенеза стерильные по мужской линии растения. Другой проблемой, возникающей при интеграции гетерологичных генов в ядерный геном растений, является вероятность "замолкания" трансгенов в последующих поколениях (сайленсинг). Вероятность сайленсинга резко возрастает при встраивании множества копий чужеродного гена на геном растения. Поэтому при создании трансгенных растений-биопродуцентов рекомбинантных белков среди трансформантов отбирают растения, содержащие только одну вставку чужеродного гена.

В связи с вышеперечисленными проблемами, возникающими при интеграции трансгенов в ядерный геном, весьма привлекательным представляется способ переноса экзогенной ДНК в геном хлоропластов. Хлоропласты - органеллы растительной клетки, содержащие зеленый пигмент хлорофилл, а также ряд других пигментов, принимающих участие в поглощении световой энергии и осуществлении фотохимических реакций. По форме и размерам хлоропласты высших растений достаточно однородны. Некоторая вариабельность наблюдается в отношении их числа в расчете на одну клетку, которое варьирует

от нескольких десятков до сотни и более. Каждый отдельный хлоропласт окружен двойной мембраной и имеет сложную внутреннюю структуру. В одной растительной клетке в среднем содержится от 5 до 10 тыс. копий хлоропластной ДНК, за счёт чего уровень экспрессии чужеродных белков достигает значений, сравнимых с уровнем экспрессии в *E. coli* (до 40 % от суммарного белка клетки). Однако в литературе встречаются только единичные работы по получению растений с генетически модифицированными хлоропластами. Это связано с чрезвычайной сложностью методов их трансформации и последующего отбора. Третий путь использования растений для накопления белков гетерологического происхождения основан на природной способности растительных вирусов проникать в клетки растений и колонизировать растительные ткани. На этой основе возникает реальная возможность модификации вирусного генома и адаптации его не только в качестве вектора для доставки в растения соответствующих генетических конструкций, но и в качестве матриц для транзientной экспрессии генов, кодирующих синтез белков, представляющих коммерческий интерес. Для заражения растительных тканей используются рекомбинантные (+)РНК-содержащие вирусы растений, несущие в составе своего генома транскрипт чужеродного гена. Скорость мультипликации вирусной РНК в растениях чрезвычайно высока, за счёт чего достигается высокая копияность транскриптов чужеродных генов в цитоплазме заражённых клеток. Поэтому продуктивность вирусной системы экспрессии в среднем на 2 порядка выше по сравнению со стабильной трансформацией растений.

В настоящее время широко используются два вида вирусов для продукции чужеродных белков в растениях: вирус табачной мозаики (ВТМ) и вирус мозаики коровьего гороха (ВМКГ). Вектор на основе РНК ВТМ использовался для получения ингибитора репликации ВИЧ  $\alpha$ -трихосантина в *Nicotiana benthamiana*. Для этого целевую последовательность, кодирующую  $\alpha$ -трихосантин, поместили под субгеномный промотор белка оболочки ВТМ. Спустя две недели после заражения рекомбинантный  $\alpha$ -трихосантин накапливался в листьях *N. Benthamiana* в количестве 2 % от суммарного белка. На ос-

нове ВМКГ удалось получить химерные частицы этого вируса с экспонированными на поверхности антигенными детерминантами ВИЧ1 (gp41). Для этого последовательность эпитопа gp41 была "сшита" с геном белка оболочки ВМКГ. Такие частицы обладали высокой иммуногенностью и были способны нейтрализовать инфекционные свойства ВИЧ1 *in vivo*. Сравнивая пути наработки гетерологичных белков в растительных тканях, необходимо отметить, что каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. В трансгенных растениях перенесенные гены стабильно встраиваются в геном и сохраняются в последующих поколениях, тогда как при интеграции генов в геном вирусов в зараженных вирусами растениях обеспечивается их временная (транзистентная) экспрессия. Накопление соответствующих белковых продуктов будет определяться периодом вегетации зараженного растения-хозяина. С другой стороны, преимуществом вирусного пути накопления белков в растениях является короткий период размножения вирусных частиц, простота инфицирования растений, а также широкий диапазон различных видов растений, которые могли бы быть использованы для этих целей.

Растения-продуценты антител. Цель иммунизации организма вакцинами - индуцировать продукцию антител на патогенный агент. Альтернативой такому подходу является метод пассивной иммунизации, основанный на введении готовых иммуноглобулинов. Широкое применение такого подхода долгое время было ограничено высокой стоимостью антител, получаемых традиционными способами. В 1989 г. была показана возможность сборки функционально активных иммуноглобулинов класса IgG и IgA из лёгкой и тяжёлой цепей в растениях табака. С того момента в нескольких крупных лабораториях мира были получены трансгенные растения-продуценты различных типов антител к эпитопам ряда патогенных агентов. К настоящему времени получены трансгенные растения табака, люцерны, пшеницы, риса и сои. Среди этих растений выделяются две группы: продуценты иммуноглобулинов к антигенам двух патогенных агентов (стрептококк и вирус простого герпеса второго типа) и антител, специфичных к раковому эмбриональному антигену и к IgG человека.

Анализируя уровень экспрессии перенесённых генов в геноме растений-биопродуцентов антител, можно отметить, что уровень продуктивности иммуноглобулина к поверхностному антигену *Staphylococcus mutants* в растениях табака оказался наиболее высоким и составил 500 мкг/г сырого веса. Такие антитела, выделенные из трансгенных растений табака, предупреждали развитие кариеса у пациентов при непосредственном нанесении их на зубную эмаль и не уступали по своим свойствам аналогичным антителам, получаемым из гибридомы мышей.

Иммуноглобулины к раковому эмбриональному антигену были получены в трансгенных растениях риса и пшеницы. Такие антитела используются в иммунотерапии онкологических заболеваний, а также для визуализации опухоли *in vivo*. Трансгенные растения рассматриваются как потенциальный недорогой источник иммуноглобулинов для медицинских и исследовательских целей. Конечная цена рекомбинантного белка складывается из стоимости наработки сырого материала и стоимости его выделения. Считается, что стоимость очистки приблизительно одинакова для всех систем, а различие обусловлено затратами при наработке сырого материала, которая в клетках млекопитающих и трансгенных животных гораздо выше.

Растения-продуценты субъединичных вакцин. Трансгенные растения-продуценты эпитопов болезнетворных агентов человека и животных получили название "съедобных вакцин". Механизм иммунизации такими вакцинами основан на антигенпредставляющей способности перитонеальных макрофагов тонкого кишечника млекопитающих. В кишечнике чужеродный белок, обладающий антигенными свойствами, распознается специальными М-клетками, которые широко представлены в толще слизистого эпителия. М-клетки транспортируют захваченный антиген к перитонеальным макрофагам и В-лимфоцитам, находящимся в лимфоидных образованиях тонкого кишечника (пейеровых бляшках). В результате презентации антигена на поверхности антиген-представляющих клеток происходит активация Т-лимфоцитов-хэлперов, которые в сочетании с антигеном активируют В-лимфоциты. Дифференциро-

ванные В-клетки выходят из лимфоидных фолликулов слизистой оболочки и поступают через общую циркуляцию в мезентеральные лимфатические узлы, где происходит их созревание и превращение в плазматические клетки, синтезирующие специфические к антигену антитела. Плазматические клетки способны снова мигрировать к слизистым оболочкам дыхательных путей, желудочно-кишечного и мочеполового трактов. Секреторные иммуноглобулины IgA транспортируются на поверхность слизистых оболочек, где они связываются с чужеродными агентами и препятствуют их проникновению в организм. Следует отметить, что мукозная вакцинация стимулирует как иммунный ответ слизистых оболочек - первого защитного барьера на пути патогенных агентов, так и общий иммунный ответ организма. К настоящему времени получены трансгенные растения табака, картофеля, люпина, салата, томатов, кукурузы, *A. thaliana* и люцерны, синтезирующие антигены различных инфекционных патогенов человека и животных. Первыми "съедобными вакцинами" были трансгенные растения табака и картофеля, экспрессирующие поверхностный антиген вируса гепатита человека HbsAg. Скармливание клубней картофеля-продуцента HbsAg мышам стимулировало развитие мукозного (слизистого) и общего гуморального иммунного ответа. Токсины, выделяемые энтеропатогенной *E. Coli* и холерным вибрионом, вызывают желудочно-кишечные расстройства у человека и животных и являются сильными оральными иммуногенами. При попадании в кишечник токсины вызывают продукцию специфических IgG и IgA иммуноглобулинов. Созданы трансгенные растения табака, картофеля и кукурузы, синтезирующие В-субъединицу энтеротоксина *E. Coli*. Была проанализирована степень протективности иммунитета, приобретенного мышами при оральной вакцинации трансгенным картофелем. Иммунизированные мыши обладали устойчивостью к действию орально вводимого токсина по сравнению с контрольной группой, потреблявшей нетрансгенные клубни, хотя уровень устойчивости был ниже, чем у мышей, иммунизированных введением в желудок эквивалентного количества В-субъединицы природного токсина. Полученные на животных моделях результаты по выработке защит-

ного иммунитета против энтеропатогенной *E. coli* были подтверждены в дальнейшем в клинических исследованиях на добровольцах. В аналогичной работе было показано развитие защитного иммунитета у мышей после скармливания клубней трансгенного картофеля, экспрессирующего В-субъединицу токсина *V. cholerae*. Иммунизация сопровождалась выработкой антител классов IgG и IgA. Не останавливаясь подробно на других антигенах, следует отметить, что практически во всех полученных растениях-продуцентах происходила сборка индивидуальных молекул антигена в мультимерные комплексы или вирусоподобные частицы, которые стимулировали развитие как мукозного, так и общего гуморального иммунного ответа при скармливании экспериментальным животным. Основные преимущества "съедобных вакцин" экономичность, безопасность и доступность для широкой иммунопрофилактики населения.

За последние несколько лет в ведущих биотехнологических центрах мира созданы трансгенные растения-продуценты широкого спектра гормонов, цитокинов, факторов роста и ферментов, имеющих потенциальное применение в фармакологии. Все они не уступали по биологической активности аналогам, получаемым из других систем экспрессии. По закону, принятому Всемирной организацией здравоохранения, любые предлагаемые источники лекарственных препаратов, в частности трансгенные растения, должны быть зарегистрированы и пройти серию клинических испытаний. Первые клинические испытания трансгенных растений риса, синтезирующих активный человеческий  $\alpha$ -1-антитрипсин для терапии фиброзного кистоза, были начаты в 1998 г. Производство рекомбинантных белков для медицинских целей с использованием традиционных систем требует значительных финансовых затрат. Так, например, недостаток лизосомального фермента гликоцереброзидазы в организме вызывает синдром Гоше. Единственным видом терапии этого заболевания является внутривенное введение гликоцереброзидазы. Долгое время этот белок получали из плаценты человека, на поддержание жизни одного пациента в течение года требовалось 160000\$. Переключение продукции гликоцереброзидазы на культуру клеток млекопитающих снизило стоимость этого препарата,

однако не вытеснило его из группы "самых дорогих лекарств в мире". В 1999 г. сотрудниками корпорации CropTech было показано, что трансгенные растения способны синтезировать биологически активную гликоцереброзидазу человека. В дальнейшем были получены высокопродуктивные трансгенные растения табака, в которых содержание гликоцереброзидазы человека варьировало от 1 до 10 % TSP. Ожидается, что получение рекомбинантной гликоцереброзидазы из таких растений позволит значительно снизить её стоимость. В заключение хотелось бы отметить, что, несмотря на значительные достижения в области продукции рекомбинантных белков медицинского назначения в растениях, это направление находится лишь на начальном этапе своего развития. Учёные-биотехнологи уверены, что в будущем рекомбинантные препараты, получаемые из генетически модифицированных растений, заменят дорогостоящие бактериальные и животные аналоги на фармацевтическом рынке. "Съедобные вакцины" позволят значительно усовершенствовать программы всеобщей иммунизации, особенно для населения развивающихся стран.

### **Тесты**

**1.** Объединение геномов клеток разных видов и родов возможно при соматической гибридизации:

1. только в природных условиях;
2. только в искусственных условиях;
3. в природных условиях и искусственных условиях.

**2.** Высокая стабильность протопластов достигается при хранении:

1. на холоду;
2. в гипертонической среде;
3. в среде с добавлением антиоксидантов;
4. в анаэробных условиях.

**3.** Полиэтиленгликоль ПЭ 4, вносимый в суспензию протопластов:

1. способствует их слиянию;

2. предотвращает их слияние;
3. повышает стабильность суспензии;
4. предотвращает микробное заражение.

4. Для протопластирования наиболее подходят суспензионные культуры:

1. в лаг-фазе;
2. в фазе ускоренного роста;
3. в логарифмической фазе;
4. в фазе замедленного роста;
5. в стационарной фазе;
6. в фазе отмирания.

5. Гибридизация протопластов возможна, если клетки исходных растений обладают:

1. половой совместимостью;
2. половой несовместимостью;
3. совместимость не имеет существенного значения.

6. Прямой перенос чужеродной ДНК в протопласты возможен с помощью:

1. микроинъекции;
2. трансформации;
3. упаковки в липосомы;
4. культивирования протопластов на соответствующих питательных средах.

7. Технологический воздух для биотехнологического производства стерилизуют:

1. нагреванием;
2. фильтрованием;



3. облучением.

**8.** Преимущество растительного сырья, получаемого при выращивании культур клеток перед сырьем, получаемым из плантационных или дико-растущих растений:

1. большая концентрация целевого продукта;
2. меньшая стоимость;
3. стандартность;
4. более простое извлечение целевого продукта.

**9.** Ауксины – термин, под которым объединяются специфические стимуляторы роста:

1. растительных тканей;
2. актиномицетов;
3. животных тканей;
4. эубактерий.

**10.** Превращение карденолида дигитоксина в менее токсичный дигоксин

(1,2-гидроксилирование осуществляется культурой клеток:

1. *Acremonium chrysogenum*;
2. *Saccharomyces cerevisiae*;
3. *Digitalis lanata*;
4. *Tolypocladium inflatum*.

## Терминологический словарь

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

**Анеуплоид** – ядро, клетки, организм с числом хромосом, отклоняющимся от  $X$  и от чисел, кратных  $X$ .

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

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

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

**Гаплоид** – ядро, клетки, организм, характеризующиеся набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственного виду (символ  $n$ ).

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

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

**Диплоид** – ядро, клетки, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленным числом, характерным для данного вида (символ  $2n$ ).

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

**Дифференцировка** – состояние специализации клеток, отличающее их от других.

**Доминант** – ген, проявляющийся как признак при условии, когда гомологичные наборы имеют разные гены.

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

**Изолированный протопласт** – растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного или механического разрушения.

**Инокулюм** – часть клеточной суспензии, используемая для переноса на свежую питательную среду.

**Каллус** – группа дедифференцированных клеток, возникших *in vivo* или *in vitro* путем неорганизованной пролиферации.

**Кариотип** – набор хромосом, характерных для данного вида.

**Клеточная селекция *in vitro*** – метод выделения мутантных клеток и соматоклональных вариаций с помощью селективных условий.

**Клон** – культура, возникшая из одной клетки.

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

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

**Культура изолированных протопластов** – выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризованной среде, содержащей в качестве дополнительного компонента осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации. При регенерации стенок изолированные протопласты превращаются в культуру клеток.

**Культура каллусов *in vitro*** – выращивание в длительной пересадочной культуре каллусов, возникших путем дедифференциации и пролиферации клеток, тканей, органов растений.

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

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

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

**Культура «привыкших» тканей** – выращивание тканей, возникших путем редифференциации или мутации клеток нормальных каллусных тканей, и способных расти на питательных средах без гормонов.

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

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

**Линия** – культура, возникшая из штамма путем селекции или клонирования, имеющая маркерные признаки.

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

**Моноплоид** – ядро, клетка, организм, характеризующиеся основным числом хромосом в полиплоидной серии (символ X).

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

**Мутация** – изменения в генетическом материале клеток путем перестройки ДНК ядер и органелл, изменений в структуре хромосом или уровне ploидности организма.

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

**Прион** – инфекционный агент белковой природы, вызывающий поражение головного мозга (энцефалопатии) человека и животных.

**Полиплоид** – ядро, клетки, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символ  $3X$ ,  $4X$  и т.д.).

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

**Псевдодиплоид** – ядро, клетки, организм, характеризующиеся диплоидным числом хромосом, отличающиеся от зигот данного вида по кариотипу.

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

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

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

**Рецессив** – ген или генетически обусловленный признак, проявляющийся в диплоидной клетке или организме при условии, когда оба набора хромосом несут данные гены.

**Ростовой цикл** – рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризующийся сигмоидальной (S-образной) кривой. Фазы ростового цикла: латентная (лаг-фаза), экспоненциальная (лог-фаза, фаза логарифмического роста), замедления роста, стационарная, деградации.

**Слияние изолированных протопластов** – формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

**Соматональные вариации и варианты** – фенотипическое выражение непостоянства ядерного и органелльных цитоплазматических геномов культивируемых клеток. От истинных генных мутаций отличаются большей частотой возникновения и комплексностью изменений (изменения в структуре генов, хромосом, геномов).

**Соматическая (парасексуальная) гибридизация** – способ создания гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений путем генетической рекомбинации хромосом и генов ядра и органелл вне сексуального цикла, например путем слияния изолированных протопластов.

**Соматический гибрид** – растение, полученное путем гибридизации изолированных протопластов.

**Субкультивирование** – процесс переноса транспланта или инокулюма в культуральный сосуд на свежую питательную среду.

**Субпротопласт** – изолированный протопласт, потерявший часть цитоплазмы, сохранивший ядро.

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

**Трансплант** – часть каллусной ткани, используемая для переноса на свежую питательную среду.

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

**Цибрид** – растение, полученное при слиянии изолированного протопласта с цитопластом, протопластом с инактивированным ядром или с энуклеированным протопластом.

**Цикл выращивания** – период от помещения клеточного инокулюма или каллусного транспланта на питательную среду до последующего субкультивирования.

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

**Цитопласт** – ограниченный мембраной участок цитоплазмы, возникший при фрагментации изолированного протопласта.

**Штамм** – культура, возникшая после первого субкультивирования, и состоящая из многих клеточных линий, возникших из клеток первичного каллуса.

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

**Эмбриогенез** – процесс образования зародышеподобных структур (эмбриоидов) неполовым путем в культуре тканей и клеток *in vitro*.

**Эпигенетические вариации** – фенотипическое выражение дифференциальной активности генов. От мутаций и соматических вариаций отличаются тем, что не сохраняются в цикле клетка-растение-клетка.

**Эпитоп** – антигенная детерминанта - химическая структура на поверхности сложнопостроенного антигена, в силу особенности своей конфигурации способна взаимодействовать с комплементарной ей структурой в составе антитела (паратопом), определяя тем самым специфичность данной серологической реакции.

**Эуплоид** – ядро, клетки, организм с числом хромосом, кратным  $X$ .

### **Ответы на тесты**

001-2

002-2

003-1

004-3

005-3

006-3

007-2

008-3

009-1

010-3

### **Список литературы**

1. Бутенко Р.Г. Рост и дифференциация в культуре клеток растений // Рост растений и природные регуляторы – М.: Наука, 1977.

2. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986.

3. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учеб. пособие – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.

4. Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений – Новосибирск: Наука, 1990.
5. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений – Киев: Наукова думка, 1984.
6. Егорова Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. Москва, «Академия», 2003.
7. Калинин Ф.Л., Бутенко Р.Г. Методы культуры тканей в физиологии растений – Киев: Наукова думка, 1980.
8. Калинин Ф.Л., Кушнир Г. П., Сарнацкая В.В. Технология микроклонального размножения растений – Киев: Наукова думка, 1992.
9. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений – М.: Наука, 1983.
10. Клеточная инженерия / Р.Г. Бутенко, М.В. Гусев, А.Ф. Киркин // Биотехнология. Т. 3. – М.: Высшая школа, 1987.
11. Лабораторно-практические занятия по сельскохозяйственной биотехнологии: Методические указания / Сост. Г.М. Артамонова, С.И. Герасимова, С.В. Дегтярев, Е.З. Кочиева, Д.В. Калашников, И.К. Блиновский, Л.И. Хрусталева. Под ред. акад. ВАСХНИЛ В.С. Шевелухи. Москва: Изд-во МСХА, 1991.
12. Микроразмножение и оздоровление растений в промышленном плодоводстве и цветоводстве / Сб. науч. трудов ВНИИГиСП – Мичуринск, 1989.
13. Муромцев Г.С., Бутенко Р.Г., Тихоненко Т.И., Порофьев М.И. Основы сельскохозяйственной биотехнологий. – М: Наука, 1990.
14. Пахомова В.М., Бунтукова Е.К. Методические указания и задания к лабораторно-практическим занятиям по биотехнологии сельскохозяйственных растений. Часть II. Казанская государственная сельскохозяйственная академия. Кафедра ботаники и физиологии растений. Казань, 2003 г.
15. Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.Л., Михалева Л.К., Белова Л.С. Основы фармацевтической биотехнологии, Издательство НТЛ, 2006 г.



16. Сазыкин Ю.О., Орехов С.Н., Чакалева И.И. Биотехнология. Москва, «Академия», 2006.

17. Сорокина И.К., Старичкова Н.И., Решетникова Т.Б., Гринь Н.А. Основы биотехнологии растений. Культура растительных клеток и тканей: Учебное пособие, 2002 г.

18. [www.bioprotect.kubannet.ru/content/transgen/Биологическая](http://www.bioprotect.kubannet.ru/content/transgen/Биологическая) защита растений. ВНИИБЗР.

19. [www.biotecchnolog.ru/pcell/pcell3\\_4htm](http://www.biotecchnolog.ru/pcell/pcell3_4htm) Кузьмина Н.А. Основы биотехнологии. 1995-2006.

20. [www.edu-zone.net/show//160843.ntm/](http://www.edu-zone.net/show//160843.ntm/) Трансгенные растения как биопродукты белков медицинского назначения.