

# Лекция 14 «КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ»

по учебной дисциплине  
«Основы биотехнологии»  
для специальности 1-31 01 01-02  
Биология (научно-педагогическая  
деятельность)  
3 курс 6 семестр

Учреждение образования  
«Брестский государственный  
университет имени А.С. Пушкина»

Биологический факультет

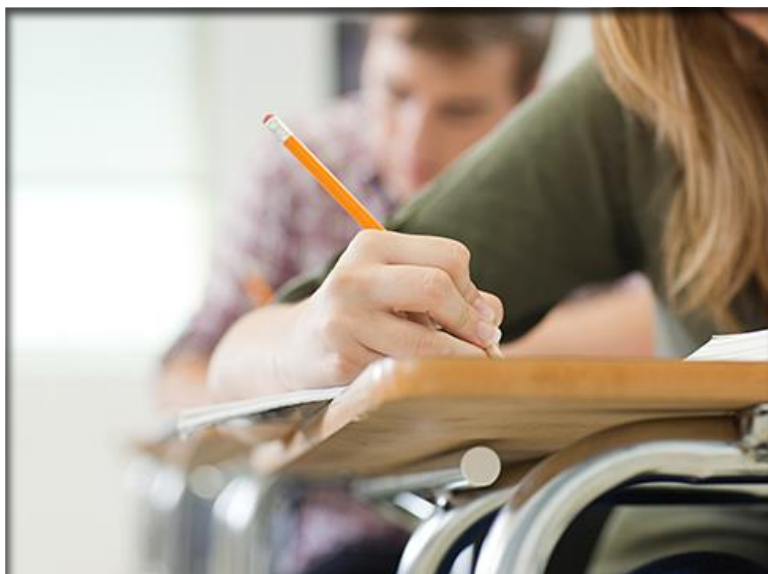
Кафедра зоологии и генетики

Контактные данные для  
консультирования

[lenivko@brsu.brest.by](mailto:lenivko@brsu.brest.by)

к.б.н., доцент  
**Ленивко Светлана  
Михайловна**

## Методические рекомендации по управляемой самостоятельной работе с использованием ИКТ



Ознакомьтесь с кратким  
конспектом лекционных  
вопросов



Составьте план изложения ответа  
на каждый вопрос и словарь  
основных терминов по лекции



Изучите дополнительную  
литературу, обобщите  
сведения в виде тезисов

**Клеточная инженерия растений** – одно из направлений биотехнологии, которое включает методологию культивирования в стерильных условиях *in vitro* на питательных средах изолированных клеток, тканей и органов растений, направленную на решение практических задач селекции.

Клеточная инженерия растений базируется на способности клеток к существованию и размножению вне организма (в условиях *in vitro*), их тотипотентности и регенерации.

# Вопрос 1. Техника культивирования изолированных клеток и тканей высших растений, примеры получаемых продуктов

Растительные клетки, в отличие от клеток животных, обладают свойством *тотипотентности*, на основании которого любая клетка, содержащая полный набор генов и обладающая одинаковыми потенциальными возможностями, подобно зиготе, может дать начало фертильному растению. Однако свойство тотипотентности не всегда реализуется, так как потенциальные возможности клеток разных типов проявляются неодинаково. В некоторых из них гены в сильной степени репрессированы, в связи с чем проявление тотипотентности становится ограниченным.

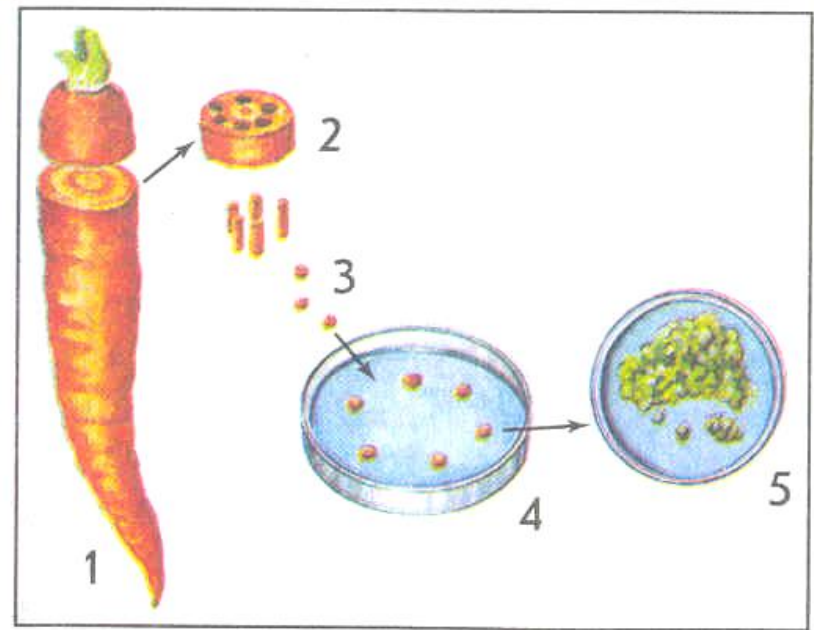
# История освоения техники культивирования клеток растений

I этап (1892–1902 гг.): Предприняты первые попытки культивирования растительных клеток в растворе сахарозы. Немецкий ученый Г. Хаберландт выдвинул гипотезу о **тотипотентности** любой растительной клетки, т.е. способности реализовать свой потенциал развития и давать начало образованию целого растения при определенных условиях культивирования.

II этап (1902–1922 гг.): Создание первых питательных сред для культивирования тканей животных.

**III этап (1922–1932 гг.):** Показана возможность культивирования на твердых питательных средах меристем кончиков корня томатов и кукурузы (В. Робинс и Котте).

**IV этап (1932– 1940 гг.):** Показана возможность долгого культивирования в условиях *in vitro* растительных тканей за счет **пассирования** (Р.Готре).



**Рис. 1.4. Культура тканей:**

**1** — корнеплод моркови; **2** — поперечный сегмент корня; **3** — фрагменты массой 2 мг; **4** — культивирование фрагментов на питательной среде; **5** — в результате деления клеток образуется каллус (клеточная масса).

V э т а п (1940–1960 гг.): Совершенствование состава питательных сред в связи с открытием фитогормонов, а также изучение их влияния на морфогенез растений.

VI э т а п (1960–1975 гг.): Разработка метода получения и культивирования изолированных протопластов из клеток корней и плодов томата (Э. Коккинг), метода слияния протопластов (Пауэр), метода микроразмножения растений для получения оздоровленного посадочного материала орхидей (Ж. Морель).

VII э т а п (1975 г. – по настоящее время): Развитие технических приемов работы с изолированными клетками и тканями различных видов растений.

# Техника культивирования изолированных клеток и тканей растений включает:

- изолирование **экспланта** от материнского растения;
- введение экспланта в культуру *in vitro*;
- культивирование экспланта в регулируемых условиях среды;
- реализация тотипотентности растительных клеток и **регенерация** растений.



Выделение **экспланта** (фрагмента ткани или органа) из интактного растения и переносе с соблюдением правил асептики на питательную среду, содержащую минеральные соли, сахара, витамины и фитогормоны, является основополагающим этапом культивирования клеток и тканей растений.

Источниками экспланта могут быть вегетативные и генеративные органы растения.



Используя методы *in vitro*, можно реализовать тотипотентность клетки и регенерировать высшее растение одним из двух путей.

Под **регенерацией** *in vitro* понимают восстановление растительного организма из его части (клеток, тканей и органов).

# ПУТИ РЕАЛИЗАЦИИ ТОТИПОТЕНТНОСТИ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ IN VITRO

## 1-й путь

## 2-й путь

- дедифференцировка клеток экспланта;
  - образование первичного **каллуса**;
  - индукция процессов **морфогенеза** в каллусных клетках;
  - **регенерация** растений.
- дедифференцировка клеток экспланта;
  - образование **соматических эмбриоидов** (зародышеподобных структур);
  - **регенерация** растений.

*Метод культивирования листовых эксплантов;*

*Метод культивирования почек*

*Метод культивирования пыльников*

**Дедифференцировка** – это потеря клеточных структур, выполняющих специфические функции, и возвращение дифференцированных клеток в меристематическое состояние, в котором они сохраняют способность к делению. Индукторами дедифференцировки и процессов деления клетки в условиях *in vitro* служат добавленные в питательную среду гормоны – ауксины и цитокинины.

Дедифференцировка начинается с использования запасных питательных веществ (крахмала, белков, липидов) и разрушения специальных клеточных органелл, в частности хлоропластов. Через 6–12 часов после индукции дедифференцировки клеточная стенка разрыхляется и разбухает, увеличивается число свободных рибосом, число элементов аппарата Гольджи, а также размеры и число ядрышек. В готовящейся к делению клетке стимулируется синтез всех видов РНК, начинается репликация ДНК, исчезают тканеспецифичные белки и появляются белки, характерные для делящихся клеток. Все эти изменения предшествуют началу делений, которые начинаются через 48–72 часа после индукции дедифференцировки. Клетка начинает делиться и образуется каллус. Образование клеток путем размножения – **пролиферация**.

**Каллус** (каллусная ткань) – это ткань, возникшая путем неорганизованной пролиферации клеток растений, утративших специализацию. Сам процесс образования каллуса называется **каллусогенезом**.

Каллусная клетка имеет свой цикл развития и повторяет развитие любой клетки (деление, растяжение, дифференцировка, старение, отмирание). Для того чтобы не происходило старение и отмирание каллусных клеток, через каждые 4–6 недель на свежую питательную среду переносят первичный каллус, возникший на эксплантах – фрагментах ткани или органа, которые были выделены и помещены на питательную среду. Эту операцию называют **пассированием**. При регулярном пассировании способность к делению может поддерживаться в течение десятков лет.

Каллусные клетки имеют много общего с нормальными клетками растений, входящими в состав растительного организма. Это подчинение общим закономерностям ростовой кривой, фотопериодическая реакция, сохранение ряда физиолого-биохимических свойств.

Специфические свойства каллусных клеток – физиологическая асинхронность, генетическая гетерогенность, более длительный клеточный цикл, усиление процессов брожения.

**Морфогенез** – это процесс формирования органов (органогенез), тканей (гистогенез) и клеток (цитогенез, или клеточная дифференцировка).

Данный процесс генетически обусловлен, а способность к реализации генетического потенциала зависит от степени дифференцировки клеток экспланта, взятого для получения каллусной культуры. Кроме того, процесс развития растения из соматической клетки носит вероятностный характер и может начаться только при совпадении целого ряда обстоятельств: способности генотипа к индукции морфогенетических процессов в культуре *in vitro*; компетентности конкретной культивируемой клетки принять сигнал к перестройке программы развития и ответить на него; эпигенетическое состояние клеток, зависящее от характера ткани, из которой культивируемые клетки были получены.

На реализацию наследственных возможностей к морфогенезу значительное влияние оказывают факторы культивирования *in vitro* (трофические азотсодержащие вещества, фитогормоны, условия освещения).

## Вопрос 2. Клеточные технология *in vitro* в селекции растений. Клеточная селекция. Гибридизация соматических клеток растений.

Клеточные технологии *in vitro* в селекции растений используются для решения ряда практических задач:

- А. ускорение традиционного селекционного процесса;
- В. расширение генетического разнообразия исходного материала;
- С. получение ценные для медицины, парфюмерии, косметики вещества вторичного синтеза (алколоиды, стероиды, гликозиды, гормоны, эфирные масла и др.).

## А. Технологии, ускоряющие традиционный селекционный процесс

- оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости)
- культивирование семяпочек и незрелых гибридных зародышей (преодоление постгамной несовместимости)
- получение гаплоидов путем культивирования пыльников и микроспор
- криосохранение изолированных клеток, тканей и органов
- клональное микроразмножение отдаленных гибридов

## **В. Технологии, расширяющие генетическое разнообразие исходного материала**

- клеточная селекция
- соматическая гибридизация (слияние изолированных протопластов и получение неполовых гибридов)
- применение методов генной инженерии.



# КЛЕТОЧНАЯ СЕЛЕКЦИЯ

Представляет собой отбор естественных или индуцированных мутантов *in vitro* на клеточном уровне в селективных условиях с последующей регенерацией растений.

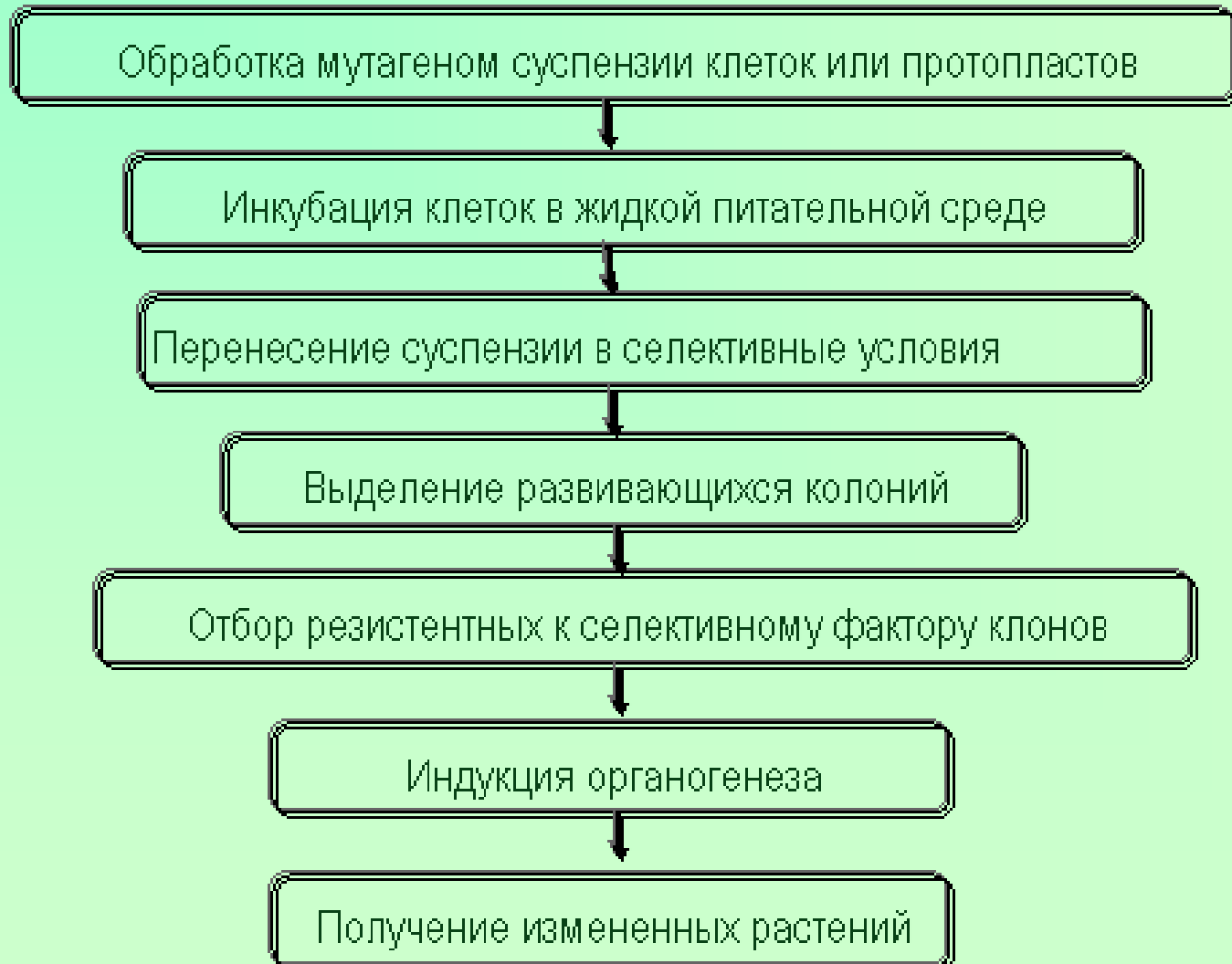
**Практическое значение** заключается в создании форм растений, устойчивых к неблагоприятному действию факторов внешней среды, таких как низкие температуры, засоление почв, загрязнение природной среды токсическими веществами, поражение вредителями и возбудителями болезней.

**Селективные агенты:** антибиотики, ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований, фито- и патотоксины, агенты, вызывающие солевой и водный стресс, аналоги аминокислот и т.д.

### **Приемы клеточной селекции:**

- прямая (позитивная) селекция;
- непрямая (негативная) селекция;
- тотальная селекция;
- визуальная селекция и неселективный отбор.

# Схема получения мутантных форм путем клеточной селекции (по В.И. Артамонову, 1989)



# Преимущества метода клеточной селекции *in vitro*

*(по сравнению с экспериментальным мутагенезом на уровне целых растений )*

- ✓ экономится площадь, так как в одной чашке Петри диаметром 9 см можно культивировать  $10^7 - 10^8$  клеток, а для такого же количества растений необходима площадь свыше тысячи гектаров;
- ✓ мутантные признаки на уровне отдельных клеток проявляются довольно быстро;
- ✓ возможно получение новых типов мутаций, в том числе и биохимического характера;
- ✓ экономится время и трудозатраты на получение нового желаемого признака.

# Микроклональное размножение - размножение растений *in vitro*

- Преимущества перед традиционными способами размножения растений:
  - получение генетически однородного посадочного материала;
  - освобождение растений от вирусов; высокий коэффициент размножения (от  $10^4$  для хвойных до  $10^6$  - для травянистых растений);
  - сокращение продолжительности селекционного процесса; ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
  - размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
  - возможность проведения работ в течение всего года;
  - возможность автоматизации процесса выращивания.

# ЭТАПЫ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ

- 1. Выбор растения-донора, изолирование эксплантов и получение хорошо растущей стерильной культуры.**
- 2. Собственно микроразмножение, когда достигается получение максимального количества меристематических клонов.**
- 3. Укоренение размноженных побегов с последующей адаптацией их к почвенным условиям.**
- 4. Выращивание растений в условиях теплицы и подготовка их к реализации или посадке в поле.**

# СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

## Основная:

1. Ленивко, С.М. Основы биотехнологии : учеб.-метод. комплекс / С.М. Ленивко, Ю.В. Кирисюк; Брест. гос. ун-т им. А.С. Пушкина. - Брест: БрГУ, 2018. - 92 с.
2. Биотехнология. Биобезопасность. Биоэтика / А. П. Ермишин [и др.]; под ред. А. П. Ермишина. – Минск : Тэхналогія, 2005. – 430 с.
2. Гончаренко, Г. Г. Основы генетической инженерии : учеб. пособие / Г. Г. Гончаренко. – Минск : Выш. шк., 2005. – 183 с.
3. Егорова, Т. А. Основы биотехнологии : учеб. пособие для высш. пед. учеб. заведений / Т. А. Егорова, С. М. Клунова, Е. А. Живухина – М. : Академия, 2003. – 208 с.
4. Картель, Н. А. Биотехнология в растениеводстве : учебник / Н. А. Картель, А. В. Кильчевский. – Минск : Тэхналогія, 2005. – 310 с.
5. Основы генетической инженерии и биотехнологии: учеб.-метод. рекомендации / сост. С. М. Ленивко ; Брест. гос. ун-т им. А. С. Пушкина, каф. зоологии и генетики. – Брест : Изд-во БрГУ, 2006. – 42 с.
6. Рыбчин, В. Н. Основы генетической инженерии : учеб. пособие для вузов / В. Н. Рыбчин. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб : СПбГУ, 2002. – 522 с.
7. Рыбчин, В. Н. Основы генетической инженерии : учеб. пособие для вузов / В. Н. Рыбчин. – Минск : Высш. шк., 1986. – 186 с.
8. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник / В. С. Шевелуха [и др.] ; под ред. В. С. Шевелухи. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Высш. шк., 2003. – 469 с.
9. Сельскохозяйственная биотехнология : учебник / В. С. Шевелуха [и др.] ; под ред. В. С. Шевелухи. – М. : Высш. школа, 1998. – 416 с.

•

## Дополнительная:

10. Бирюков, В. В. Основы промышленной биотехнологии : учеб. пособие / В. В. Бирюков. – М. : КолосС, 2004. – 296 с.
11. Глик, Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Дж. Пастернак ; пер. с англ. Н. В. Баскаковой [и др.] ; под ред. Н. К. Янковского. – М. : Мир, 2002. – 589 с.
12. Ермишин, А. П. Генетически модифицированные организмы : мифы и реальность / А. П. Ермишин. – Минск : Тэхналогія, 2004. – 118 с.
13. Коничев, А. С. Молекулярная биология : учебник / А. С. Коничев, Г. А. Севастьянова. – 4-е изд., перераб. и доп. – М. : Академия, 2012. – 400 с.
14. Ксенофонтов, Б. С. Основы микробиологии и экологической биотехнологии : учеб. пособие / Б. С. Ксенофонтов. – М. : ИД «ФОРУМ» : ИНФРА-М, 2017. – 224 с.
15. Ленивко, С.М. Технология введения в культуру и методы культивирования клеток, тканей, органов растений на примере пшеницы : метод. рекомендации / С. М. Ленивко ; Брест. гос. ун-т им. А. С. Пушкина. – Брест : БрГУ, 2013. – 46 с.
16. Основы сельскохозяйственной биотехнологии / Г. С. Муромцев [и др.]. – М. : Агропромиздат, 1990. – 384 с.
17. Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия / Р. Шмид ; пер. с нем. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2016. – 325 с.



**Ленивко, С.М. Основы биотехнологии : учеб.-метод. комплекс /  
С.М. Ленивко, Ю.В. Кирисюк; Брест. гос. ун-т им. А.С. Пушкина. -  
Брест: БрГУ, 2018. - 92 с.**

**УДК 60(075.8)  
ББК 28.087:30.16  
ISBN 978-985-555-847-8**



**Форма контроля  
выполнения заданий**

**Отчет о  
выполнении  
(см. слайд 2)  
сдать на кафедру  
до 05.06.2020**