

Лекція 5-6. Дедиференціювання та калусоутворення *in vitro*.

Клітинна біотехнологія рослин ґрунтується на вирощуванні клітин, тканин чи органів *in vitro* на штучних живильних середовищах. Перенесення клітин у культуру *in vitro* означає припинення їх існування як одного із структурних елементів цілісного організму, до складу якого вони входили раніше. При цьому клітина в умовах *in vitro* виходить з-під контролю корелятивних факторів, що спрямовують і регулюють діяльність різних органів, тканин і клітин як єдиного цілого. Умови і характер живлення клітин також зазнають істотних змін. Ці впливи, які за своєю силою перевищують межі норми реакції геному клітин, є стресовими і призводять до кардинальної перебудови функцій і метаболізму клітин, значного підвищення рівня геномної мінливості, зміни напряму та інтенсивності дії клітинного добору і, як наслідок, до істотних змін в структурі клітинних популяцій. В результаті популяції культивованих клітин відрізняються від вихідних тканин високим рівнем гетерогенності й значними перебудовами геному. Масштабність і глибина перебудов можуть значно перевищувати навіть міжвидові відмінності, що існують у природі.

І в результаті введення клітин вищих рослин в умови *in vitro* утворюється нова біологічна система. Її особливістю є те, що в ній структурні елементи цілісного організму — клітини, які звичайно виконують лише строго визначені функції, стають незалежними організмами, здатними до автономного розвитку. Культивовані клітини вищих рослин є унікальною клоновою популяцією, що не має прямих аналогів у природі, але розвивається й еволюціонує за загальнобіологічними правилами і законами.

Аналіз особливостей культури тканин і клітин вищих рослин як нової, експериментально створеної біологічної системи починається із загальних положень генетики клітинних популяцій.

Термін «популяція» вперше був запропонований В. Йогансенем (Johannsen, 1903) для *природної сукупності особин одного виду, неоднорідних у генетичному відношенні*. Нині популяція визначається як сукупність одного виду рослин, тварин або мікроорганізмів, які протягом тривалого часу (великої кількості поколінь) населяють певну ділянку навколишнього середовища і так чи інакше ізольовані від особин інших сукупностей (популяцій) того самого виду. Поняття «популяція» відповідає сукупності безстатевих організмів одного виду, що самоzapліднюються, а також сукупності клітин, що вирощуються в умовах *in vitro*.

Основні ознаки та відмінності клітинних популяцій

Інтеграцію окремих особин в популяцію, а їхніх генотипів у генофонд популяції зумовлює рекомбінація генетичного матеріалу під час статевого процесу.

В популяціях культивованих клітин рослин такого обміну спадкової інформації немає. Внаслідок відсутності класичної комбінативної мінливості їх відносять до неменделівських популяцій.

Цілісність неменделівських популяцій забезпечується некомбінативною спадковою мінливістю. В таких популяціях виникнення, зміна і збереження успадкованого поліморфізму залежать лише від двох чинників — спадкової (некомбінативної) мінливості і добору. Спадкова мінливість у клітинних популяціях не вичерпується мутаційною мінливістю. В процесі еволюції у клітин багатоклітинних організмів виробився ще один тип спадкової мінливості — епігенетична. Взаємодією спадкової мінливості її добору пояснюються генетичні аспекти таких процесів, як пристосування клітинних популяцій до зміни умов середовища, їх старіння та відмирання, перетворення популяцій нормальних

соматичних клітин на злякисні тощо. Аналізуючи генетичні процеси в клітинних популяціях, потрібно враховувати взаємодію не лише мутаційної мінливості і добору, а й епігеномної мінливості і добору, а також взаємний вплив різних форм мінливості та епігенетичної мінливості на процеси взаємодії мутаційної мінливості і добору.

Одним із шляхів взаємозв'язку між клітинами є виділення в середовище і обмін продуктами метаболізму. Існування такого обміну в популяціях культивованих *in vitro* клітин рослин доведене отриманням клонів від окремих клітин і протопластів із використанням ефекту кондиціонування середовищ. Існує гіпотеза кооперативної дії генів у клітинній популяції:

- кожна клітина знаходиться під впливом не лише власного геному, а й геному сусідніх клітин;

- дія геномів усіх клітин популяції взаємно узгоджується.

З цього погляду генетична гетерогенність популяції культивованих клітин рослин, зокрема їхня міксоплоїдність, пояснюється так: клітини з різним числом хромосом відрізняються за активністю синтезу метаболітів і між ними існують симбіотичні взаємовідносини на основі обміну продуктами метаболізму.

В культурі тканин спостерігається і антагоністична взаємодія між клітинами з різним набором хромосом, в основі якої лежить взаємне пригнічення продуктами метаболізму.

Важливі для сільського господарства технології *in vitro* розроблені з використанням об'єктів різної складності організації, починаючи з ізольованих протопласта і закінчуючи ізольованими зав'язями або зародками. Проте культивовані клітини мають велике значення, виступаючи або безпосереднім об'єктом генетичних маніпуляцій, або обов'язковим етапом інших технологій.

Наприклад, культура тваринних клітин широко використовується для вирішення не лише фундаментальних завдань, а й у практиці народного господарства (отримання вакцин і сироваток для боротьби з вірусними, бактеріальними, інфекційними хворобами; подолання спадкових хвороб, одержання тканин, організмів тварин із заданими ознаками).

Практична реалізація біотехнології рослин значно ширша: вирощують не лише клітинну біомасу як джерело біологічних речовин, а й отримують рослини з поліпшеними якісними ознаками (збалансованим вмістом жирів, незамінних амінокислот, зміненим вмістом вуглеводів, покращеним зберіганням), стійкістю проти біотичних та абіотичних стресових факторів навколишнього середовища (хвороб, шкідників, вірусів, віроїдів, бактеріозів, засолення, закислення ґрунтів, гербіцидів), підвищеним синтезом біологічно активних речовин, здатністю до фіторемерації. Масштабність практичного використання культури клітин рослин обумовлена тим, що рослинній клітині властива тотипотентність — здатність фенотипово реалізувати спадкову інформацію, яка закодована в ДНК ядра, тобто властивість клітин диференційованих тканин після дедиференціації (з наступним створенням відповідних умов) відновлювати частину або весь організм (реалізувати омніпотентність) і давати початок рослині-регенеранту. В культурі рослинних клітин *in vitro*, що виникли з будь-якої спеціалізованої тканини, відбуваються всі форми морфогенезу, притаманні вищим рослинам: утворення коренів, стебел, квіток, зародків.

Основним типом культивованої рослинної клітини є калюсна. Саме на калюсні перетворюються спеціалізовані і меристемні клітини рослин після їх перенесення в умови *in vitro* на штучні живильні середовища.

На калюсні клітини перетворюються не лише пошкоджені (поранені) тканини, а й зовсім непошкоджені (клітини пилку, пилкової трубки). Визначальним моментом перетворення будь-якої клітини рослини на калюсну є дія регуляторів росту у таких концентраціях та співвідношеннях, які на клітину в організмі як єдиній системі не діяли. Можна стверджувати універсальність перетворення на калюсні всіх типів клітин, ізольованих із рослини та культивованих у відповідних умовах.

Процес дедиференціації (втрати спеціалізації) клітини складний і пов'язаний зі зміною експресії (активності) генів.

Експресія генів, які до цього не працювали («сплячих» генів), і репресія (пригнічення) деяких працюючих призводять до зміни в спектрі ферментних і структурних білків клітини. Зменшуються кількісно (уповільнюється експресія), а іноді зникають зовсім білки, притаманні фотосинтезуючим клітинам листків або запасним клітинам бульб і кореня, з'являються білки, властиві калюсним клітинам. Така зміна складу й активності ферментних білків змінює метаболізм клітини. Біологічно активні речовини, що визначають дедиференціацію клітин рослин і їх перетворення на калюсні, поряд із синтезом специфічних білків активізують інші побічні механізми, які забезпечують не лише дедиференціацію, а й наступив розмноження цих клітин. У клітинах, що перебудовуються, значно посилений синтез усіх типів РНК (основи синтезу білків, необхідних для новоствореної маси клітин).

Це не лише малоспеціалізовані клітини запасуючої паренхіми кореня чи бульби, а й хлорофілоносні, фотосинтезуючі клітини листя; лігнінові клітини коленхіми стебла; клітини пилку, які здатні до втрачати спеціалізацію і перетворюватись на калюсні клітини.

Значно рідше культивують клітини пухлин рослин різного походження. Культури пухлинних клітин як в умовах поверхневого, так і глибинного вирощування мало відрізняються зовнішньо і на рівні морфології від культур калюсних клітин. Значним фізіологічним розходженням між ними є гормональна незалежність пухлинних клітин, що дає їм змогу ділитися і рости на живильних середовищах без додавання регуляторів росту. Пухлинні клітини часто позбавлені також спроможності започатковувати нормально організовані структури у процесі органогенезу й ембріоді у процесі соматичного ембріогенезу. У деяких випадках вони утворюють тератоми (вироджені органоподібні структури), що далі не можуть розвиватися нормально.

Калюсні клітини в пересадній культурі можуть спонтанно набувати здатності рости на середовищі без регуляторів росту. Природа такої незалежності до одного або до обох типів регуляторів (ауксину і цитокініну), що звичайно застосовуються для одержання і вирощування клітинних культур рослин, може бути генетичною (наслідок мутації) або епігенетичною (наслідок експресії генів, що визначають незалежність клітини від екзогенних регуляторів). За генетичної незалежності калюсні клітини поводитьсь так само, як пухлинні, за епігенетичної — вони втрачають ознаку незалежності в ряду перетворень клітина—рослина—клітина, що і є доказом негенетичної природи такої набутої незалежності від наявності в середовищі регуляторів росту.

Калюсна клітина, в результаті поділу якої виникає калюсна тканина або калюс, є одним із типів клітинної диференціації, притаманної вищим рослинам.

У природі для рослини калюс є тканиною, що виникає у виняткових обставинах (звичайно при травмах).

Ця тканина захищає місце поранення, накопичує поживні речовини для регенерації анатомічних структур або втрачених органів.

Для одержання культивованих калусних клітин фрагменти тканин різних органів вищих рослин (експланти) вміщують на штучне живильне середовище в пробірки, колби, чашки Петрі. Процес одержання первинного калусу і підтримання субкультивованої культури потребують дотримання умов асептики. Для цього за допомогою різних стерилізуючих розчинів, що містять найчастіше активний хлор (гіпохлориди) з доданими для поліпшення змочування детергентами, стерилізують експланти.

Маніпуляції з культурами проводять в боксах мікробіологічного типу, опромінених перед роботою ультрафіолетовим світлом або в ламі нар-боксах, де асептика досягається постійною подачею стерильного повітря в робочому об'ємі

Культура калусних тканин вирощується поверхневим способом або на напівтвердому агаризованому середовищі. Основні компоненти живильних середовищ для культури клітин і тканин рослин – мінеральні солі (макро- і мікроелементи), сахароза або глюкоза, вітаміни, регулятори росту і іноді комплексні органічні добавки – це можуть бути ендосперми кокосових горіхів, кінського каштану, кукурудзи та інших злаків (5-20 %), березовий сік, дріжджовий екстракт або гідролізат казеїну. Калусна тканина, що вирощується поверхневим способом, являє собою аморфну масу тонкостінних паренхімних клітин, що немає строго визначеної анатомічної структури. Колір маси калусної може бути білим, жовтуватим, зеленим, червонуватим, білим, пігментованим цілком або зонально присутністю хлорофіла чи антоціанів. У залежності від походження й умов вирощування калусні тканини бувають:

- Пухкими, сильно обводненими, що легко розпадаються на окремі клітини;
- Середньої щільності, з добре вираженими меристемними осередками;
- Щільними, з зонами редукованого камбію і судин (в основному трахеєподібними елементами).

Як правило, у тривалій пересадній культурі на середовищах, що включають ауксини, особливо синтетичний аналог ауксину – 2,4-Д. Культури клітин рослин, що вирощуються в рідкому живильному середовищі, звичайно називають суспензійними культурами. Звичайним способом одержання клітинної суспензії є перенесення калусної тканини в рідке живильне середовище в колбу, що потім поміщається на качалку (100-120 об./хв.). Суспензійну культуру можна одержати і прямо з фрагмента органа рослини (коренів моркви, петрушки, бульб картоплі та ін.). Первинну суспензію перед субкультивуванням фільтрують через 1-3 прошарки марлі, нейлонові або металеві сита. суспензії

Джерелами окремих клітин є клітинні суспензії, що ростуть у рідкому живильному середовищі, мацерація тканин рослин (мезофілу листка), ізольовані протопласти після відновлення ними клітинної стінки.

Культивування окремих клітин дозволяє одержувати клони і досліджувати генетичну і фізіологічну стабільність або мінливість при вирощуванні клонового матеріалу. Окремі клітини також можуть бути ізольовані з суспензій з використанням мікроманіпулятора. Для цього методу суспензія готується різними способами:

- 1-2 мл суспензії відбирають після осідання основної маси клітин;
- Суспензію фільтрують через фільтри з розміром пор, що зменшується (нейлонові або металеві сітки).

При цьому використовують дуже багате середовище - середовище Као і Михайлюка. Для створення «годувального прошарку» використовують суспензію клітин того ж виду рослини, що й поодинокі клітини, або близького виду. Клітинна суспензія береться в ранній експонціальній фазі ростового циклу. Казусна культура, що служить тканиною-«нянькою», також повинна бути в стадії активного росту. Незважаючи на чисельні спроби визначити хімічну природу речовин, що індукує поділ окремої клітини, і розкрити механізм дії чинника кондиціонування, ясності тут поки немає.

Морфогенез та регенерація in vitro.

Калусогенез як основа створення клітинних культур. Дедиференціювання та калусоутворення in vitro.

Калусогенез – процес утворення калусу. Основним типом культивованої рослинної клітини є калусна. Саме на калусні перетворюються спеціалізовані і меристемні клітини рослин після їх перенесення в умови in vitro на штучні живильні середовища. На калусні клітини перетворюються не лише пошкодженні тканини, а й не пошкодженні. Визначальним моментом перетворення будь-якої клітини рослини на калусну є дія регуляторів росту у таких концентраціях та співвідношеннях, які на клітину в організмі як єдиній системі не діяли. Можна стверджувати універсальність перетворення на калусні всіх типів клітин, ізольованих із рослини та культивованих у відповідних умовах. Утворення калусу не у всіх випадках пов'язане з поверхнею експланта, а може відбуватися в наслідок проліферації внутрішніх тканин без зв'язку з поверхнею зрізу.

Процес дедиференціювання та калусоутворення in vitro пов'язаний з наступними змінами у клітинах:

- 1) експресії (активності) генів;
- 2) спектра ферментних та структурних білків (зменшуються або зовсім зникають білки, притаманні фотосинтезуючим клітинам листків, запасним клітинам бульб і кореня, з'являються білки властиві калусним клітинам).
- 3) метаболізму клітини, активізуються процеси, що забезпечують дедиференціацію і наступне розмноження клітин;
- 4) стимулюється синтез усіх форм РНК і розпочинається реплікація ДНК (тобто клітини готуються до поділу). У тканинах експланта, що складаються з високоспеціалізованих клітин, які у нормі не діляться, зміни пов'язані з травматичними синтезами.

Припускають, що травма призводить до вивільнення бар – індукторів або елісаторів клітинних поділів, що відрізняються від гормонів. У ролі таких елісаторів можуть виступати продукти руйнування полісахаридів клітинної стінки, що обумовлюють подальші зміни метаболізму та поділу клітин. Калуси можуть утворювати будь-які клітини рослин із живим ядром. Експланти для одержання калусу – це клітини:

- 1) паренхіми листків;
- 2) паренхіми стебел;
- 3) запасуючої паренхіми кореня;
- 4) флоєми коренеплодів;
- 5) пелюсток квіток;
- 6) ендосперму;
- 7) пилку.

Водночас, диференційовані клітини не завжди здатні утворювати калус, що особливо часто спостерігається у злаків, у яких калус одержують лише із ділянок

недозрілої основи листка. Здатність до калусоутворення, темп і тип росту ізольованих клітин, їх здатність до різних типів морфогенезу залежать від:

- 1) складу живильного середовища;
- 2) умов культивування (освітлення, температури);
- 3) тривалості пасажу;
- 4) віку рослини-донора;
- 5) фізіологічного стану рослини донора;
- 6) умов вирощування рослини донора;
- 7) сезону експлуатування;
- 8) стадії розвитку вихідного органу;
- 9) тканинної належності експланта;
- 10) розміру експланта;

11) орієнтації експланта на живильному середовищі та інших специфічних особливостей.

Методика одержання калусних культур. У природі для рослин калус є тканиною, що виникає звичайно при травмах. Ця тканина захищає місце поранення, накопичує поживні речовини для регенерації анатомічних структур або втрачених органів. Для одержання культивованих калусних клітин фрагменти тканин різних органів вищих рослин попередньо стерилізують, вміщують на штучне живильне середовище в культуральні посудини і вирощують в асептичних умовах. Залежно від виду рослин субкультивування калусу проводять через 30-60 днів.

Тотіпотентність рослинних клітин. Тотіпотентність (від лат. totus — весь, цілий і potentilla — сила) – властивість соматичних клітин рослин реалізувати повною мірою свій потенціал розвитку, тобто реалізувати омніпотентність ядра з утворенням цілого організму; здатність рослинних клітин фенотипово реалізовувати генетичну інформацію, закодовану в ДНК ядра. Тотіпотентною є зигота рослин. Тотіпотентність можуть виявляти багато соматичних клітин. Наприклад, розвиток рослини з клітини листка у бегонії. Якщо цей листок відокремити і помістити у вологу камеру, то він може утворювати цілий пагін, але дослідження показали, що початок пагону дає лише одна клітина епідермісу. При цьому вона спочатку проходить процес дедиференціації, тобто набуває ознак і властивостей ембріональних клітин. В цій клітині починається інтенсивний синтез цитоплазми з органелами, зникає центральна вакуоля після чого клітина переходить до поділу.

Омніпотентність (тотіпотентність) наглядно проявляється в дослідах з культурою клітин, тканин і органів в штучних умовах на спеціальних живильних середовищах.

Основні механізми регенерації рослин. Регенерація (від лат. regeneratio – відродження, вторинний розвиток) – відновлення втрачених або пошкоджених органів і тканин, цілого організму з його частини. В основі регенерації лежать явища диференціювання клітин і морфогенезу. Диференціювання – комплекс процесів, що призводять до відмінностей між материнськими та дочірніми клітинами, стан спеціалізації клітин, що відрізняє їх від інших. Проявляється морфологічними, фізіологічними і біохімічними змінами клітин. Основою диференціювання є диференціальна активність генів, які відповідають за синтез білків, що зумовлюють диференціювання.

Морфогенез (утворення морфологічних структур) – виникнення та розвиток спеціалізованих клітин, органів і частин організму. Залежно від механізму процесу виділяють типи регенерації:

1) фізіологічна – відновлення органів після їх природного зношування (клітини кореневого чохла, елементи ксилеми, кора дерев);

2) травматична – відновлення органів після їх механічного пошкодження; 3) меристемна – пов'язана з наявністю у рослинах апікальних та інтеркалярних меристем, які внаслідок пошкодження активізуються і регенерують тканини, органи чи цілі організми. Виділяють наступні типи меристемної регенерації: а) відновлювання апікальних меристем (після ізолювання на живильне середовище регенерує ціла рослина); б) органогенез з існуючих зачатків проембрію – відростання пазушних бруньок стебла після зняття апікального домінування; в) органогенез із новоутворених адвентивних зачатків – стеблові живці утворюють корені внаслідок активації периклінальних поділів камбію чи перициклу, які виконують функцію латентних меристем. Індукція поділів спричинюється накопиченням ІОК в нижній частині меристеми.

Типи вторинної диференціації та морфогенезу. В умовах *in vitro* виділяють такі типи морфогенезу: 1) гістогенез – утворення калусними клітинами елементів тканин (меристемних, провідних, механічних); 2) органогенез – процес виникнення *de novo* у масі калусних клітин, що ростуть неорганізовано, зачатків органів: а) ризогенез – утворення коренів; б) гемогенез – утворення (диференціація) бруньок калусними клітинами; 3) ембріогенез (соматичний ембріогенез) – утворення ембріонів, які містять (подібно до зародка) зачатки стебла та кореня. Для стимулювання певного типу морфогенезу у біотехнологічних дослідженнях використовують гормони: ауксини, цитокініни, гібереліни. Ауксини: ІОК – індоліл-3-оцтова кислота, ІМК – індоліл-3- масляна кислота, НОК – α -нафтилоцтова кислота, 2,4-Д – 20 2,4-дихлорфеноксоцтова кислота. Стимулюють процеси росту й розтягнення клітин, сприяють формуванню калусної тканини, утворенню коренів. Цитокініни: кінетин – 6-фурфуріламінопурин, зеатин, NN-дифенілсечовина, 6-БАП – 6-бензиламінопурин. Регулюють процеси поділу клітин, їхньої диференціації; сприяють утворенню пагонів у калусній тканині. Гібереліни: гіберелова кислота (ГК3); ГК1, ГК2 та інші. Стимулюють ріст і витягування стебла за рахунок розтягнення клітин. Викликають партенокарпію, зміну статі, сприяють виходу насіння зі стану спокою. Культивують експланти у культуральній кімнаті. Умови культивування підбираються експериментально. Для більшості рослин помірної зони умови культивування наступні: 1) тривалість пасажу – 30-60 діб; 2) температура – 20-26 °С; 3) інтенсивність освітлення – 2-3 клк; 4) фотоперіод – 8 – 16 год; 5) відносна вологість повітря – 60-70%