

ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ. РАСТЕНИЯ.

Лекция 8



Словарь



Фитогормоны – регуляторы роста и развития растений

Апикальная меристема – группа образовательных клеток, обеспечивающая образование всех органов и первичных тканей

Эксплант – группа клеток, отделенная от материнского организма

Пыльник – содержащая пыльцу часть тычинки цветковых растений

Соматический (неполовой) эмбриогенез – процесс формирования зародышеподобных структур из соматических клеток

Андрогенез – развитие яйцеклетки с мужским ядром, принесённым в неё спермием в процессе оплодотворения



КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. РАСТЕНИЯ. Лекция 8

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ. Термин.



**совокупность методов и подходов,
используемых для конструирования
клеток нового типа**

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ.

Методы



КУЛЬТИВИРОВАНИЕ

- методы сохранения (*in vitro*) и выращивания в специальных питательных средах клеток, тканей, небольших органов или их частей

ГИБРИДИЗАЦИЯ

- методы получения гибридов соматических клеток неродственных и филогенетически отдаленных видов

РЕКОНСТРУКЦИЯ

- методы внедрения в соматическую клетку отдельных клеточных органелл, ядра, цитоплазмы (частичная гибридизация)



КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. РАСТЕНИЯ. Лекция 8

ИСТОРИЯ ВОПРОСА

История вопроса



1 этап (1882-1902 гг.)

Г. Фехтинг (1892), К. Рехингер (1893), Г. Габерландт (1902) высказали идею о возможности культивирования растительных клеток вне организма.
Культивирование растительных тканей *in vitro*.
Каллусообразование..



Hermann Vöchting



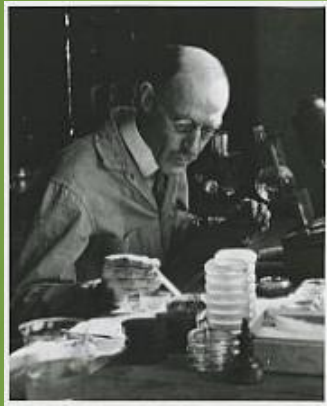
Karl Rechinger



Gottlieb Haberlandt

Г.Габерландт выдвинул гипотезу о тотипотентности растительной клетки

История вопроса

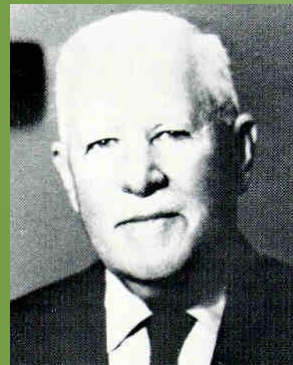


Ross Harrison

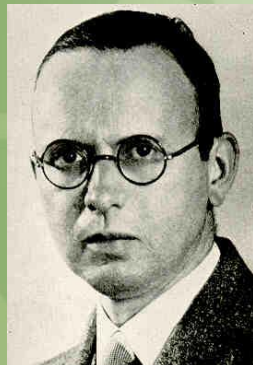


Aleksis Carrel

2 этап (1902-1922 гг.)
Р.Харрисон (1907), А.Каррел (1911)
эксперименты по культивированию
in vitro тканей животных



American Robbins



German Kotte

3 этап (1922-1932 гг.)
А.Роббинс (1922), Г.Котте (1922)
культивирование меристем корней
томата на твердой синтетической
среде

История вопроса



Roger Gautheret

НЕТ
ФОТО

Philip White



4 этап (1932-1940 гг.)

Р.Готре (1932) получил каллусы из древесных растений

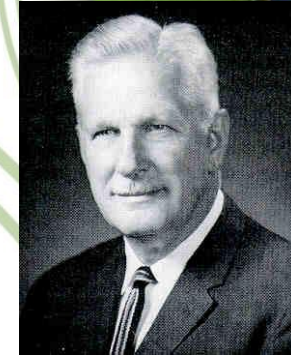
Ф.Уайт (1932) показал неограниченный рост растительных опухолей при пересадках на свежие среды

История вопроса

5 этап (1940-1960 гг.)

Ф.Скуг и К.Миллер (1955)

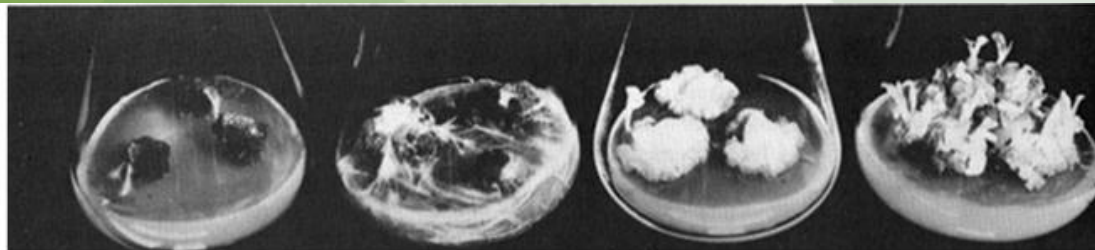
открыли фитогормоны цитокинины,
стимуляторы деления клеток
растений



Folke Skoog



Carlos Miller



IAA:	2	2	2	2 mg/L
kinetin:	0	0.02	0.2	0.5 mg/L

<http://labs.bio.unc.edu/>

Miller and Skoog demonstrate that the ration of
auxin:cytokinin alters organogenesis *in vitro*

История вопроса

6 этап (1960-1975 гг.)

Э.Кокинг получил клетки без клеточной
стенки (протопласты) из плодов и
корней томата

Дж.Пауэр (1955)

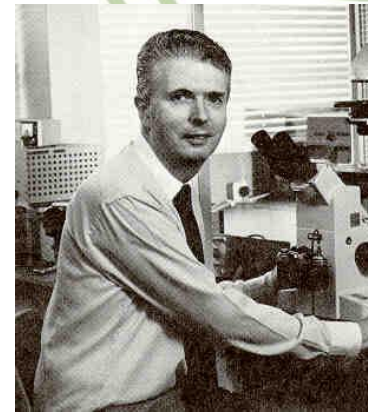
стимулировал слияние протопластов

НЕТ
ФОТО

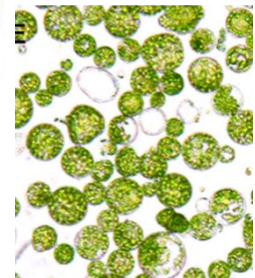
J.B. Power



Somaclonal variation



Edward C. Cocking



История вопроса

Раиса Григорьевна Бутенко
основала школу биологии
растительной клетки в России и
разрабатывала технологию
микрклонального размножения
растений *in vitro*





КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. РАСТЕНИЯ. Лекция 8

КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Области применения



Сельское хозяйство

- Микрорепродуцирование
- Оздоровление

Медицина и фармакология

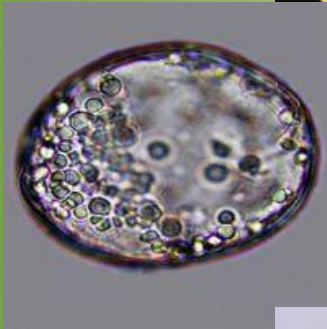
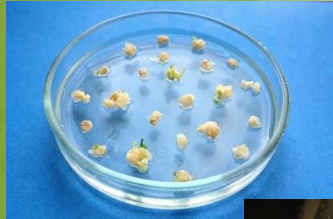
- Биосинтез
- Биотрансформация

Охрана ОС

- Фиторемедиация
- Биотопливо



Растительные культуры



Культура каллусных клеток

выращивают на твердой питательной среде

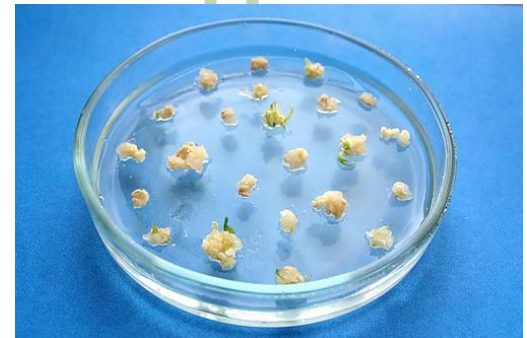


Получение:

образование и рост регулируется фитогормонами:
ауксины вызывают процесс дедифференцировки
цитокинины – пролиферацию клеток.

Характеристика:

- тотипотентность
- дедифференцированность
- асинхронность деления
- генетическая гетерогенность



Фитогормоны



ауксины

ИУК

индолил-3-уксусная кислота

ИМК

индолил-3-масляная к-та

НУК

нафтилуксусная кислота

ЦИТОКИНИНЫ

КИНЕТИН

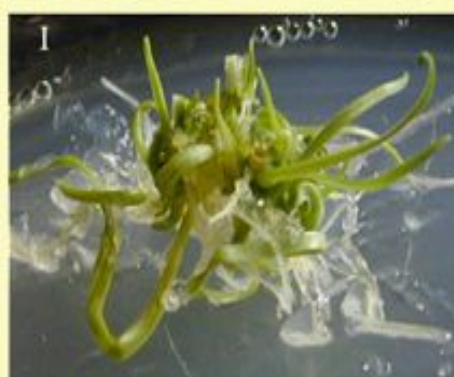
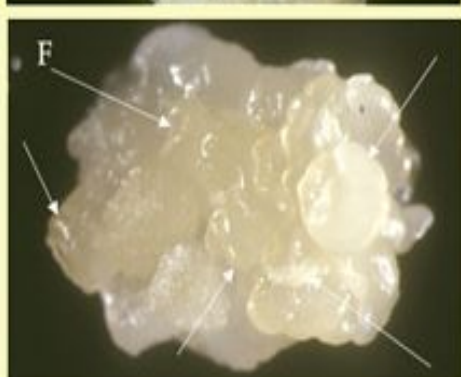
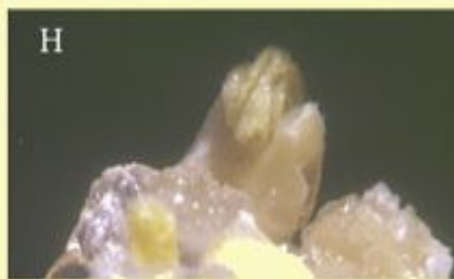
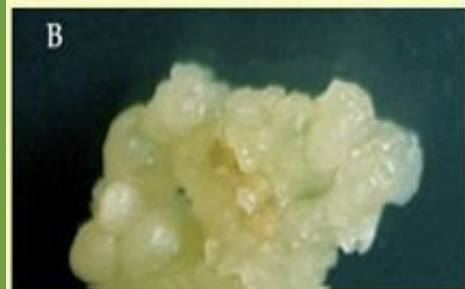
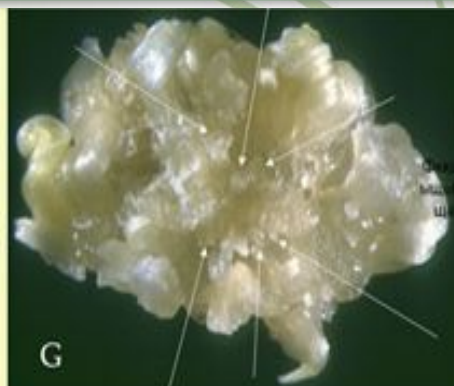
6-фурфуриламинопурин

NN-дифенил-мочевина

6-БАП

6-бензиламинопурин

Индукция каллуса и соматический эмбриогенез в культуре ткани пшеницы



А. Индукция каллуса из зрелых семян

В. Индукция каллуса из незрелых соцветий

С-Ф Формирование соматических эмбрионов (показаны стрелками)

(C) after 15 days of culture,

(D) after 12 days of culture,

(E) after 25 days of culture,

(F) after 20 days of culture.

Г. Длительно культивируемый каллус (2,5 мес) с признаками вторичного эмбриогенеза

Н. Развитие соматического эмбриона

И. Формирование растений из соматических эмбрионов через 1,5 месяца после инициации каллусогенеза

Суспензионная культура



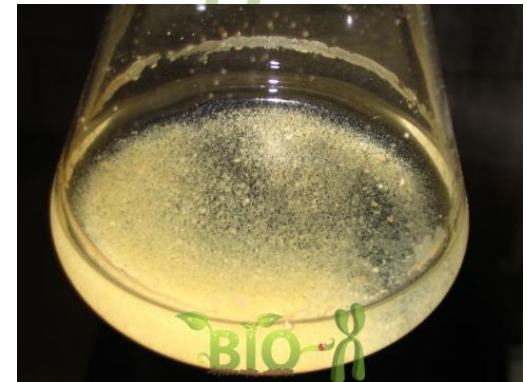
выращивают в жидкой питательной среде

Получение:

из каллуса или интактного растения (экспланта) путем переноса в жидкую питательную среду, при перемешивании и исключении солей Са

Характеристика:

типичные каллусные клетки



Культура одиночных клеток



«ПОТОМСТВО» одной клетки

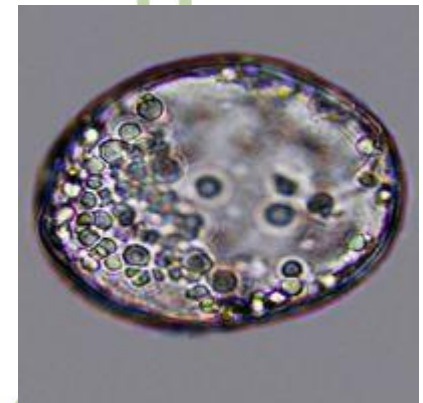
Получение:

из каллуса, экспланта, протопласта и др.

- 1) изолирование неповрежденной клетки растительной или каллусной ткани
- 2) создание условий, благоприятных для роста и развития изолированной клетки

Характеристика:

генетическая гомогенность



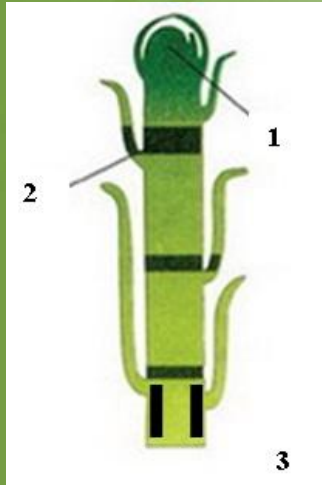
Меристематическая культура



Получение:

из конусов нарастания побегов, корней, пазушных почек и др.

**на питательные среды высаживают
небольшую часть меристемы до 0,5 мм**



1 – апикальные (верхушечные)

2 – интеркалярные (вставочные)

3 – латеральные (боковые)

Характеристика

- способность к делению
- высокая метаболическая активность

Апикальная меристема лилейника



Рисунок из книги Широков А.И., Крюков Л.А.
«Основы биотехнологии растений», 2012

Культура пыльников

базируется на использовании андрогенеза *in vitro* (получение гаплоидных растений на искусственных питательных средах из изолированных пыльников и микроспор)

Получают

из незрелых пыльников, в которых пыльцевые зерна находятся в стадии, предшествующей первому делению микроспор на вегетативное и генеративное зерна.



<http://bio-x.ru/>



требования к выращиванию биообъектов в культуре *in vitro*



Асептика – автоклавирование, фильтрация через бактериальные фильтры, ультрафиолетовое – облучение, дезинфекция и введение антибиотиков

Сбалансированность питательных сред – удовлетворение всех потребностей культуры. Обязательные компоненты – фитогормоны.

Условия – слабая освещенность или полная темнота, температура, аэрация, влажность.

Практическое применение



ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ *Культур клеток и тканей растений*

**Биосинтез и
биотрансформация
для получения
ценных веществ**

**Микроклональное
размножение и
оздоровление
растений**

**Создание
растений с
ценными
свойствами**

Схема 1. Основные направления практического применения клеточной инженерии растений

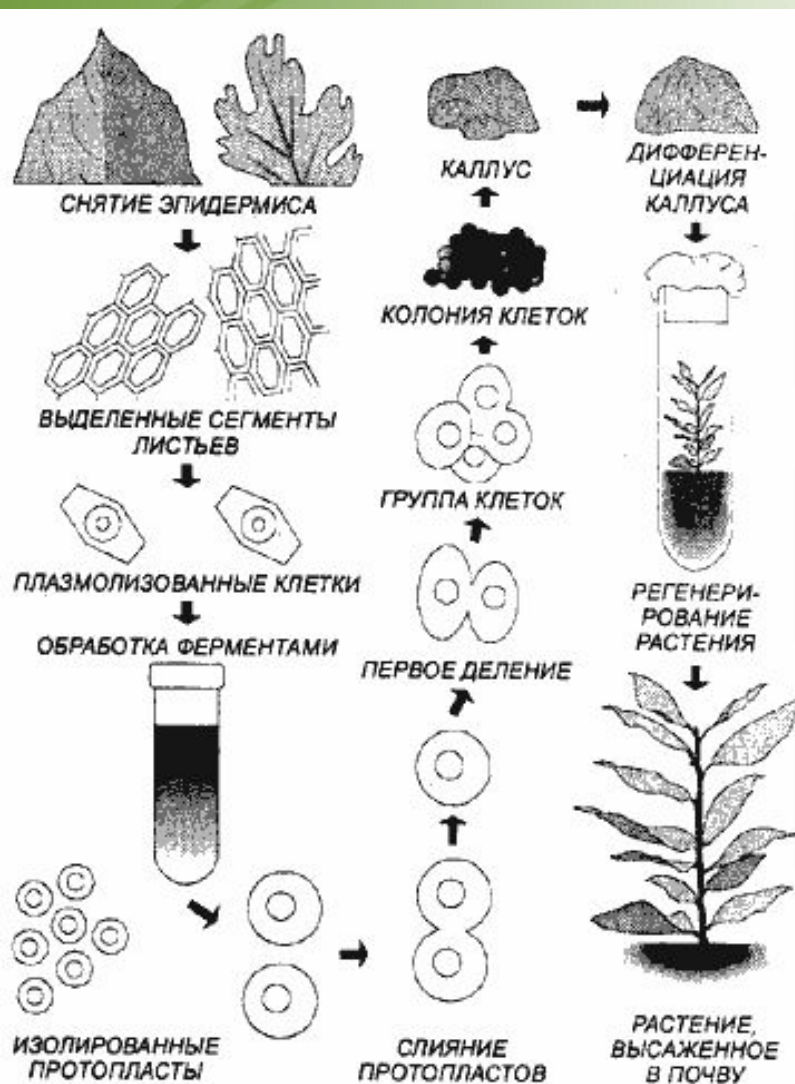
Микроклональное размножение и оздоровление растений



НЕПОЛОВОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ РАСТЕНИЙ

Основа метода: тотипотентность растительных клеток, то есть способность полностью реализовывать потенциал развития «клетка – целое растение».

Этапы клонального микроразмножения растений



1

- введение в культуру *in vitro*, стимулирование эксплантата к дальнейшему развитию

2

- размножение микроклонов
- ризогенез вновь образованных *in vitro* побегов

3

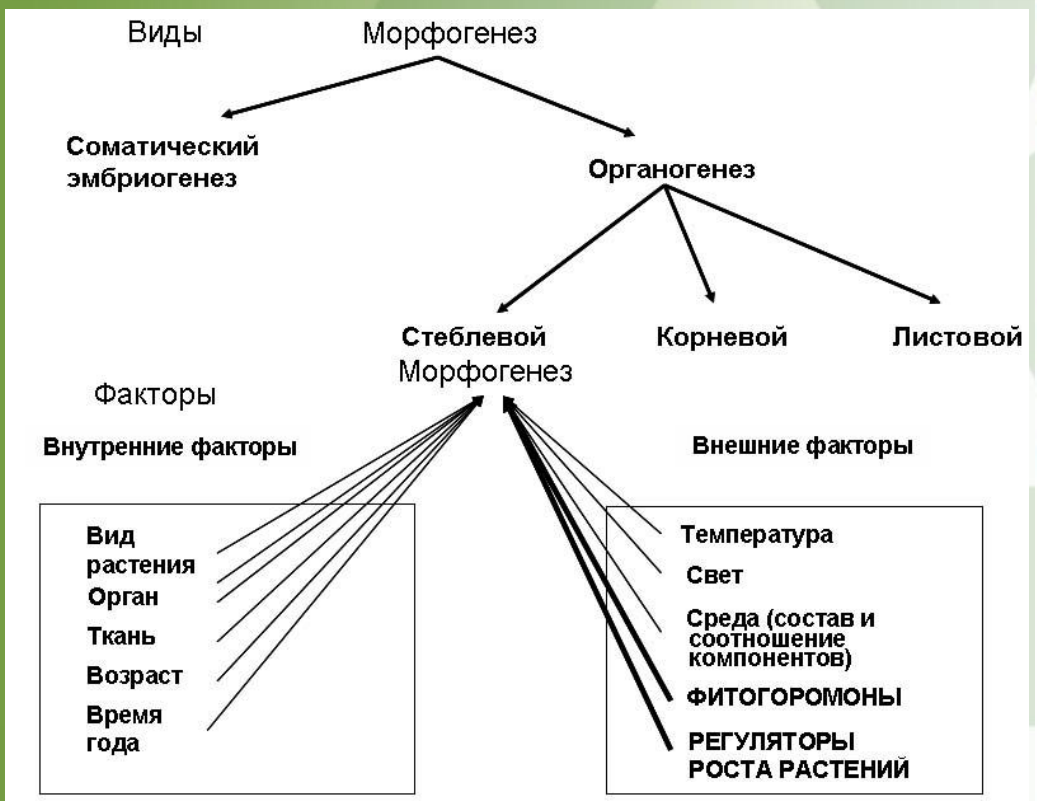
- акклиматизация микроклонов к нестерильным условиям

Регенерация растений из культуры тканей. Методы.



Эмбриоид – зародышеподобная структура, развивающаяся *in vitro*, формирующая цельный проросток, не связанный сосудами с каллусом

Морфогенез в культуре клеток и тканей *in vitro*



- Внутренние факторы**
- Вид растения
 - Орган
 - Ткань
 - Возраст
 - Время года

- Внешние факторы**
- Температура
 - Свет
 - Среда (состав и соотношение компонентов)
 - ФИТОГОРОМОНЫ
 - РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА РАСТЕНИЙ

Способы клонального микроразмножения растений



1

- Активация развития уже существующих в растении меристем

2

- Индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта

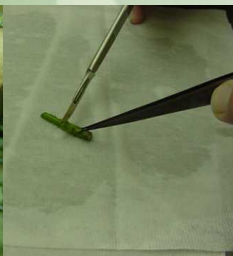
3

- Дифференциация из соматических клеток зародышеподобных структур

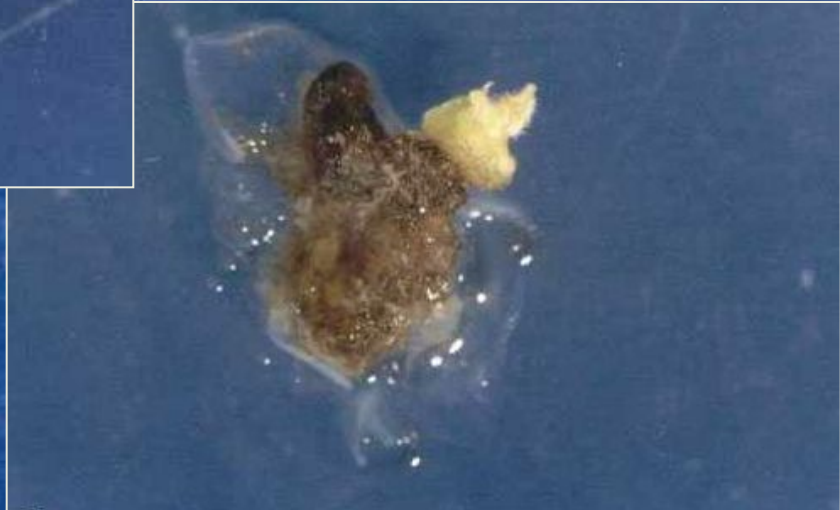
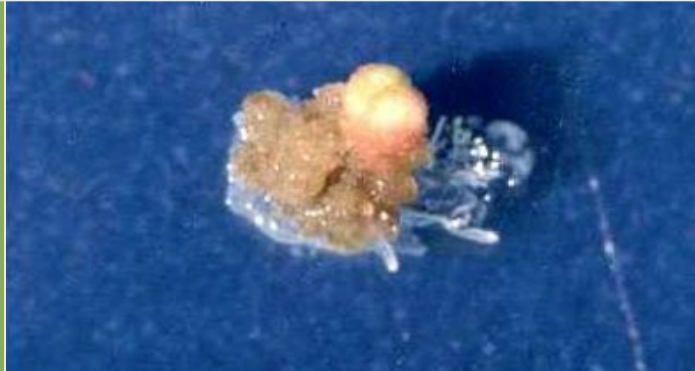
4

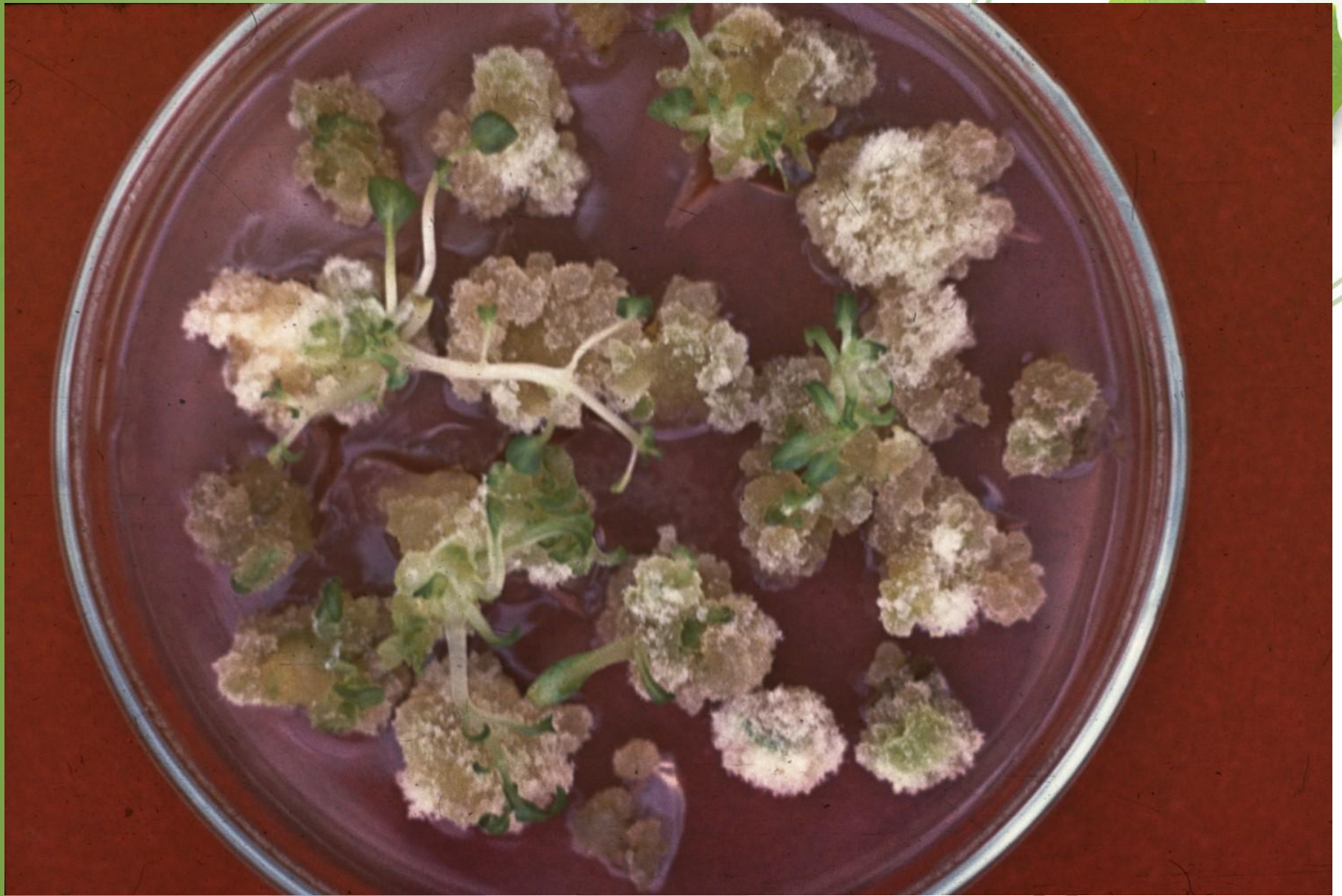
- Дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани

Адвентивные почки – почки, возникшие у растений из клеток и тканей, обычно их не образующих.



Регенерация побегов из морфогенного каллуса сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)







Регенерация побегов из листовых эксплантов сахарной свеклы (*Beta vulgaris* L.)



Применение в практике

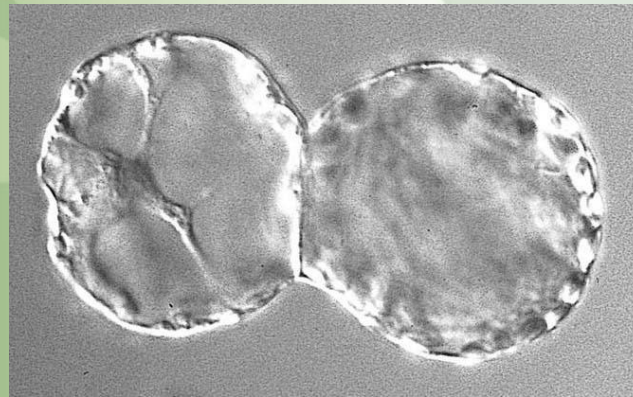


**Микроклональное размножение
– базовый метод для получения соматических
гибридов и генетической трансформации
растений**

Соматическая гибридизация



**Получение гибридов соматических клеток
неродственных и филогенетически
отдаленных видов**

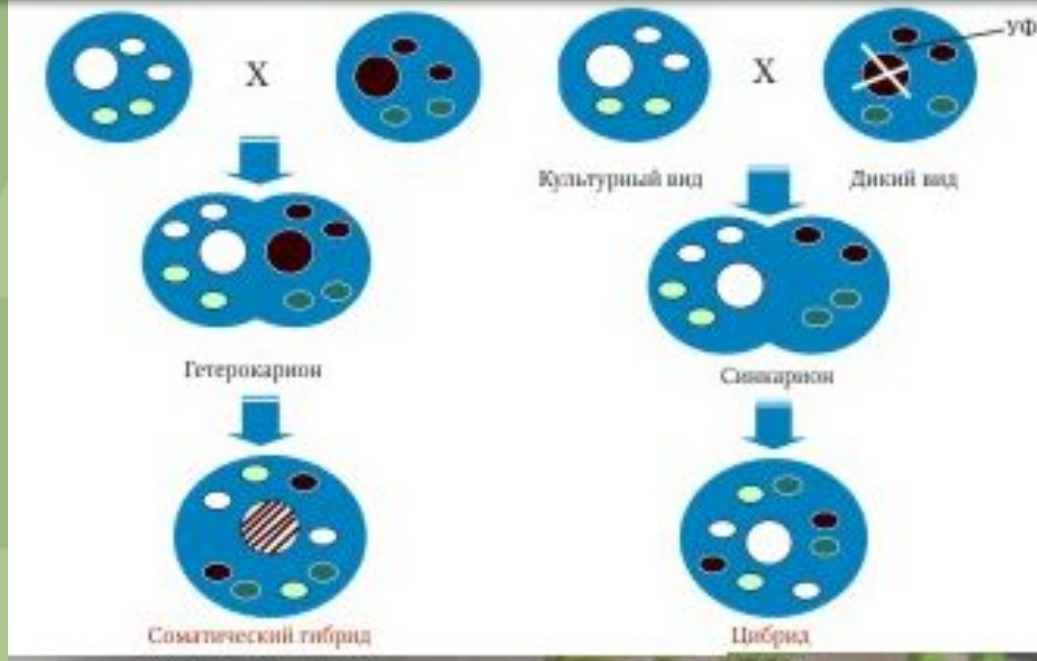


Гибридизация соматических клеток



Полное слияние – образуются двухядерные гетерокарионы, дающие начало двум одноядерным гибридным клеткам.

Частичное слияние в изолированные протопласты вводят макромолекулы, клеточные органеллы и клетки бактерий.





КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕРЕНИЯ. РАСТЕНИЯ. Лекция 8

ТЕХНИКА КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Получение соматических гибридов у растений



1

- **ПОЛУЧЕНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ**
(методы механический, энзиматический)

2

- **КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ**
(методы «жидких капель», платирования)

3

- **ГИБРИДИЗАЦИЯ**
(методы спонтанного и индуцированного слияния)

Получение протопластов



Изолированный протопласт – это содержимое растительной клетки, окруженное плазмолеммой.

(Термин «изолированные протопласты» был предложен в **1880** году **Д.Ханстейном.**)

МЕТОДЫ

Механический

Применил в **1892** году **Дж. Клернер.**
В основе метода лежит явление «плазмолиза» с последующим механическим удалением клеточной стенки.

Энзиматический

Применил в **1960** году **И.К.Коккинг.**
В основе метода лежит использование ферментов (целлюлаза, гемицеллюлаза, пектиназа).

Культивирование протопластов



МЕТОДЫ

платирование

метод «жидких капель»

Протопласты капельно вносят в питательную среду

в питательные среды добавляют 1% агар-агар

Это повышает жизнеспособность протопластов:

- протопласты равномерно распределяются по культуральной среде,
- агрегаты отсутствуют
- питательные вещества потребляются равномерно
- токсические продукты метаболизма распределяются равномерно

Слияние протопластов



(термин «соматические гибриды» введен в 1974 году Дж.Мельхерсом)

спонтанное

индуцированное

Химическими фюзогенами
(хлористый кальций, этиленгликоль,
хлорпромазион)

Физическими фюзогенами
(переменное электрическое поле)

Биологическими фюзогенами
(вирусы)



Продукты, представляющие интерес для биотехнологии растений

Вторичные метаболиты



Соединения: фенолы, терпеноиды, амины, алкалоиды, гликозиды, стероиды

Цена продукта на рынках: до нескольких тысяч \$ US за 1 кг.

Особенность получения продуктов вторичного метаболизма:

низкая концентрация в клетках!

Управление: фитогормоны, минеральные соли, органические соединения, физические факторы и др.

Биосинтез в растениях и суспензионных культурах



- По оценкам специалистов список веществ синтезируемых растениями и используемых человеком составляет $2 * 10^4$

Растения продуцируют эфирные масла, красители, лекарственные препараты, наркотиков (опиум, героин, никотин) и стимуляторов (танин, кофеин) и пр.

мак снотворный (Papaver somniferum) источник

болеутоляющего средства кодеина

наперстянка (Digitalis lanata) – тонизирующего сердечную деятельность дигоксина

хинное дерево (Cinchona ledgeriana) – антималярийного хинидина.

Биотрансформация в суспензионных культурах



Если синтез вторичных метаболитов в культуре останавливается, не достигая конечного результата, то для получения продукта применяют процесс биотрансформации. Суть процесса заключается в превращениях исходного субстрата клеточными культурами растений.

Например, культуры клеток лебеды и картофеля способны трансформировать индолил-3-уксусную кислоту в индолил-3-ацетил-L-аспарагиновую кислоту.

Страны – держатели крупных коллекций генетических ресурсов растений



	Страна	Число образцов в коллекциях генных банков		
1	США	550000		
2	Китай	440000		
3	Индия	342108		
4	Россия (ВИР)	323000		
5	Франция	249389		
6	Канада	212061		
7	Япония	202581	Группа культур	Число образцов
8	Германия	200000	Пшеница, тритикале, эгилопсы	52 737
10	Корея	147192	Рожь, ячмень, овес	40 730
11	Великобритания	114495	Крупяные	43 867
			Технические, масличные	26 894
			Кормовые	28 523
			Зернобобовые	45 690
			Клубнеплоды	8 080
			Овощные	49 295
			Плодовые, ягодные, виноград	23 054

Центры происхождения культурных растений

