

ЮНЕСКО  
КОМИССИЯ  
УКРАИНСКОЙ ССР  
ПО ДЕЛАМ ЮНЕСКО



АКАДЕМИЯ НАУК  
УКРАИНСКОЙ ССР  
ИНСТИТУТ БОТАНИКИ  
им. Н. Г. ХОЛОДНОГО

## **МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ IN VITRO**

**Препринт 88.3**

**Киев  
1988**

ЮНЕСКО

Комиссия  
Украинской ССР  
по делам ЮНЕСКО

АКАДЕМИЯ НАУК  
УКРАИНСКОЙ ССР

Институт ботаники  
им. Н.Г.Холодного

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ  
РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ IN VITRO

Препринт 83.3

Киев  
1988

УДК 581.1

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ *IN VITRO* - Киев, 1988. 37 с. - (Препринт / АН УССР, Институт ботаники; 88.3)

Зубко Михаил Константинович, Кириченко Игорь Владимирович, Куксова Валерия Борисовна, Махорина Ольга Константиновна, Сахно Людмила Александровна, Сидоров Владимир Анатольевич, Скаржинская Марина Всеволодовна, Юзefович Лариса Викторовна.

В работе подробно изложены основные принципы и техника культивирования *in vitro* растительных клеток, протопластов, пыльников и микроспор, а также микроклонального размножения на примерах важнейших модельных и сельскохозяйственных объектов.

Для специалистов в области биотехнологии растений.

© Институт ботаники АН УССР, 1988

## ВВЕДЕНИЕ

Культивирование растительных клеток, тканей и органов *in vitro* к настоящему времени превратилось в разветвленную и многоплановую отрасль экспериментальной биологии. Новейшие достижения в области мутагенеза, клеточной и генетической инженерии во многом определены развитием культуральных методов. На современном этапе эти методы призваны сыграть немаловажную роль в развитии биотехнологии. Круг растений, доступных для манипуляций *in vitro*, постоянно расширяется и в недалеком будущем охватит все хозяйственно-важные объекты.

Основные направления культуральной работы с растениями включают микроразмножение, андрогенез, культивирование клеток – продуцентов ценных соединений, получение соматоклональных вариантов, соматическую гибридизацию, генетическую трансформацию, а также чисто академические исследования по цитологии, генетике, физиологии и биохимии растений.

При подготовке настоящего препринта авторы руководствовались стремлением в небольшом объеме изложить основные принципы и приемы, принятые в практике культивирования растительного материала *in vitro*. Мы надеемся, что при всей лаконичности эта работа будет полезной для многих начинающих исследователей в данной области. Из различных модификаций каждого метода здесь приведены те, которые чаще всего применяются сотрудниками отдела цитофизиологии и клеточной инженерии Института ботаники им. Н.Г.Холодного АН УССР. Авторы будут благодарны за критические замечания и ценные советы по поводу настоящей работы.

## ПРИНЦИПЫ И МЕТОДЫ ВЫРАЩИВАНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ РАСТЕНИЙ

Культивирование изолированных клеток и тканей растений в условиях *in vitro* – метод сохранения жизнеспособности и размножения органов или их частей, участков тканей и отдельных клеток вне организма. Выращиваемые *in vitro* клетки и ткани являются биологической моделью, на которой в контролируемых условиях, близких в некоторых отношениях к естественным, представляется возможность изучения механизмов межклеточных взаимодействий, контактов, их регуляторной роли. Освобождение клетки из-под влияния коррелятивных связей и зависимостей материнского организма является научной основой метода изучения ее различных потенциальных возможностей.

Практически все методические приемы культуры тканей *in vitro* основываются на трех основных принципах:

- изолирование эксплантата (клетка, кусочек ткани, орган) от основного материнского растения;
- помещение эксплантата в контролируемые, тщательно подобранные условия;
- соблюдение стерильности выращиваемого материала.

В настоящее время метод культуры клеток и тканей *in vitro* широко применяется для решения многих фундаментальных вопросов физиологии, цитологии и генетики растений /1, 3, 4/.

### МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- бокс для стерильных работ с ламинарным потоком воздуха;
- автоклав;
- рН-метр;
- инструменты (пинцеты, скальпели);
- лабораторная посуда (стеклянная – чашки Петри, колбы, химические стаканы, мерные пипетки, пастеровские пипетки; пластиковая – чашки Петри одноразового применения);
- мембранные фильтры;
- химические реактивы (соли, сахара, фитогормоны, витамины, аминокислоты, антибиотики, агар);
- стерилизующие растворы (диоксид, хлоракс, 70% этанол);
- стерильная дистиллированная вода;
- листья, почки и стебли растений из открытого грунта, семена;
- растения, выращиваемые в стерильных условиях.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Перед выполнением операций в ламинарном боксе необходимо подготовить его к работе. Для этого используют стерилизацию ультрафиолетом в течение 30 мин с последующим протиранием рук и рабочих поверхностей 70-96% этанолом. Основное требование к проведению всех манипуляций - соблюдение условий стерильности, поэтому для работы необходимо иметь предварительно выдержанные (2-2,5 часа при температуре 180-210°) в сушильном шкафу инструменты и посуду. Кроме суховоздушного способа посуду можно стерилизовать автоклавированием в течение 25 мин при 1-1,2 атм. Непосредственно перед работой инструменты погружают в этанол и прожигают рабочие поверхности в пламени спиртовки. Грязную посуду моют детергентом, затем тщательно промывают проточной водой и споласкивают дистиллятом. Сильно загрязненную посуду целесообразно мыть хромовой смесью. Вымытую посуду высушивают в сушильном шкафу. Чистую посуду хранят в закрытых шкафах, в чистоте, не допускающей загрязнения даже следами химических веществ.

Стерилизация исходного растительного материала включает следующие операции:

- погружение в 70% этанол на 1-2 мин. для семян, на 20 сек для листьев;
- погружение в диоцид на 15-30 мин. для семян, на 6 мин. для листьев. Диоцид готовят, растворяя отдельно 330 мг этанолртутихлорида и 660 мг цетилпиридиний хлорида в горячей воде (около 300 мл), смешивая полученные растворы и доводя объем жидкости до 1 л; добавляют несколько капель детергента Твин-80. Диоцид хранят в плотно закрытой колбе в темноте;
- многократная промывка материала стерильной дистиллированной водой.

Приготовление питательных сред. Растворы макро- и микросолей готовят согласно прописям, взвешивая и растворяя отдельно каждую навеску в новой порции бидистиллированной воды.

Растворы фитогормонов готовят следующим образом:

- ауксины: 2,4-Д, ИУК, НУК, ИМК, пиклорам - растворяют 100 мг вещества в 0,5-2 мл этанола, подогревают, добавляют воды до 100 мл (концентрация 1 мг/мл);
- цитокинины: Кин, Зеа, БАП - растворяют в небольшом объеме 0,5 Н HCl, подогревают, добавляя соответствующий объем воды;

- АБК - растворяют в 70% этаноле, доводя до нужного объема водой;

- ГК - растворяют в воде;

- витамины: тиамин НСI ( $B_1$ ), пиридоксин НСI ( $B_6$ ), никотиновая кислота (РР), аскорбиновая кислота (С), фолиевая кислота ( $B_9$ ), биотин (Н), парааминобензойная кислота, холинхлорид, Са-пантотенат, цианкобаламин ( $B_{12}$ ), рибофлавин ( $B_2$ ) - растворяют в воде (концентрация I мг/мл или 0,1 мг/мл).

Все добавки необходимо хранить в холодильнике при температуре  $+4^{\circ}$  не больше месяца. Растворы витаминов можно замораживать и хранить в небольших количествах.

После введения в среду всех компонентов добавляют воду до нужного объема и доводят рН (обычно I N КОН). Среды готовят жидкие и твердые (агаризованные). Среды стерилизуют автоклавированием (в течение 20-25 мин при 0,8-1 атм. и  $120^{\circ}\text{C}$ ); жидкие среды, содержащие вещества, разрушающиеся при нагревании, стерилизуют фильтрованием через мембранные фильтры /I-3/. В случае заражения среды также необходимо проавтоклавить и затем тщательно вымыть посуду /3/.

Состав наиболее часто используемых сред /3/ приведен в табл. I. Сокращения: 2,4-Д - 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота, НУК - нафтилуксусная кислота, ИУК - индолилуксусная кислота, ИМК - индолилмасляная кислота; Кин - кинетин, Зеа - зеатин, БАП - бензиламинопурин, АБК - абсцизовая кислота, ГК - гибберелловая кислота.

Получение каллусной ткани. Для индуцирования каллусной ткани стерильные листья, черешки и сегменты стеблей нарезают и помещают на питательную среду. Каллусную ткань можно индуцировать из любого органа и ткани растения, но успех зависит от вида растения и ткани. При этом клетки растений, находящиеся на крайней стадии дифференциации под воздействием индукторов клеточных делений - ауксинов и цитокининов, переходят в дедифференцированное состояние и возобновляют меристематическую активность. После образования каллуса в асептических условиях его отделяют и помещают на новую агаризованную питательную среду, получается стерильная культура каллусной ткани, ее можно поддерживать в культуре неограниченно долгое время, периодически разделяя на фрагменты и пересаживая на новую среду. Для индукции каллусообразования следует использовать питательные среды с высоким (до 10-кратного) соотношением ауксин:цитокинин.

Таблица I

## Используемые среды

	: MS	: B <sub>5</sub>	: W	: SH
Макросоли:				
$MH_4NO_3$	1650			
$KNO_3$	1900	2500	80	2500
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	440	150		200
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	370	250		700
$KH_2PO_4$	170			
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$		150		
$(NH_4)_2SO_4$		134		
$NH_4H_2PO_4$				300
$MgSO_4$			360	
$Ca(NO_3)_2$			200	
$Na_2SO_4$			200	
KCl			65	
$NaH_2PO_4$			16,5	
Микросоли:				
$H_3BO_3$	6,2	3,0	1,5	5,0
$MnSO_4$			4,5	
$Fe_2(SO_4)_3$			2,5	
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,025	0,025	0,02	0,2
$ZnSO_4$			1,5	
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,25	0,25	0,0025	0,1
KI	0,83	0,75	0,75	1,0
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	22,3			
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,025	0,025		0,1
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	8,6	2,0		1,0
$MnSO_4 \cdot H_2O$		10,0		
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	27,8	28		15,0
$Na_2ЭДТА \cdot 2H_2O$	37,3			20,0
$B_I$	0,1	10,0	0,1	5,0
$B_G$	0,5	1,0	0,1	0,5
PP	0,5	1,0	0,5	5,0
Мезо-инозит	100	100		1000
Глицин	2,0		3,0	
ИУК	2,0			
Кин	0,2			0,1
2, 4-Д		2,0		0,5
ПХУ				2,0
сахароза	30000	20000	20000	30000
агар	0,7%	0,7%	0,7%	0,7%
pH	5,6-5,8	5,5	5,6-5,8	5,9

Для учета роста каллусных тканей определяют увеличение сырого или сухого веса, а также количество клеток на единицу веса ткани.

Культура клеток растений характеризуется большой морфофизиологической и генетической гетерогенностью. Первая зависит от вида ткани, состава питательной среды и способа культивирования, она проявляется в зависимости от фазы роста и от числа пассажей. Генетическая гетерогенность может зависеть от гетерогенности исходного эксплантата и от состава среды /14/.

Клеточные суспензии. Растительные суспензионные культуры состоят из одиночных клеток и клеточных агрегатов, растущих в аэрируемой жидкой питательной среде определенного состава. Для выращивания клеточных суспензий используются в основном те же питательные среды, что и для каллусных культур. Создан ряд сред, предназначенных непосредственно для выращивания суспензионных культур /3/.

Основным способом получения суспензионных культур является помещение кусочка каллуса в перемешиваемую жидкую среду. В редких случаях используют эксплантаты тканей, стерильные проростки, которые в жидкой среде дедифференцируются и образуют каллус, распадающийся в конечном итоге на отдельные клетки. Иногда суспензионную культуру инициируют определенным количеством гомогената ткани, содержащего живые и разрушенные клетки.

Для получения высокодиспергированной суспензионной культуры важное значение имеет тип исходной каллусной ткани. Оптимальной считается каллусная ткань рыхлого типа.

Аэрация культур в жидкой среде обеспечивается следующими способами:

- выращиванием кусочков каллуса на мостиках-поддержках из фильтровальной бумаги;
- культурой клеток, погруженных в жидкую питательную среду на качалках ротационного или шейкерного типа и роллерах (накопительное культивирование);
- выращиванием клеток в жидкой питательной среде в культиваторах и ферментерах путем барботаж или барботаж в сочетании с механическим перемешиванием (непрерывное культивирование).

Основное количество работ, выполненных на суспензиях, посвящено изучению их роста и метаболизма в накопительной культуре. Рост клеточной популяции в цикле выращивания накопительной куль-

туры выражается S-образной кривой. Цикл роста измеряется временем до выхода культуры в стационарную фазу. В процессе субкультивирования клетки проходят последовательно следующие фазы: 1) латентную или лаг-фазу; 2) экспоненциальную (логарифмическую) фазу; 3) линейную фазу; 4) стационарную фазу; 5) фазу гибели клеток. Обычно накопительные суспензии культивируют до стационарной фазы роста, что в большинстве случаев составляет длительность пассажа 21-28 дней и популяцию из  $10^6$ - $5 \cdot 10^6$  клеток/мл. Концентрация клеток в мл суспензии - плотность клеточной популяции - один из важнейших показателей состояния клеточной системы в суспензии. Количество клеток в миллилитре диссоциированной суспензии определяется общепринятым способом - подсчетом после нанесения на сетку счетной камеры (Горяева или Фукса-Розенталя) /14/.

Регенерация растений. Получение растений-регенерантов из культивируемых протопластов, клеток, тканей является наиболее трудной задачей, стоящей перед экспериментатором.

При индукции органогенеза в культурах тканей различают две фазы этого процесса. Первая фаза - дедифференциации, во время которой происходит превращение специализированной клетки в каллусную. Необходимым условием для дедифференциации является помещение изолированной ткани на агаризованную или жидкую среду, содержащую элементы питания и гормональные факторы. В последующей фазе собственно дифференциации происходит формирование зачатков органов.

Как правило, спонтанный или индуцированный морфогенез наблюдается у недавно введенных в культуру тканей. В большинстве случаев способность к органогенезу теряется в ходе многократных пересадок. Способность к органогенезу прогрессивно уменьшается у тканей, изолированных от верхушки до основания стебля. Тенденция к органогенезу снижается также при многократных пересадках каллуса, причем способность к образованию корней сохраняется более длительное время. Растения-регенеранты, полученные из многократно пересаживаемых тканей, обычно слабые. При длительном культивировании изменяется число хромосом, что приводит к ауплоидии и анауплоидии, возникают разнообразные хромосомные нарушения.

Способность соматических клеток растений к регенерации целого растения является основой использования культуры клеток и тканей в прикладных целях. Органогенез и регенерация растений используются для клонирования ценного материала, для получения

. больших популяций растений из одной генетической линии. Органогенез гаплоидных клеток пыльцы или каллусов позволяет получить гаплоидные растения /3, II, I4, I9/.

## МИКРОКЛОНАЛЬНОЕ РАЗМНОЖЕНИЕ

Микроклональное размножение - это массовое бесполое размножение в культуре *in vitro*, при котором получаемые растения идентичны исходной родительской форме. От традиционных методов размножения растений оно отличается рядом особенностей:

- 1) получением большого числа копий из минимального количества исходного материала;
- 2) получением, в зависимости от целей исследования, как генетически однородного материала, так и соматклональных вариантов;
- 3) возможностью отбирать *in vitro* растительный материал о интересующими исследователя признаками;
- 4) возможностью получения безвирусного посадочного материала при использовании в качестве эксплантата апикальных меристем и, при необходимости, проведении термотерапии *in vitro*;
- 5) возможностью вести размножение растений на протяжении целого года, так как их рост и развитие *in vitro* практически не зависят от сезонных изменений /3, 18, 33/.

Впервые микроклональное размножение было осуществлено Morel в работах на орхидее *Cymbidium* /28/. Модификации этой методики в настоящее время широко используются для массового размножения орхидных в коммерческих целях, а также в производстве у таких культур, как картофель, земляника, гвоздика.

Murashige /29/ разделил весь процесс микроклонального размножения на три стадии:

- 1) инициация асептической культуры;
- 2) индукция множественных побегов при повторных пассированиях на среде для размножения;
- 3) подготовка сформировавшихся *in vitro* растений к высадке в почву.

В целом метод микроклонального размножения основан на индуцированном цитокининами разрастании верхушечных и пазушных меристем, каждая из которых дает начало очагу побегов. После формирования очага его разделяют на более мелкие группы побегов, переносят на свежую среду, и процесс повторяется.

Скорость микроклонального размножения варьирует в зависимости от вида растения, но часто возможно получать из единичной почки до нескольких миллионов растений в год /12/.

Основными факторами, оказывающими влияние на процесс микро-

клонального размножения, являются тип эксплантата, состав питательных сред и условия культивирования.

Исходным материалом могут служить верхушечные и пазушные меристемы стебля, молодые листья, элементы соцветия и цветка, лукович и клубнелукович. Идеальным материалом для получения множественных побегов являются апикальные и пазушные почки здоровых и активно растущих растений.

В качестве питательных сред в большинстве случаев используют различные модификации среды Мурасиге-Скуга, хотя некоторые группы растений могут иметь индивидуальные потребности в питательных веществах. Культуры могут расти на агаризованных или на жидких питательных средах на мостиках из фильтровальной бумаги.

В зависимости от комбинаций условий культивирования исходной ткани (состав питательных сред, температура, световой режим) можно вызвать развитие пазушных почек, индуцировать появление адвентивных почек или стеблевых побегов непосредственно из клеток эксплантата или из каллуса.

Для индукции множественных побегов *in vitro* в качестве эксплантата обычно используют верхушечные и пазушные почки. В то же время широкое применение нашла культура меристем. Dodds и Roberts /12/ подчеркивают различие понятий "апикальная меристема" и "стеблевой апекс", определяя апикальную меристему как участок стеблевого апекса, расположенный дистально по отношению к наиболее молодому листовому примордию и составляющий в среднем 80 мм в длину. Несмотря на некоторые трудности в работе (необходимость манипулирования миниатюрными эксплантатами, низкий процент выживания *in vitro*), культуры апикальных меристем широко используются для создания растительного материала, свободного от патогенов.

В ряде случаев эффективным способом размножения *in vitro* может служить соматический эмбриогенез, т.е. процесс формирования зародышеподобных структур (эмбрионидов), развивающихся из соматической клетки и способных давать начало целому растению. Соматический эмбриогенез может быть индуцирован двумя различными путями: прямым и непрямым. В ходе прямого эмбриогенеза соматические зародыши формируются непосредственно в ткани эксплантата без пролиферации каллуса. Сформировавшиеся таким образом растения идентичны родительской форме. Непрямой путь соматического эмбриогенеза связан с формированием эмбрионидов из дедифференцированных каллусных клеток и включает следующие этапы:

1) индукция проэмбриогенной каллусной массы;

- 2) развитие эмбриоидов из проэмбриогенных клеток;
- 3) прорастание эмбриоидов и формирование растений /Т8/.

Среди растений, регенерировавших путем непрямого соматического эмбриогенеза, нередко встречаются формы, отличающиеся от исходных. Возникающие таким образом соматоклональные варианты могут быть использованы в дальнейшей селекционной работе.

## МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

- бокс для стерильных работ с ламинарным потоком воздуха;
- бинокулярная лупа;
- стерильные инструменты (пинцеты, скальпели, препаровальные иглы);
- лабораторная посуда (чашки Петри, колбы Эрленмейера на 250 мл, пробирки, сахарные стаканчики);
- стерилизующие растворы (диоксид, хлоракс);
- стаканчики со стерильной водой;
- среды для культивирования;
- растительный материал (побеги, листья, междуузлия, пазушные и верхушечные почки).

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Стерилизация растительного материала проводится по стандартной методике.

### Вегетативное размножение in vitro на примере винограда

Простерилизованные зеленые побеги винограда разрезают на черенки длиной 3-5 мм с одной пазушной почкой и помещают в пробирки или колбы со средой Мурасиге-Скуга. Для подавления бактериального заражения в культуре in vitro на первом этапе культивирования можно вводить в состав питательных сред антибиотик, например, карбенициллин. Раствор антибиотика предварительно стерилизуют через мембранный фильтр и добавляют в питательную среду, охлажденную до 40°C.

Культивирование проводят на свету при температуре 25-28°C. Черенки укореняются и дают побеги в течение 3-4 недель после введения в культуру. Полученные побеги можно размножать путем черенкования и выращивать на безгормональных средах или средах, содержащих низкие концентрации ауксинов (0,1-0,2 мг/л ИУК).

Ускоренное микроклональное размножение включает несколько этапов.

#### 1. Индукция адвентивных почек.

Верхушечные и пазушные почки простерилизованных побегов помещают в колбы Эрленмейера в 5 мл жидкой питательной среды Мура-оиге-Скуга, Уайта или Гамборга с бензиламинопурином (БАП) в концентрации 4–6 мг/л и культивируют на свету при 25–28°C в течение 2–3 недель. Обычно этого времени достаточно для снятия апикального доминирования. Начинается интенсивная пролиферация адвентивных почек.

#### 2. Формирование побегов.

После 2–3 недель культивирования эксплантаты переносят на жидкую питательную среду того же состава, но с пониженным содержанием БАП (до 2 мг/л). На этой среде через 1,5–2 недели начинается интенсивное образование побегов. Пассирование на свежую среду проводят каждые две недели.

#### 3. Укоренение побегов и формирование растений.

Сформировавшиеся побеги вычлениют из пролиферирующих эксплантатов и пересаживают в отдельные пробирки на твердую среду Мурасиге-Скуга с низкими концентрациями ИУК (0,1–0,2 мг/л) для укоренения. Полностью сформировавшиеся растения высаживают в почву.

#### Культура меристем

В стерильных условиях под бинокулярной лупой из верхушечных почек вычлениют меристемы величиной до 1 мм, отсекая скальпелем примордиальные листочки. Изолированные таким образом меристемы переносят на жидкую или твердую питательные среды, содержащие 1 г/л бакто-триптона (в культуральные пробирки или чашки Петри диаметром 40 мм). Меристемы инкубируют при 25–26°C с 12-часовым фотопериодом и интенсивностью освещения 150 лк в первый месяц культивирования и 500 лк на протяжении второго месяца. Сформировавшиеся из меристем побеги длиной до 3 см переносят в пробирки на среду для укоренения.

#### Соматический эмбриогенез

Для успешной регенерации растений путем соматического эмбриогенеза необходима последовательная смена следующих стадий культивирования.

#### 1. Индукция проэмбриогенной каллусной массы.

После стерилизации растительный материал (листья, черешки,

междоузлия) помещают в чашки Петри на среду Мурасиге-Скуга, содержащую 2,4-Д (1-2 мг/л) и БАП (0,1-2 мг/л). Культивируют в темноте при 27°C в течение 1-2 месяцев.

## 2. Развитие эмбриоидов.

Образовавшийся каллус помещают на среду того же состава, содержащую, однако, вместо 2,4-Д нафтилуксусную кислоту (НУК) в концентрации 2 мг/л. Культивируют в темноте при 27°C, производя пассажи на свежую среду раз в месяц. При выращивании в этих условиях начинается формирование эмбриоидов.

## 3. Прорастание эмбриоидов и формирование растений.

Зрелые эмбриониды пересаживают на безгормональную среду Мурасиге-Скуга и выращивают на свету. В ряде случаев нормальное развитие растений может быть стимулировано предварительным охлаждением эмбриоидов при 4°C в течение 2-8 недель.

## КУЛЬТУРА ПЫЛЬНИКОВ

Культивирование *in vitro* микроспор и пыльников позволяет получать гаплоидные растения и гаплоидные каллусные ткани. Это явление, получившее название андрогенез, представляет большой интерес для генетики и селекции, так как у гаплоидов легче выявить и отобразить ценные мутации, а с помощью колхицина из них можно получить диплоидные растения. Пыльцевые зерна, запрограммированные на образование гамет, в условиях культуры *in vitro* переключаются с частичной синхронностью на процессы, свойственные вегетативной клетке. Гаплоиды могут быть использованы в исследованиях по генетике сельскохозяйственных растений: определения взаимодействия генов, определения количества генов, а также характера их взаимодействия.

Гаплоидные растения или клеточные линии получены у более, чем 200 видов растений.

О получении гаплоидной ткани из пыльников и регенерации гаплоидных проростков впервые сообщили Guha и Maheshwari /16/. Дальнейшее развитие этот метод получил в работе супругов Нич /32/, которым удалось получить большое количество гаплоидных растений табака.

В условиях культуры индукция роста микроспор и образование эмбриоидов может происходить двумя способами – прямым эмбриогенезом и непрямой путем – через образование каллуса и индуцирования в нем органогенеза. В обоих случаях это происходит совершенно от-лично от того, как это осуществляется *in vivo*. Образование гамет после 1–2 делений блокируется, в то время как вегетативная клетка делится подобно зиготе и дает начало эмбрионам.

Более желателен путь прямого андрогенеза, при котором микроспора ведет себя подобно зиготе и проходит целый ряд этапов эмбриогенеза, вплоть до образования на пыльнике растеньиц. В случае непрямого андрогенеза микроспора дает начало каллусу, в котором на этой же среде начинается образование эмбриоидов.

### МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

I. Растения на стадии цветения, стерилизующие растворы (70% этанол, раствор диоксида или 1%–5% гипохлорид), стерильная дистиллированная вода, стерильные пинцеты и скальпели, питательные среды для андрогенеза, ламинарный бокс.

2. Материалы и оборудование для определения стадии пыльца в пыльниках:

- микроскоп (объектив 20x40);
- 3% раствор ацетокармина;
- предметные и покровные стекла.

### ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

Индукция андрогенеза зависит от состояния и возраста растения, состояния пыльца в момент введения ее в культуру, наличия холодной предобработки.

Наилучшим материалом являются бутоны растений, которые входят в стадию цветения.

Оптимальной для андрогенеза является стадия ранней одноядерной микроспори (для семейства Brassica) или пыльца во время первого митоза (для рода Nicotiana). Необходимым условием успешного андрогенеза является определение стадии пыльца в пыльниках. Для этого необходимо:

1. Окрасить микроспори 3% ацетокармином и определить под микроскопом стадию пыльца в пыльниках. Отобрать бутоны с пыльниками, содержащими преимущественно одноядерные микроспори.

2. Отделить цветочные почки и простерилизовать их в растворе диоксида с последующей трехкратной отмывкой стерильной дистиллированной водой. Сделать надрез на одной стороне бутона и с помощью пинцета собрать тычинки в стерильные чашки Петри. Пыльники, стараясь не повредить оболочку, посадить на питательную среду для андрогенеза. В дальнейшем культуру инкубируют при температуре 24-27°C и экспонируют на свету около 2000 лк с фотопериодом 14/10. Для образования растеньиц из пыльца при культуре пыльников необходимо 3-8 недель.

#### Предобработка бутонов или пыльников

У многих видов наилучший выход микроспор может быть получен из культивируемых пыльников, которые прошли предобработку низкими температурами. У ячменя, например, 28 дней обработки при 4°C или в течение 14 дней обработка при 7°C дает оптимальные результаты.

В настоящее время для культивирования пыльников применяется несколько составов питательных сред. В табл. 2 представлены среды для семейств злаковых, пасленовых, крестоцветных, видов картофеля, риса, ячменя.

Таблица 2

Состав питательных сред для культивирования пыльников  
/33/

Компоненты (мг/л)	№	Картофель	Ячмень	Паслено- вые	Кресто- цветные
$KNO_3$	2830	1000	1900	950	2500
$NH_4NO_3$	-	-	165	825	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	185	125	370	185	250
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	166	-	440	220	750
KCl	-	35	-	-	-
$KH_2PO_4$	400	200	170	85	-
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	-	-	-	150
$(NH_4)_2SO_4$	463	100	-	-	134
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	-	100	-	-	-
$MnSO_4 \cdot H_2O$	-	-	22,3	11,2	10
$H_3BO_3$	-	-	6,2	3,1	3
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	-	-	8,6	4,3	2
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	-	-	0,25	0,13	0,35
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	-	-	0,025	0,013	0,025
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	-	-	-	-	-
KI	0,8	-	0,83	0,4	0,8
никотиновая кислота	0,5	-	-	0,25	1,0
$B_I$	1,0	1,0	0,4	0,05	10
$B_6$	0,5	-	-	0,25	1,0
миоинозит	-	-	100	100	100
глицин	2,0	-	-	1,0	-
Fe . ЭДТА	37	37	40	40	40
глутамин	-	-	-	-	800
серии	-	-	-	100	100
НУК	-	-	-	-	0,1
2,4 Д	1,5	1,5	-	-	0,1
ИУК	-	-	1,0	-	-
БАП	-	-	1,0	-	-
кинетин	0,5	0,5	-	-	-
сахароза	100г	100г	60г	20г	100г

## ВЫДЕЛЕНИЕ И КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ

Изолированные протопласты, представляющие собой клетки без оболочки, широко используются в физиологии, генетике, биохимии, биофизике и вирусологии растений /34/. Для их получения применяют энзиматический метод, разработанный в лаборатории Э.Кокинга в 1960 г. /8/. Особую важность приобретает использование протопластов для реконструкции растительного генома - в исследованиях по соматической гибридизации, по переносу субклеточных частиц и генной инженерии растений /2, 4/. Подобные исследования возможны благодаря способности растительных протопластов в культуре формировать полноценные растения, что впервые доказано в 1971 г. /37/. На сегодняшний день выделение протопластов, их культивирование и регенерация целых растений успешно осуществляется для нескольких десятков видов, относящихся, главным образом, к семейству пасленовых /2/.

Исходным материалом для выделения протопластов могут быть различные части растений - листья, корни, семядоли, гипокотили, лепестки цветков, пыльцевые зерна, а также каллусные культивируемые клетки /35/. Важнейшим требованием при работе является соблюдение стерильности. Поэтому наличие асептических культур значительно упрощает опыты.

Клеточная оболочка растений представлена главным образом целлюлозой, гемицеллюлозой и пектиновыми веществами. Поэтому для ее деградации используют ферментативные смеси на основе целлюлаз, гемицеллюлаз и пектиназ.

В настоящем протоколе приводится техника работы с протопластами табака и картофеля, однако экспериментальные приемы, описываемые здесь, применимы при работе с другими культурами.

### МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Асептические растения или каллусные культуры.
2. Стерильная посуда и инструменты:
  - чашки Петри (6 см и 10 см в диаметре);
  - колбы Эрленмейера (на 50 мл);
  - пастеровские пипетки;
  - колбочки со стеклянными воронками и нейлоновыми фильтрами (диаметр пор на фильтре - около 60 мкм);

- мерные пипетки или наконечники на I мл и IO мл;
  - центрифужные пробирки на IO мл;
  - мембранные фильтры фирмы "Millipore" (США) с диаметром пор 0,22 мкм или 0,47 мкм;
  - шприц с насадкой для фильтров "Millipore";
  - пинцеты, скальпели или лезвие на держателе.
3. Стерильные среды (см. табл. 4).
4. Ферментные смеси, растворенные в 0,5 М сахарозы и 50 мМ СаС1<sub>2</sub>, рН 5,5-5,6.
5. Оборудование:
- ламинарный бокс;
  - настольная центрифуга;
  - инвертированный микроскоп;
  - камера Горяева или Фуксе-Розенталя;
  - штатив для пробирок.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### Приготовление ферментных растворов и ферментация тканей

Ферментные растворы лучше готовить непосредственно перед опытом или за сутки до опыта. Растворы целесообразно отцентрифугировать для осаждения нерастворимых частиц в течение IO-I5 мин при 2 тыс. об/мин. После доведения рН растворы при помощи шприца с насадкой фильтруют через фильтр "Millipore" в колбочки (по 7-IO мл в каждую).

Для ферментации используют молодые листья табака или картофеля. После перенесения на поверхность стерильной чашки листья нарезают узкими полосками или "елочкой" при помощи скальпеля (лезвия), после чего их сразу же помещают на поверхность ферментного раствора. I г листовой ткани вполне достаточно для ферментации в IO мл ферментного раствора. Ферментацию проводят в термостате при 28-30°С в течение I5-I8 часов.

Если нужно получить протопласты из суспензионной культуры, ее предварительно осаждают любым способом (центрифугирование или фильтрование), затем переносят в ферментный раствор (до 2 г на IO мл ферментного раствора). Каллусные ткани, растущие на агаре, переносят в чашку с ферментной смесью при помощи скальпеля. Длительность ферментации зависит от консистенции тканей, концентрации ферментов, состава ферментных растворов, температуры инкуба-

ции и прочих факторов. Поэтому в некоторых случаях целесообразно контролировать процедуру ферментации визуально, используя инвертированный микроскоп. Для этих целей ферментацию лучше проводить в чашке Петри, а не в колбе.

Таблица 3

Наиболее часто используемые ферменты

Ферменты	Продуцент	Фирма
Целлюлазы:		
Opozuka R-1	<i>Trichoderma viride</i>	Jakult Biochemicals Co. LTD, Nishinomiya, Japan
Cellulysin	"-	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Driselase	Basidiomycete	Kyowa Hakko Co, Japan; Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA
Cellulase	<i>Aspergillus niger</i>	Calbiochem Или Sigma
Гемицеллюлазы:		
Rhozyme HP 150	<i>A. niger</i>	Corning Glass, Corning, NY, USA
Hemicellulase	<i>A. niger</i>	Sigma
Пектиназы:		
Macerozyme R-10	<i>Rhizopus</i> sp.	Jakult Biochemicals
Macerase	<i>Rhizopus</i> sp.	Calbiochem
Pectinol AC	<i>A. niger</i>	Corning Glass
Pectolyase Y23	<i>A. japonicus</i>	Kikkoman Shoyu Co., LTD, Japan
Pectinase	<i>A. niger</i>	Sigma
PATE	<i>A. niger</i>	Hoechst, West Germany

Для ферментации лизофилла табака можно использовать смесь, содержащую 0,5% Cellulase, 0,5% Macerase и 0,2% Driselase. Каллусные ткани табака хорошо ферментируются в ферментном растворе, содержащем 1-2% Cellulase, 0,5-1% Macerase, 0,5-1% Driselase.

Если ферментацию проводят в течение ночи, лучше использовать менее концентрированные смеси, если в течение рабочего дня — более концентрированные.

Каллусная ткань картофеля ферментируется в тех же смесях, что и табачные. Для ферментации следует брать свежий и мягкий каллус, который "рассыпается" в ферментной смеси.

Для мезофилла картофеля можно применять смесь, состоящую из 1% Cellulysin, 0,5% Maserase и 0,1% Driselase.

#### Выделение и культивирование протопластов

Содержимое колбочки или чашки после инкубации фильтруют через воронку с нейлоновым фильтром в пустую колбочку. Остатки тканевой листа остаются на фильтре, в колбочке оказываются изолированные протопласты. Суспензию их переносят в центрифужную пробирку и центрифугируют в течение 3 мин при 1 тыс. об/мин. Жизнеспособные протопласты всплывают на поверхность, их можно легко собрать пастеровской пипеткой и перенести в пробирку, до половины заполненную средой W-5. Центрифугируя в этой среде 1-2 мин при 700 об/мин, осаждают протопласты, отмывая их таким образом от остатков ферментного раствора. Отмывку обычно осуществляют дважды. Осадок протопластов ресуспендируют в небольшом количестве (0,5 мл) среды K-3 (в случае табака) или среды WSS (для картофеля), после чего пипеткой аккуратно выливают на чашку Петри (6-10 см в диаметре), содержащую соответственно 6-10 мл идентичной среды. Оптимальная плотность посева протопластов составляет примерно  $10^3$  клеток в 1 миллилитре. Плотность определяется при помощи камеры Горяева или Фукса-Розенталя.

Культивирование протопластов проводят на рассеянном свете или в термостате при температуре 26-28°C. Качество протопластов и контроль их деления устанавливается при помощи инвертированного микроскопа.

Через 10-20 дней культивирования протопласты образуют колонии-агрегаты клеток, соединенных между собой достаточно прочно. Они видны невооруженным глазом и выглядят светлыми комочками. В это время следует их разбавить свежей средой в несколько раз. Технически это выполняют следующим образом: набирают пипеткой с широким кончиком культуру и разносят по нескольким чашкам со свежей средой. По истечении еще двух-трех недель культивирования колонии можно регенерировать до целых растений.

Регенерацию табака можно осуществить на среде RMOF, регене-

рацию картофеля - последовательно на средах ШН-1 и ШН-3. Если культивирование протопластов можно осуществлять независимо от освещения, для регенерации обязательно нужен свет.

Таблица 4

Используемые среды

Компоненты (г/л):	W-5	K-3	WSB	SH-1	SH-3	RMOP
NaCl	9000					
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		250	1280			1650
KNO <sub>3</sub>		2500		1900	1900	1900
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	18400	900	600	440	440	440
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		250	300	370	370	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			170	170	170	170
KCl	800		300			
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O		150				
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		134				
NH <sub>4</sub> Cl				267	267	
Fe-хелат		250	250	250	250	250
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		3	6	6	6	6
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O			24	24	24	24
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		2	10	10	10	10
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
KI		0,75	0,83	0,83	0,83	0,83
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O		0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
MnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		14				
мезоинозит		100	100	100	100	100
глицин				2	2	
никотиновая к-та		1	1	5	5	
фолиевая к-та				0,5	0,5	
биотин				0,05	0,05	
аденинсульфат				40	80	
гидролизат казеина			500	300	100	
B <sub>1</sub>		10	10	0,5	0,5	10
B <sub>6</sub>		1	1	0,5	0,5	1
ИУК					0,1	0,1
НУК		0,2	2	0,1		
2,4-Д		1	0,2			
БАП		0,2	0,5	0,5		1
зеатин					0,5	
сахароза		10000		2500	2500	10000
глюкоза	1000		72000			
ксилоза			250			
маннитол		72800		54600	36400	
pH во всех средах составляет		5,7				

## ИНДИВИДУАЛЬНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРОТОПЛАСТОВ В МИКРОКАПЛЯХ

Методы культивирования клеток и протопластов растений разработаны в основном для массового культивирования, т.е. выращивания больших количеств клеток в общем объеме питательной среды. Между тем, появляется все больше работ, где решающую роль в успехе эксперимента играет индивидуальное культивирование или культивирование небольшого числа клеток в микрообъеме среды. Такой подход применяется для культивирования гибридных продуктов /5/, инъецированных протопластов /9/, а иногда используется в сочетании с методом культуры-няньки /13/. Культивирование небольших количеств клеток в микрообъеме питательной среды имеет и определенную самостоятельную ценность как инструмент изучения жизнедеятельности клеток и проведения важных морфологических наблюдений /20/; еще более это относится к индивидуальному культивированию.

В последнее время, в работах по слиянию протопластов растений, все чаще проводятся попытки добиться направленного слияния, т.е. максимального выхода бинарных гетерокарионов /6, 38-41/. При этом исследователи сталкиваются со значительными трудностями, и получаемые результаты часто неоднозначны /41/. Слияние преселектированных протопластов с последующим индивидуальным культивированием полученного продукта явилось бы элегантным и логически обоснованным завершением такого рода попыток. Эта технология, особенно эффективная при использовании электрослияния /22, 44/, делает ненужным поиск селективных маркеров и позволяет работать с протопластами почти любых видов растений.

Первым препятствием при разработке методов индивидуального культивирования явилось то обстоятельство, что протопласты и клетки растений в культуре хорошо растут только тогда, когда плотность их посева превышает некоторую критическую. Возможное объяснение этого состоит в том, что при низкой плотности клеток происходит избыточная диффузия в среду промежуточных продуктов их метаболизма. Когда концентрация метаболитов в клетке упадет ниже определенного уровня, клетка может погибнуть /17, цит. по 21/.

Таким образом, для успешного развития отдельной клетки нужно сохранить тот же объем среды, который приходится на нее в массовой культуре. Обычно протопласты растений культивируют при плотности  $10^4$ - $10^5$ /мл. Поэтому индивидуальную культуру протопластов следует вести в микрокаплях объемом 10-100 нанолитров.

Существует и другой подход, который можно было бы использовать для разработки метода индивидуального культивирования. Если клетки гибнут из-за избыточной диффузии промежуточных метаболитов в питательную среду, то, добавив в среду эти метаболиты, можно добиться роста клеток при очень низкой плотности. Успех этого подхода был показан Као и Michayluk на протопластах и клетках *Nicotiana glauca* /21/. В этом случае можно было бы обойтись без культивирования в микрокаплях. Очевидно также, что данный подход менее универсален, чем культивирование в микрокаплях, т.к. промежуточные метаболиты, диффузия которых из клетки определяет успех культивирования, у протопластов разных видов растений могут, вообще говоря, быть разными.

Метод индивидуального культивирования протопластов и клеток растений в микрокаплях нанолитрового объема был разработан Коорет *et al.* /23/ и впоследствии ими же улучшен /24/. Состоит он в следующем: на покровное стекло наносят при помощи микропипетки, управляемой компьютером, микрокапли 2 М раствора сахарозы объемом 1 мкл. Затем стекло силиконизируют, а сахарозу удаляют промыванием стекла в воде. На места прежнего расположения сахарозы наносят микрокапли парафинового масла (1 мкл), под которые затем вносят микрокапли питательной среды для протопластов или клеток. Объем микрокапель среды составлял от 8 до 100 нл, в зависимости от вида культивируемых клеток. В микрокапли питательной среды вносят по 1 протопласту или клетке. Все эти операции производят также при помощи компьютера. Скорость рассаживания составляла не менее 30 протопластов в час. При культивировании в микрокаплях делилось 60-90% изначально посаженных клеток табака.

Нами разработан метод индивидуального культивирования, позволяющий достичь примерно таких же результатов при использовании гораздо более простой технологии. Для протопластов табака скорость рассаживания по микрокаплям составляет 50-100 протопластов в час, эффективность деления 70-80%.

## МАТЕРИАЛЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

1. Оборудование и реактивы для ведения культуры протопластов по стандартным методикам.

2. Материалы, оборудование и реактивы для индивидуального культивирования:

- ламинарный бокс (установка обеспыливания УО-БГ или аналогичный);
- инвертированный микроскоп;
- манипулятор Фонбрюнна (из комплекта микроманипуляторов КМ-2);
- прибор для вытягивания капилляров ПВК-1;
- микрокузница МЭ-4;
- микроапликатор;
- стеклянные трубки и тефлоновый шланг различного диаметра, держатели капилляров из комплекта КМ-2;
- парафиновое или вазелиновое масло.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

При подготовке опытов особое внимание следует обратить на чистоту посуды и реактивов. Все среды желательно профильтровать, чтобы удалить мелкие частички, могущие засорить микропипетку. Для соблюдения стерильности работы нужно проводить в ламинарном боксе, куда помещается вся установка.

### I. Подготовительные операции

Выделение протопластов. Проводится по стандартным методикам.

Изготовление микропипеток. На микрокузнице МЭ-4 тонкостенные капилляры диаметром 1,5 мм вытягивают до диаметра около 100 мкм. Кончик микропипетки изгибают. Капилляры вытягивают из стеклянной трубки на приборе ПВК-1.

Приготовление масла. Парафиновое или вазелиновое масло заливают в делительной воронке деионизированной водой (проводимость не выше 0,3 микросименс) в соотношении 1:1-1:2. Воронку встряхивают до получения тонкой эмульсии и оставляют в вертикальном положении для отстаивания. Воду, собравшуюся внизу, сливают. Процедуру повторяют 5 раз. Затем масло центрифугируют для удаления мельчайших капелек воды (120 мин при 20 тыс. об/мин на роторе SW-27). Масло отбирают, стерилизуют 2 часа при 120°C. После охлаждения в масло стерильно добавляют 0,1-0,2 объема среды для культивирования. Сосуд с маслом и средой встряхивают для получения суспензии. После отстаивания можно добавить 1-2% стерильного активированного угля. Приготовленное таким образом масло можно хранить в холодильнике при 4°C в течение месяца.

Подготовка камеры для индивидуального культивирования. Чашку Петри перед самым опытом заполняют приготовленным маслом на 3-4 мм высоты. В чашку вносят каплю среды для культивирования и каплю суспензии протопластов. Объем капель не должен превышать 100 мкл, чтобы они не выступали над поверхностью масла. Камеру закрепляют в препаратодателе инвертированного микроскопа.

## 2. Основные операции

Стерильная (140°C, 2 ч) микропипетка устанавливается в держатель из комплекта КМ-2, закрепленный на головке манипулятора Фонбрюнна. Держатель и примыкающую часть микропипетки протирают 70%-ным этиловым спиртом. Микропипетку вводят в поле зрения микроскопа. Затем заполняют микропипетку маслом из камеры, а попавший при этом в шланги воздух стравливают через краник.

После этого в микропипетку набирают 10-20 мкл среды из капли под маслом и при помощи микроаппликатора или шприца на 20 мкл на дно камеры наносят микрокапли. Объем микрокапель определяют по формуле для объема полусферы:

$$V = \frac{2}{3} R^3 \approx 2R^3,$$

где  $R$  - радиус микрокапли, а  $V$  - ее объем. Отсюда  $R \approx \sqrt[3]{\frac{V}{2}}$ .

Так, для капли объемом 10 нл диаметр равен 342 мкм. Чтобы придать микрокаплям форму полусферы, лишнюю среду отсасывают микропипеткой.

Рассаживание протопластов по каплям. Передвигая масляную камеру при помощи препаратодателя, приподнятую микропипетку вводят в каплю с суспензией протопластов. Микропипетку размещают над выбранным протопластом, обдувают его средой и засасывают, используя микроаппликатор или шприц на 20 мкл. Для ускорения работы можно набирать в микропипетку до 10 протопластов. После этого микропипетку приподнимают и выводят из капли с суспензией.

При помощи препаратодателя в поле зрения микроскопа вводят микрокаплю, размещают над ней микропипетку с протопластом и опускают ее до соприкосновения с мениском. С помощью микроаппликатора протопласт выпускают в микрокаплю и отбирают из нее избыток среды. Все вышеописанные операции выполняются при 100-кратном увеличении микроскопа.

Примерно раз в неделю микроколониям нужно менять среду. Для

этого микропипетку заполняют маслом, как описано выше; в камеру вносят каплю свежей среды (если ее состав отличается от используемой вначале). Часть старой среды из микроканальца забирают в микропипетку и сливают в каплю со старой средой или в каплю с суспензией. После микропипетку заполняют свежей средой и доливают микрокапли.



ционной способности, небольшое число хромосом, наличие высокоэффективной методики выделения и культивирования протопластов, существование истинных гаплоидов, наличие генетической карты, короткий жизненный цикл растений.

Для отбора мутантов используют следующие приемы:

1. Прямую или позитивную селекцию, при которой выживают лишь мутантные клетки определенного типа.

2. Непрямую (негативную) селекцию, основанную на избирательной гибели делящихся клеток дикого типа и выживании метаболически неактивных клеток; при этом требуется идентификация мутационных изменений.

3. Тотальную селекцию, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны.

4. Визуальную селекцию и неселективный отбор, когда вариантная линия может быть идентифицирована среди популяции визуально или при использовании биохимических методов.

Наибольшее количество работ по мутагенезу в культуре посвящено индукции мутаций устойчивости к антибиотикам и другим ингибиторам метаболизма, а также мутаций хлорофиллдефектности. Поэтому мы остановимся на примерах получения именно таких мутантов, хотя технические приемы, применяемые здесь, достаточно универсальны.

#### Селекция мутантов на уровне клеточных колоний.

В первых исследованиях по клеточной селекции мутантов устойчивости к антибиотикам целью работ было получение цитоплазматических мутантов, для чего была предложена простая, но удачная схема селекции [26, 27]. Исходным материалом служит ткань *Nicotiana tabacum*, полученная из мезофилла листа. Селекцию проводят на среде MS, содержащей 2 мг/л ИУК и 0,5 мг/л БАП. Среда дополняется 0,5 мг/мл стрептомицин-сульфата. Данная концентрация антибиотика в среде ингибирует позеленение ткани, но не подавляет (или частично подавляет) рост. Способность клеток делиться на селективных средах (к тому же в присутствии мутагенного фактора, если учитывать, что многие антибиотики, в том числе и стрептомицин, обладают мутагенным эффектом) приобретает особое значение для отбора цитоплазматических мутантов. Участки каллуса с мутантными клетками обнаруживаются по их зеленой окраске. Островки зеленых тканей отделяют от остальной массы, размножают на этих же средах; проверяя тем самым их на устойчивость, и затем регенери-

руют на среде без антибиотика до целых растений. Впоследствии растения целесообразно поддерживать на среде с антибиотиком для предотвращения химеризации.

Метод отбора мутантных клеточных линий по их способности к фотосинтезу на селективной среде лежит в основе многих приемов селекции и является довольно эффективным при селекции цитоплазматических мутантов.

Эффективная селекция цитоплазматических мутантов устойчивости к антибиотикам показана при использовании в качестве исходного материала для мутагенеза изолированных протопластов. Этот прием успешно использован для получения линкомицинустойчивых мутантов *N. plumbaginifolia* /10/. Он состоит в следующем.

Изолированные мезофильные протопласты обрабатываются 0,1 или 0,3 мМ НЭМ в течение 20-30 мин, отмываются дважды от мутагена и культивируются на обычной для данного вида протопластов среде. Через 5-6 недель культивирования клеточные колонии заплывают на селективную агаризованную среду MS, содержащую 1 мг/л БАП, 0,1 мг/л НУК и 1 мг/мл линкомицингидрохлорида. Отбор устойчивых клонов основан на их способности фотосинтезировать в присутствии антибиотика. Чувствительные к антибиотику колонии в этих условиях формируют белую каллусную ткань. Регенерацию растений из устойчивых клонов, которые иногда возникают и без мутагенной обработки, проводят на той же среде без антибиотика.

#### Сочетание нескольких методов селекции

Эффективный прием селекции цитоплазматических мутантов предложен Р. Флюхром /15/. Использовали семена *N. tabacum*, обработанные нитрозометилмочевинной (НММ). Обработку семян проводили 5 мМ НММ (100 мл стокового раствора НММ готовили на 70% этаноле о 1% уксусной кислотой) в течение 2 часов при комнатной температуре, после чего их стерилизовали и высаживали для проращивания на стерильные среды с селективными концентрациями антибиотиков (1 мг/мл стрептомицина, 0,5 мг/мл спектиномицина, 0,5 мг/мл линкомицина, 0,4 мг/мл хлорамфеникола). Проростки на селективных средах обесцвечивались, но при небольшом увеличении у первых семядольных листьев можно было видеть небольшие зеленые участки, содержащие потенциально мутантные клетки. Сегменты семядольных листочков с зелеными зонами высаживали на среду для регенерации с антибиотиком. Зеленые (устойчивые) и пестролистные (химерные) регенеранты высаживали в почву и изучали (а также расхимеривали) в половых

кроссах. Семена второго поколения на селективных средах давали большое количество истинных мутантов.

Селекция на уровне вторичных побегов, возникающих из пазушных почек культивируемых in vitro растений

Побеги растущих in vitro растений обрабатывают 3 мМ НММ в течение 2 часов и черенки с единичными пазушными почками высаживают на среду с 0,5 мг/мл стрептомицисульфата, на которой наблюдается замедленное образование обесцвеченных побегов. При такой обработке мутагеном эффективность образования побегов оставляет около 70%, остальные черенки погибают. На среде со стрептомицином из пазушных почек наблюдается формирование пестролистных побегов с частотой  $2 \cdot 10^{-2}$ . Особого внимания заслуживают результаты, полученные при скрининге на среде с антибиотиком вторичных побегов, когда для тестирования выживаются черенки растений, выросших на обычной среде из обработанных мутагеном почек (т.е. второе вегетативное потомство). В данном случае пестролистные побеги возникают с более высокой частотой ( $3,5 \cdot 10^{-2}$ ).

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. - М.: Наука, 1962. - 272 с.
2. Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Клеточная инженерия растений. - Киев: Наукова думка, 1984. - 160 с.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. - Киев: Наукова думка, 1980. - 488 с.
4. Сидоров В.А., Пивень Н.М., Глеба Ю.Ю., Сытник К.М. Соматическая гибридизация пасленовых. - Киев: Наукова думка, 1985. - 132 с.
5. Скаржинська М.В. Одержання гібридних клітинних клонів шляхом індивідуального культивування одиничних продуктів злиття ізолюваних протопластів. Український ботанічний журнал, 1980. - т. XXXVI, № 6. - С. 58-73.
6. Bates G.M. Electrical fusion for optimal formation of protoplast heterokaryons in *Nicotiana* // *Planta*. - 1985. - 165, P. 217-224.
7. Bourgin J.P. Selection of tobacco protoplast-derived cells for resistance to amino acids and regeneration of resistant plants // *Proceeding of the NATO advanced study institute genetic engineering in eukaryotes*. New York: Plenum Press, 1983. - P. 195-214.
8. Cocking E.C. A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. - *Nature*, 1960. - 187. - P. 962-965.
9. Crossway A. et al. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts // *Mol. Gen. Genet.* - 1986. - 202, N 2. - P. 179-185.
10. Cseplo A., Maliga P. Lincomycin resistance, a new type of maternally inherited mutation in *Nicotiana plumbaginifolia* // *Cur. Gen.* - 1984. - 6. - P. 105-109.
11. *Developments in Crop Science. Plant Tissue Culture: Theory and Practice* / Eds. S.S.Bhojwani, M.K.Razdan. - Amsterdam e.o.: Elsevier. - 1983. - 90 p.
12. Dodds S.H., Roberts L.W. *Experiments in plant tissue culture.* - Cambridge Univ. Press. - 1985. - P. 113-132.

13. Endo T., Komiya I., Masumitsu Y. et al. An intergenetic Hybrid Cell Line of *Duboisia hopwoodii* and *Nicotiana tabacum* by Protoplast Fusion // *Plant Physiol.* - V. 129. - 1987. - P. 453-459.
14. *Experiments in Plant Tissue Culture* / Eds. J.H.Dodds, L.W.Roberts. - London: Cambridge University Press. - 1985. - 121 p.
15. Fluhr R., Aviv D., Galun E., Edelman M. Efficient induction and selection of chloroplast-encoded antibiotic-resistant mutants in *Nicotiana* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* - 1985. - 82. - P. 1485-1489.
16. Guha S., Maheshwari S.C. In vitro production of embryos from anthers of *Datura* // *Nature.* - 1964. - V. 204, N 4957. - P.497.
17. Ham R.G. Dilution plating and nutritional considerations. A. *Animal. Cells* // In: *Lissue culture methods and Applications* / Eds P.F.Kruse, M.K.Patterson / N.Y.: Academic Press. - 1973. - P. 254-261.
18. *Handbook of Plant Cell Culture* / Eds.D.A.Evans et al. - New York, London: McMillan Publ. Co., 1981. - V. 1. - 970 p.
19. *International Review of Cytology* / Eds. Y.H.Bourne, Y.F.Danieli. Suppl. IIA. *Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture*/ Ed. I.K.Vasil. - N.Y.: Acad. Press. - 1980. - 110 p.
20. Jones L.E. et al. Growth of Somatic tobacco cells in microculture // *American Journal of Botany* . - 1960. - V. 47, N 6. - P. 468-475.
21. Kao K.N. and Michayluk M.K. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastava* cells and protoplasts a very low population density in lignid media // *Planta.* - 1975. - 126. - P. 105-110.
22. Koop H.-U., Dirk J., Wolffand D., Schweiger H.-G. et al. Somatic hybridization of two selected single cells // *Cell Biology International Reports.* - 1983. - V. 7, N 12. - P. 1123-1128.
23. Koop H.-U., Weber G. and Schweiger H.-G. Individual culture of selected single cells and protoplasts of higher plants in microdroplets of defined media // *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie.* - 1983. - 112, N 1. - P. 21-34.
24. Koop H.-U. and Schweiger H.-G. Regeneration of plants from individually cultivated protoplasts using an improved microculture system // *J. Plant. Physiol.* - 1985. - 121. - P. 245-257.
25. Maliga P. Isolation and characterization of mutants in plant

- cell culture // Ann. Rev. Plant Physiol. - 1984. - 35. - P. 519-542.
26. Maliga P., Breznovits A.S., Marton L. Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco // Nature. - 1973. - 244. - P. 29-30.
  27. Maliga P., Breznovits A.S., Marton L., Joo F. Non-mendelian streptomycin-resistant tobacco mutant with altered chloroplasts and mitochondria // Ibid. - 1975. - 255. - P. 401-402.
  28. Morel G. Producing virus-free cymbidiums // Ann. Orchid. Soc. Bull.- 1960. - 29. - P. 495-497.
  29. Murashige T. Plant propagation through tissue culture // Ann. Rev. Plant Physiol. - 1974. - 25. - P. 135-166.
  30. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // Proc. I Int. Citrus Symp. - 1969. - V. 3. - P. 1155-1161.
  31. Negrutiu L., Jacobs M., Caboshe M. Advances in somatic cell genetics of higher plants - the protoplast approach in basis studies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants // Ibid. - 1984. - 67. - P. 289-304.
  32. Nitsch J.P., Nitsch C. Haploid plants from pollen grains // Science. - 1969. - V. 163, N 3862. - P. 85-87.
  33. Plant Cell Culture. A practical Approach / Ed. R.A.Dixon. - Oxford: IRL Press. - 1985. - 180 p.
  34. Plant Protoplasts / Ed. K.L.Giles. - New York: Acad. Press, 1983. - 304 p.
  35. Power J.B. and Chapman J.V. Isolation, Culture and genetic manipulation of plant protoplasts // Plant cell culture. A practical approach. / Ed. R.G.Dixon - Oxford: IRL Press. - 1985. - P. 37-866.
  36. Principles of Plant Biotechnology. An introduction to Genetic Engineering in Plants / Eds. S.H.Mantell et al. - London: Oxford Press. - 1985. - 273 p.
  37. Takebe L., Labib G. and Melchers G. Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. - Naturwissen.- 58. - P. 318-320.
  38. Tempelaar M.I. and Jones M.G.K. Fusion characteristics of plant protoplasts in electric fields. - Planta. - 1985. - 165. - P. 205-216.

39. Tempelaar M.G. and Jones M.G.K. Analytical and Preparative Electrofusion of Plant Protoplasts // Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology. - 1985. - 2. - P. 347-351.
40. Tempelaar M.J. and Jones M.G.K. Directed electrofusion between protoplasts with different responses in a mass fusion system// Plant VCell Reports. - 1985. - V. 4. - P. 92-95.
41. Tempelaar M.J. Duyst A., et al. Modulation and direction of the electrofusion response in plant protoplasts // Plant Science. - 1987. - V. 48. - P. 99-105.
42. Werry P.A.T.J., Stoffelsen K.M. The effect of ionizing radiation on the survival of plant cells cultivated in suspension cultures // Int. J. Radiat. Biol. - 1979. - 35. - P. 293-298.
43. White Ph.R. Handbook of Plant Tissue Culture. - Jaques Cattell Press. - 1943. - P. 791-794.
44. Zimmermann U. and Scheurich P. High frequency fusion of plant protoplasts by electric fields. // Planta. - 1981. - V. 151. - P. 26-32.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение . . . . .	3
Принципы и методы выращивания изолированных клеток и тканей растений . . . . .	4
Микроклональное размножение . . . . .	II
Культура пыльников . . . . .	16
Выделение и культивирование протопластов . . . . .	19
Индивидуальное культивирование протопластов в микрокаплях . . . . .	24
Селекция мутантов в культуре . . . . .	29
Список литературы . . . . .	33

Михаил Константинович Зубко  
Игорь Владимирович Кириченко  
Валерия Борисовна Куксова  
Ольга Константиновна Махорина  
Людмила Александровна Сахно  
Владимир Анатольевич Сидоров  
Марина Всеволодовна Скаржицкая  
Лариса Викторовна Юзефович

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТИТЕЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ IN VITRO

Препринт

Утверждено к печати Ученым советом  
Института ботаники им. Н.Г.Холодного  
АН УССР

подл. к печ. 31.06.88 Формат 60x84/16 Бумага офс печ. офс.

Усл. печ. л. 2,34 Уч.-изд. л. 1,66 Тираж 300.

Зак. 8-229 Цена 25 коп

---

Киевская книжная типография научной книги. Киев, Релина, 4.