

А.С. Лукаткин

Культура клеток и тканей растений

Учебное пособие

**Москва
Издательство Нобель Пресс**

УДК 57
ББК 28
А11

A11 **А.С. Лукаткин**
Культура клеток и тканей растений: Учебное пособие / А.С. Лукаткин – М.: Lennex Corp, — Подготовка макета: Издательство Нобель Пресс, 2023. – 106 с.

ISBN 978-5-458-53334-8

В учебном пособии приведены: конспект лекций, методические указания к лекционным и лабораторным занятиям, методические указания к самостоятельной подготовке студентов. Даны контрольные вопросы по предмету и глоссарий. Предназначено для студентов дневной и заочной форм обучения направлений подготовки «Биология», «Биоэкология», «Биотехнология», «Агрономия», «Технология и переработка сельскохозяйственной продукции», магистрантов и аспирантов. Может быть использовано для планирования научно-исследовательской работы студентов и аспирантов других специальностей.

ISBN 978-5-458-53334-8

© Издательство Нобель Пресс, 2023
© А.С. Лукаткин, 2023

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОРДОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.П. ОГАРЕВА»

САРАНСК
2012

Рецензенты:

кафедра микробиологии и физиологии растений Саратовского государственного университета
им. Н. Г. Чернышевского (заведующий – доктор биологических
наук профессор *С. А. Степанов*);
доктор биологических наук профессор *А. П. Веселов*.

ПРЕДИСЛОВИЕ

Изучение биологии клетки, существующей вне организма, обуславливает ведущую роль клеточных культур в фундаментальных исследованиях по физиологии и цитологии растений. Основная задача курса – познание процессов, происходящих в растительных клетках, способов направленного воздействия на рост и развитие *in vitro*, получение целого растения из одиночных клеток, клонирование и оздоровление растений.

Для успешного выполнения поставленной задачи студенту необходимо не только ознакомиться с этими процессами по учебникам, но и экспериментально наблюдать их течение в живых объектах. Такому подходу служат лабораторные занятия, приведенные в данном пособии. Они составлены с учетом учебных программ для студентов специальностей «Биология», «Биоэкология», «Биотехнология», «Агрономия», «Технология и переработка сельскохозяйственной продукции», и позволяют проводить обучение на основе достижений современной науки.

Описание каждой лабораторной работы включает растительные объекты, используемые при ее выполнении, перечень материалов и оборудования, теоретическое объяснение и изложение выполнения работы, включая таблицы для записи полученных результатов. Предусматривается выполнение лабораторных работ фронтальным методом, но в то же время многие работы носят исследовательский характер, когда студенты используют различные объекты или растения помещаются в разные условия, и полученные экспериментальные данные сводятся в общую таблицу с последующим обсуждением выявленных различий и формулировкой физиологических выводов.

В ходе выполнения лабораторных занятий студент должен оформить результаты в виде рисунков, таблиц, графиков, описания полученных данных (в зависимости от вида работы и получаемых результатов).

После выполнения каждой работы студент должен оформить ее соответствующим образом и сдать преподавателю, который просматривает правильность оформления, полученные результаты и выводы, и после ответов на вопросы по теоретическому материалу работа считается сданной или отправляется на доработку.

Литература для подготовки к лабораторным занятиям и экзамену приведена в конце настоящего практикума.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБК	– абсцизовая кислота
АДФ	– аденозиндифосфорная кислота
АТФ	– аденозинтрифосфорная кислота
БАВ	– биологически активные вещества
БАП	– бензиламинопурин
ГК	– гибберелловая кислота
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДНКза	– дезоксирибонуклеаза
2,4-Д	– 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
ИП	– изолированный протопласт
ИУК	– индолил-3-уксусная кислота
КМР	– клональное микроразмножение
МАТ	– моноклональные антитела
НАД	– никотинамидадениндинуклеотид окисленный
НАД·Н	– никотинамидадениндинуклеотид восстановленный
НАДФ·Н	– никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный
НУК	– нафтилуксусная кислота
ПМ	– плазматическая мембрана
ПЭГ	– полиэтиленгликоль
РНК	– рибонуклеиновая кислота
СКВ	– соматический вариант
СЭ	– соматический эмбриогенез
ФАД	– флавинадениндинуклеотид
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота

КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. ВВЕДЕНИЕ В КУРС «КУЛЬТУРА КЛЕТОК И ТКАНЕЙ»

Экспериментальные системы, основанные на культуре клеток и тканей, характеризуются использованием изолированных частей растений, которые называются эксплантами. Экспланты получают от целого растительного организма и инкубируют на подходящей питательной среде. Такие экспериментальные системы поддерживаются асептическими условиями. В противном случае происходит заражение клеточного материала микроорганизмами, что делает невозможным определение качества результатов эксперимента.

Особое положение занимают эксперименты, связанные с проблемами фитопатологии, при изучении влияния микроорганизмов на физиологические и биохимические параметры растительной клетки или ткани. Другим примером является совместная клеточная культура высших растений и *Rizobia* при изучении симбиоза или улучшения защиты проростков от временного стресса после пересаживания при микроразмножении.

Культуры клеток и тканей используются в фундаментальных исследованиях для лучшего понимания биохимических, физиологических и анатомических реакций в контролируемых условиях при действии определенного фактора среды, что даст возможность понимания процессов, происходящих в целом растении в естественных условиях. Сравнивая культуру клеток и целое растение, первое имеет одно главное преимущество – постоянный контроль за химическими и физическими факторами. Кроме того, такой способ дает возможность изучать различные части растения без влияния на них других частей или тканей, как это бывает в целом растении. Однако в большинстве случаев исходная гистология культивируемого материала может быть подвергнута изменениям, что, в конечном счете, может привести к ее потере. В настоящее время синтетические питательные среды представлены большим разнообразием, поэтому можно изучать любую ответную реакцию клеточного материала на селективный фактор. Например, культура клеток и тканей используется в качестве модельных систем для определения влияния питательного вещества или растительных гормонов на развитие растений и их метаболизм, связанный с тканевым ростом. В первой половине 20-го века это была одна из ведущих идей основоположников направления культуры клеток и тканей.

Преимущества этих систем заключаются в том, что они находятся в более выгодном положении по сравнению с другими системами. Например, гетеротрофные и миксотрофные системы характеризуются высокой концентрационной способностью. Они могут накапливать необходимые органические компоненты питательной среды (в частности сахар 2% и более), а это связано с высоким риском контаминации. Другая особенность связана с трудностями в предсказании результатов, полученных при изучении культуры клеток и тканей, а также объяснения феномена регенерации в целое растение в течении развития.

Все это еще раз подтверждает тот факт, что культура клеток и тканей как и любая другая модельная система имеет свои положительные и отрицательные стороны. На сегодняшний день следует признать, что по-прежнему не представляется возможным удвоение генетического материала в культивируемых тканях даже в 21 веке и возможно этот вопрос никогда не будет разрешен. Сходство в устройстве генетического аппарата и базовых структур клетки высших растений позволяет использовать культуру тканей как наиболее подходящую модель для изучения, по сравнению с культурой водорослей, которая часто используется как модель для физиологических и биохимических исследований.

Область значения понятия «культура клеток и тканей» значительно шире и не имеет четких границ. С практической точки зрения термин включает в себя 5 различных областей – это каллусные, суспензионные культуры, культуры протопластов, культуры пыльников и культура изолированного органа или меристемы.

2. ИСТОРИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ

2.1. История метода культивирования *in vitro* клеток и тканей животных

Достижения цитологии явились идейной предпосылкой развития метода культивирования изолированных тканей и клеток животных. Но научную основу для разработки этого метода составили: во-первых, представление о клетке как универсальной структуре у всех животных и растений (концепция М. Шлейдена и Т. Шванна) и, во-вторых, концепция К. Бернарда, согласно которой живой организм способен поддерживать внутренний гомеостаз при изменении внешних условий среды. Концепция Бернарда относится к целому организму, однако было высказано предположение, что она может быть применена и к клеткам, растущим в культуре *in vitro*.

Многие ученые конца XIX – начала XX в. показали, что вне организма можно сохранять живые ткани. В частности, в 1875 г. профессор Петербургской медико-хирургической академии А. Е. Голубев в экспериментах по действию электрического тока и химических веществ на изолированные лейкоциты обнаружил, что последние могут жить и размножаться вне целого организма. Однако он не ставил целью поддерживать рост и развитие тканей и клеток в таких условиях, так как основным направлением его деятельности было изучение клетки в живом состоянии. Поэтому его нельзя назвать истинным основоположником культивирования тканей и клеток животных *in vitro*. Немецкий анатом и эмбриолог Вильгельм Ру в 1884 г. проводил опыты по культивированию яйца лягушки в фильтрованном курином белке. Тем не менее, нельзя точно сказать, что наблюдаемые им явления были связаны именно с истинным переживанием здоровых тканей, а не просто с замедленной гибелью клеток. Таков был подготовительный этап развития метода культуры тканей и клеток животных.

Основателем метода культивирования *in vitro* клеток животных принято считать американского эмбриолога Р. Гаррисона, которому в 1907–1910 гг. уда-

лось провести серию уникальных исследований по поддержанию в течение нескольких недель в культуре *in vitro* нервных клеток и наблюдать в микроскоп их рост. Нервные клетки были внедрены в каплю свернувшейся лимфы (лимфатический тромб).

В 1910 г. ученик Гаррисона М. Берроуз предложил использовать вместо лимфатического тромба тромб плазмы курицы.

В 1913 г. другой ученик и последователь Гаррисона А. Каррел использовал вместо лимфы плазму крови, обогащенную экстрактом куриного эмбриона. Эта добавка заметно ускоряла рост животной ткани. Каррел показал, что при периодической пересадке кусочка животной ткани (он работал с клетками сердца куриного эмбриона) на свежую питательную среду можно получить «бессмертные» клетки.

Позднее М. Берроуз и А. Каррел модифицировали метод тканевых культур, заменив плазму крови – разведенной гипотонической средой из трех частей плазмы и двух частей дистиллированной воды, что облегчило получение питательной среды, необходимой для культивирования тканей.

Следующий этап развития метода культивирования *in vitro* клеток и тканей животных характеризуется началом работ по выращиванию и репродукции в клетках животных вирусов для производства различных вакцин (против свинки, кори, краснухи и др.). Субстратом служили клетки куриных эмбрионов и тканей человека. Однако общей тенденцией в развитии метода была замена питательных сред природного происхождения на синтетические.

Большим прогрессом стало получение в 1940-е гг. первых антибиотиков и их использование путем добавления к питательным средам для предотвращения контаминаций бактериальной и грибной инфекциями.

Крупным достижением явилась разработка в начале 1950-х гг. метода однослойных культур с применением диспергирующих средств (трипсин, версен) для приготовления клеточных суспензий.

Современный этап связан с возможностью получения в культуре *in vitro* из одиночной клетки популяции клеток, органов и целого организма, выделением интерферонов, разработкой и промышленным внедрением гибридной технологии (производство моноклональных антител).

2.2. Основные этапы развития метода культуры тканей, клеток и изолированных протопластов растений

В развитии метода культуры тканей, клеток и изолированных протопластов растений можно выделить следующие основные этапы:

1892–1902 гг. Этот период связан с работами немецких ученых Х. Вёхтинга, К. Рехингера и Г. Габерландта. Они пытались выращивать *in vitro* изолированные из растений кусочки ткани на растворах сахарозы, однако длительно растущих культур не получили. В то же время Вёхтинг показал, что поллярность присуща не только органам растений, но и самым маленьким фрагментам ткани, и предположил, что она является свойством отдельной клетки. Рехингер получил каллусную ткань из сегментов стебля тополя, корня одуванчика, свеклы и других культур и определил минимальный размер фрагмента (1,5 мм),

способного образовывать каллус. Габерландт пытался культивировать *in vitro* эпидермис, клетки тычиночных волосков традесканции и полисадной паренхимы листа. Его расчет на то, что хлорофиллоносные клетки паренхимы обеспечат себя органическими веществами за счет фотосинтеза, оказался ошибочным. Используемые им в качестве объекта полностью дифференцированные, утратившие эмбриональную активность клетки не делились, а способа вызвать их дедифференциацию Габерландт не нашел. Он выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой клетки растения, т. е. способности любой соматической клетки полностью реализовать свой потенциал развития – образовать целый организм.

Таким образом, на основании работ данного этапа были выдвинуты следующие идеи: 1) полярность свойственна не только органам растения, но и отдельной клетке; 2) любая живая клетка растения тотипотентна.

1907–1930 гг. В этот период были достигнуты существенные успехи в культивировании животных тканей на питательных средах природного происхождения (плазма крови, зародышевая жидкость) (работы Р. Гаррисона, А. Каррела и др.). Но, когда в 1927 г. Х. Чех и С. Прат попытались по аналогии вырастить изолированные ткани растения на растительных экстрактах, их постигла неудача. Причина ее заключалась в том, что в опытах использовались мало пригодные для проявления ростовой активности ткани высших растений.

Общей тенденцией в те годы была оптимизация состава питательных сред с целью обеспечить длительное существование *in vitro* изолированных клеток и тканей растений. Однако первый успех определил не выбор питательной среды для культивирования, а удобный для выращивания в культуре *in vitro* объект. В 1922 г. В. Роббинс и независимо от него В. Котте осуществили культивирование на синтетической питательной среде меристем кончиков корня томата и кукурузы, тем самым положив начало методу культуры изолированных органов растений. Корни некоторое время росли, но не размножались, а как их поддерживать длительное время в культуре, ученые не знали.

1932–1939 гг. связаны с именами двух исследователей: американца Ф. Уайта и француза Р. Готре. Они повторили опыты Роббинса и Котте, показав, что изолированные корни могут расти на питательной среде неограниченно долго, если их кончики периодически пересаживать на свежую питательную среду. Успех работ Уайта и Готре был обусловлен удачным выбором объектов исследования. Готре использовал каллусные ткани древесных растений (камбиального происхождения) и запасающей паренхимы, а Уайт работал с тканями растительных опухолей и корневыми меристемами. Они установили, что ткани камбиального и паренхимного происхождения, а также опухолевые можно длительное время поддерживать *in vitro*, если их периодически субкультивировать. Исследователи ввели в культуру *in vitro* ткани разных органов большого количества видов растений, относящихся к двудольным травянистым и деревянистым формам, а также к однодольным, голосеменным и споровым. Уайт и Готре по праву считаются основоположниками метода культуры тканей и клеток растений.

Большое влияние на развитие метода культуры *in vitro* клеток и тканей растений в нашей стране оказал обзор Уайта (1943), опубликованный на русском

языке в 1949 году. В нем изложены подробная методика культивирования растительных тканей, требования, предъявляемые к работам *in vitro*, приведены составы питательных сред и физические факторы, влияющие на рост изолированных тканей.

1940–1960-е гг. В вышедшей в 1959 г. монографии Р. Готре уже упоминалось 142 вида растений, ткани которых выращиваются *in vitro*. В этот период для многих культур были разработаны специальные питательные среды, изучено значение макро- и микроэлементов для поддержания ростовой активности каллусной ткани, выявлена потребность культур в витаминах и стимуляторах роста.

Ф. Скуг и С. Миллер в 1955 г. при изучении способности к делению и образованию каллуса в клетках сердцевинной паренхимы стебля табака открыли новый класс фитогормонов – цитокинины. Они показали, что кинетин в комбинации с ИУК стимулировал деление клеток сердцевинной паренхимы, лишенной камбия и проводящих пучков. Клетки на среде с ИУК, но без кинетина не делились. В зависимости от соотношения и концентраций регуляторов роста можно было усиливать деление клеток экспланта (фрагмента ткани или органа, инкубируемого на питательной среде или используемого для получения первичного каллуса), поддерживать рост каллусной ткани, индуцировать морфогенез.

В то время исследовались также натуральные экстракты – эндосперм кокосового ореха, каштана, кукурузы и других растений – по их способности поддерживать неорганизованный клеточный рост и стимулировать процессы органогенеза и соматического эмбриогенеза в каллусной культуре и суспензиях клеток (Ф. Стюард, 1962). Были разработаны метод получения и выращивания больших количеств клеточных суспензий (З. Никель, В. Тулеке, 1959) и метод культивирования отдельной, выделенной из суспензии, клетки, деление которой индуцировали с помощью ткани-"няньки" (Л. Джонс, 1960).

1960–1973 гг. Этот период связан с разработкой Е. Кокингом (1960) метода получения изолированных протопластов из тканей корня и плодов томатов путем обработки их смесью пектолитических и целлюлолитических ферментов и исследованием их физиологии. Стало возможным вывести клетку из «деревянной тюрьмы», по образному выражению А. Галстона, и манипулировать с ней. Были найдены условия культивирования изолированных протопластов, при которых они образуют новую клеточную стенку, делятся и дают начало клеточным линиям, способным в ряде случаев к морфогенезу (И. Такебе, 1971). Протопласты были использованы для разработки методов гибридизации соматических клеток путем их слияния, для введения в них вирусных РНК, клеточных органелл, клеток бактерий. На соматических гибридах изучалось поведение ядерного и цитоплазматических геномов в гибридных клеточных линиях.

В этот период разработан метод культуры апикальных меристем позволяющий быстро и эффективно размножать растения (Дж. Морель, 1959; Р. Г. Бутенко, 1960–1964). Полученные растения часто не содержали вирусных, бактериальных и микоплазменных инфекций. Была открыта индукция андрогенеза при культивировании изолированных пыльников, а андрогенез использован для получения гаплоидных и дигаплоидных линий. Обнаружено явление соматической изменчи-

ности, получены и изучены растения-регенеранты табака – соматональные варианты (СКВ) исходной формы.

В рассмотренный период совершенствовались методы и аппаратура для культивирования суспензии клеток.

1974–1990-е гг. Происходит развитие техники *in vitro*, изучение биологии культивируемых объектов и создание технологий на их основе. У. Циммерманом в 1974 году был разработан метод электрослияния изолированных протопластов. На основе методов гибридизации соматических клеток, мутагенеза и клеточной селекции, получения СКВ и гаплоидов создано множество новых форм и сортов сельскохозяйственных растений. С использованием изолированных протопластов и генетических векторов на основе плазмид, разнообразных способов введения генов в клетки стало возможным и приобрело массовый характер получение *трансгенных растений*. В настоящее время делаются попытки создать симбиотические системы гетеротрофных эукариотических клеток высших растений с азотфиксирующими фототрофными цианобактериями.

2.3. Современные направления фитобиотехнологии

К современным технологиям связанным с культурой клеток и тканей растений можно отнести следующие:

- 1) изучение биологии культивируемой растительной клетки;
- 2) использование культивируемых тканей и клеток для моделирования процессов в целом растении;
- 3) промышленное выращивание клеток растений как продуцентов экономически важных веществ;
- 4) оздоровление и массовое клональное размножение растений;
- 5) использование достижений методов культуры клеток и тканей в генетико-селекционных целях.

3. ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТКАНЕЙ И КЛЕТОК ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

3.1. Объекты культивирования *in vitro*

В качестве объектов культивирования *in vitro* используются экспланты разных органов, тканей и клеток семенных растений, чаще всего – покрытосеменных. Это обусловлено большим практическим значением таких видов. Однако известны данные по культурам *in vitro* мхов, хвощей, папоротников, многоклеточных водорослей. Культивирование последних в ферментерах при обеспечении светом позволяет, наряду с изучением фундаментальных вопросов биологии (фотосинтеза, клеточного цикла, популяционных изменений), получать фитопродукты в качестве сырья для промышленности.

В настоящее время не известно ни одно высшее растение, от которого нельзя получить культивируемые клетки и ткани. Наиболее удобными объектами яв-