

РАСТЕНИЕ КАК ОБЪЕКТ БИОТЕХНОЛОГИИ

А.В. Бабикова, Т.Ю. Горпенченко, Ю.Н. Журавлев

Биолого-почвенный институт ДВО РАН, г. Владивосток

Термин «биотехнология» был введен в 1917 г. венгерским инженером Карлом Эреки и характеризовал все виды работ, при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты. По определению академика А.А. Баева (1984), биотехнология – это использование живых организмов и их систем в промышленных целях. Поэтому несмотря на то, что большие материальные затраты и длительное время уходит на фундаментальные исследования, основной целью биотехнологии является получение коммерческого продукта, рентабельного производства и, следовательно, того, что необходимо людям в большей или меньшей степени.

Биотехнология формировалась как междисциплинарная наука и является на сегодняшний день самостоятельной, интенсивно развивающейся отраслью. Ее биологическая составляющая относится к сфере промышленной микробиологии и биохимии, а молекулярная – к областям молекулярной биологии, молекулярной генетики и энзимологии нуклеиновых кислот. Благодаря этому сочетанию стало возможным более детальное изучение внутриклеточных процессов клетки, систем наследования и экспрессии генов. Усовершенствование методов клеточной и молекулярной биотехнологии позволило управлять наследственностью и жизнедеятельностью животных, растений и микроорганизмов, создавать организмы с новыми полезными для человека свойствами, ранее не наблюдавшимися в природе.

На сегодняшний день выделяют три основных направления биотехнологии: промышленная биотехнология (промышленная микробиология), культура растительных и животных клеток и тканей и генная инженерия.

Отдельные биотехнологические процессы, используемые в различных сферах практической деятельности человека, известны с

древних времен. К ним относятся хлебопечение, виноделие, приготовление кисломолочных продуктов и т. д. В большинстве этих процессов используются микроорганизмы. Быстрый рост и огромное генетическое разнообразие микроорганизмов позволяют за короткий промежуток времени осуществить синтез больших количеств требуемого продукта в строго контролируемых условиях.

ДОСТИЖЕНИЯ БИОТЕХНОЛОГИИ

С помощью методов генной инженерии (перенос чужеродных генов, придающих новые полезные свойства организму хозяина) удалось видоизменить структуру и содержание современной промышленной микробиологии. Во-первых, существенно повысилась продуктивность промышленных микроорганизмов – продуцентов классических продуктов путем введения дополнительных генов, увеличения их количества или активности. Во-вторых, вводя в микробную клетку новые гены, удалось изменить питательные потребности микроорганизма. При стимулировании микроорганизмов к синтезированию несвойственных им веществ увеличили разнообразие биотехнологической продукции – некоторые белки человека, клонированные в микробной клетке, интерфероны, интерлейкины а также инсулин находят в настоящее время терапевтическое применение. Аналогичными методами стало возможным преобразование клеток бактерий, дрожжей и млекопитающих в «фабрики» для масштабного производства антибиотиков, белков, жиров, аминокислот, а также для получения безопасных и дешевых вакцин (Быков и др., 1987; Квеситадзе, Безбородов, 2002).

Уже 2002 г. в мире получено разрешение на применение более 30 лекарственных препаратов, созданных методами генной инженерии. В стадии клинического изучения находится более 100 биопрепаратов, еще более 500 – на стадии разработки, причем большинство из них предназначены для лечения болезней, которые до настоящего времени считались неизлечимыми (Glick, Pasternak, 2002).

По подсчетам специалистов, ежегодный объем мирового фармацевтического рынка составляет около 402 млрд долларов (2000 г.) и постоянно растет. Большая часть коммерческих разработок в области молекулярной биотехнологии приходится на США (French Biotechnology Industry Association, 2002). Единственным конкурентом США в этой области сегодня можно считать Китай. Это связано с тем, что правительство Китая объявило биотехнологию «стратегической индустрией» и национальным приоритетом. Интенсивное

развитие биотехнологических компаний в Китае сохраняется и к настоящему моменту (SciDev.Net, 20 декабря 2004 г.).

На фоне других стран успехи России в области биотехнологии пока выглядят скромно. Объем продаж на рынке промышленной и сельскохозяйственной биотехнологий в России не превышает 1 млрд долларов в год. В области биофармацевтики Россия хоть и отстает от мировых тенденций, но есть и очевидные достижения. Из всех синтетических пептидных препаратов, производящихся в мире, доля российских более 25%, или 11 препаратов из 40. Среди них – отечественные тимоген и тимодепрессин, регулирующие иммунную систему. Их производят и продают не только в России, но и за рубежом. Еще несколько пептидных препаратов находятся на разных стадиях клинических испытаний (Маркина, 2006).

Одной из самых насущных проблем наступившего XXI века является быстрый прирост населения. Традиционное сельское хозяйство уже не может удовлетворять возрастающие пищевые потребности особенно в белке. По оценкам специалистов Международной Организации питания и сельского хозяйства (FAO), мировой дефицит белка оценивается до 30-35 млн т. в год. Это означает, что более 25% мирового населения страдает от голода или недостатка питания (Евтушенко, Фомичев, 2002). Поиски дополнительных источников белка предпринимаются повсеместно. Широко внедряются новые сельскохозяйственные приемы; выводятся новые сорта злаков, характеризующиеся повышенным содержанием белка; там, где это позволяют климатические и другие природные условия, интенсивно внедряется выращивание сои и земляного ореха; белки начинают экстрагировать путем ультрафильтрации из определенных жидких отходов; и, наконец, разрабатываются новые нетрадиционные способы производства белковых соединений.

Определенные успехи достигнуты в получении белка с помощью микробного синтеза. Это направление получило название «производство белка одноклеточных» (Single-Celled Protein), поскольку большинство микроорганизмов, используемых для этих целей, растут в виде одноклеточных или мицелиальных особей, а не как сложные многоклеточные организмы (Mary, James, 1969; Nobou, 1969 (цит. по: Khan et al., 1992); Reade et al., 1972). В настоящее время одноклеточный белок служит источником питания для различных видов домашних животных, и уже ведутся разработки, направленные на изготовление микробных продуктов для человека: например, грибной белок, получаемый фирмой Ranks Hovis McDougall (Вели-

кобритания, 1998) при выращивании гриба *Fusarium* на простых углеводах.

Методы биотехнологии также являются одним из важнейших способов решения экологических проблем. Они применяются для уничтожения загрязнений окружающей среды (например, очистка воды или очистка от нефтяных загрязнений), для восстановления разрушенных биоценозов (тропических лесов, тундры), популяций исчезающих видов или акклиматизации растений и животных в новых местах обитания.

К перспективным методам биотехнологии животных клеток можно отнести: клонирование; создание трансгенных животных; генетические методы лечения болезней.

В XX в. было проведено немало попыток клонирования животных – амфибий (Briggs, King, 1952), мышей (McGrath, Solter, 1984; 1984a), но все они были выполнены с помощью переноса ядер эмбриональных (недифференцированных или частично дифференцированных) клеток. При этом считалось, что получить клон с использованием ядра соматической (полностью дифференцированной) клетки взрослого организма невозможно.

Однако в 1997 г. британские ученые объявили об успешном сенсационном эксперименте: получении живого потомства – овечки Долли (Wilmut et al., 1997) после переноса ядра, взятого из соматической клетки взрослого животного. Из 236 опытов успех сопутствовал лишь одному, в результате которого и родилась овечка Долли, содержащая генетический материал взрослой овцы, умершей три года назад. Для подтверждения идентичности клонированного животного использовали генетические методы.

Во всем мире технологии клонирования используют для сохранения исчезающих видов животных. За прошедшие четыре года учеными успешно были клонированы по крайней мере три вида исчезающих животных: европейский муфлон, дикие быки гаур и бантенг. Но методы клонирования животных еще не достаточно эффективны: примерно половина получаемых клонов содержит серьезные нарушения, включая специфические дефекты сердца, легких и других органов, ведущие к перинатальной (послеродовой) смертности.

Вторым направлением биотехнологии животных является создание трансгенных животных, которое осуществляется по двум основным схемам. Первая из них – микроинъекции чужеродной ДНК в оплодотворенную яйцеклетку (зиготу) – разработанная для получения трансгенных мышей в 1982 г., позднее стала применяться и для

получения млекопитающих – продуцентов лекарственных белков человека: кроликов, коз, овец, коров. Вторая, более новая схема получения трансгенных животных, – использование эмбриональных стволовых клеток. В отличие от метода микроинъекций в зиготу, здесь еще на этапе работы с культурой эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) можно проанализировать как встраивание трансгена в геном клетки, так и количество встроившихся копий, а иногда и проверить экспрессию введенного трансгена, что дает возможность выбрать линию ЭСК с наилучшими свойствами. Часть этих клеток можно заморозить в жидком азоте и хранить многие годы для последующего создания трансгенных животных (Семенова, 2001).

Генотерапия – лечение заболеваний с помощью генов. Сейчас в мире насчитывается порядка 400 проектов, посвященных лечению с помощью генотерапии. Существует два типа генотерапии: заместительная и корректирующая. Заместительная генотерапия заключается во вводе в клетку неповрежденного гена. Внесенная копия заменяет по функциям сохранившийся в геноме больного дефектный ген. Все проводимые сегодня клинические испытания используют внесение в клетку дополнительных количеств ДНК. При корректирующей терапии предполагается замена дефектного гена нормальным в результате рекомбинации. Пока этот метод на стадии лабораторных испытаний, так как эффективность его еще очень низка. По мере усовершенствования методов доставки генов и контроля их экспрессии список заболеваний, к которым можно применять генотерапию, будет, безусловно, расширяться и не ограничится только наследственными заболеваниями.

БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Первые работы в области развития метода культуры изолированных тканей растений относятся к концу XIX и началу XX вв. и связаны с именами таких выдающихся немецких ученых, как Н. Vöchting (1892), К. Reehinger (1893) и Н. Haberlandt (1902). Н. Vöchting (1892) в своих исследованиях сделал попытку установить минимальный размер экспланта. Он выращивал тонкие срезы корня свеклы и одуванчика, сегменты стебля тополя на песке с применением водопроводной воды без стерильных условий. Эти исследования показали, что каллус образуется при толщине среза не менее 1,5 мм. Еще в XIX в. Н. Vöchting провел ряд экспериментов, убедительно доказывающих полярность как органов, так и клеток. Н. Haberlandt (1902), в свою очередь, впервые высказал идею о возможности куль-

тивирования *in vitro* изолированных клеток растений. Он наблюдал сохранение живыми клеток мезофилла листа в течение нескольких дней. Но для культивирования он выбрал ассимилирующие зеленые клетки – зрелые и высокодифференцированные, утратившие способность к меристематической деятельности. Поэтому результаты его экспериментов оказались отрицательными.

Не достигнув экспериментальных успехов, эти исследователи высказали ряд идей и гипотез, подтвержденных значительно позже. Так, Н. Vöchting при изучении полярности пришел к выводу, что она свойственна не только органам растения, но и отдельной клетке. Н. Haberlandt выдвинул гипотезу о тотипотентности любой живой клетки.

Длительный период (1902-1922 гг.) исследователи пытались создать подходящую среду и благоприятные условия для выращивания изолированных органов, тканей и клеток. Своей работой они внесли значительный вклад в развитие метода культуры клеток и тканей высших растений (Lamprecht, 1918; Knudson, 1919; Molliard, 1921; и многие другие; цит. по: Бутенко, 1964). Наиболее успешный период в развитии этого метода начался с работ R. Gautheret (1932) и F. White (1931), которые показали способность каллусов и тканей растительных опухолей к неограниченному росту при переносе на свежие питательные среды.

В настоящее время клеточная биотехнология имеет в своем распоряжении ряд методов, основными из которых, помимо культивирования клеток и тканей отдельных растений, являются: 1) методы клонального микроразмножения, включающие индукцию органогенеза и соматического эмбриогенеза; 2) методы изолирования протопластов и получения соматических гибридов; 3) методы получения гаплоидных растений и производных от них дигаплоидов; 4) методы генетической трансформации с последующей регенерацией модифицированных растений.

Основой методов культуры изолированных клеток и тканей растений является уникальное свойство растительных клеток – тотипотентность. Под ним подразумевается способность растительной клетки при определенных условиях вторично дифференцироваться и под влиянием внешних условий выбирать тот или иной путь морфогенеза (Батыгина и др., 1978; Бутенко, 1984; Беккер и др., 1990). Морфогенез является сложным процессом, регуляция которого осуществляется на клеточном, тканевом и организменном уровнях. В этом процессе участвуют взаимозависимые факторы, определяющие

процессы деления, растяжения, дифференциации, старения и гибели клеток. В ходе морфогенеза возникают сформированные заново ткани и органы, и соответствующие этому процессы носят названия, отражающие существо морфогенеза - гистогенез, ризогенез, геммогенез (образование листьев или побегов), флоральный геммогенез (образование цветков и (или) отдельных элементов цветка) и соматический эмбриогенез. Полученное в результате морфогенеза *in vitro* растение носит название растения-регенеранта. В настоящее время при использовании современных методических подходов растение любого вида может быть теоретически регенерировано из каллусной ткани, хотя определено представление о трудных для регенерации видах и генотипах. Для многих видов растений разработаны несколько методов регенерации (Бутенко, Кучко, 1979; Бутенко, 1999; Батыгина и др., 2004).

КЛОНАЛЬНОЕ МИКРОРАЗМНОЖЕНИЕ

Существуют много приемов клонального микроразмножения, а также различные их классификации. Согласно одной из них, предложенной Т. Murashige (1977), процесс можно осуществлять следующими путями: 1) активацией пазушных меристем; 2) инициацией образования адвентивных побегов тканями экспланта; 3) инициацией возникновения адвентивных побегов в каллусе; 4) индукцией соматического эмбриогенеза в клетках экспланта; 5) инициацией соматического эмбриогенеза в каллусной ткани; 6) инициацией формирования придаточных эмбриоидов в ткани первичных соматических зародышей.

Н.В. Катаева и Р.Г. Бутенко (1983) выделили два принципиально различных типа клонального микроразмножения: 1) активация уже существующих в растении меристем (апекс стебля, пазушные и спящие почки стебля); 2) индукция возникновения почек или эмбриоидов *de novo*, которая включает: а) образование адвентивных побегов непосредственно тканями экспланта; б) индукция прямого или непрямого соматического эмбриогенеза; в) дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

Основное отличие данной классификации от других в том, что в основу ее положено принципиальное различие между растениями, возникшими из меристемы, обеспечивающей им генетическую идентичность родительским формам, и растениями, образовавшимися из специализированных и каллусных клеток, когда создается возможность реализации мутантного клеточного генотипа. Кроме того,

в пересадочной культуре возможно возникновение дополнительных мутаций (Катаева, Бутенко, 1983).

Активация роста пазушных почек и использование пазушных побегов – один из традиционных методов вегетативного размножения растений. Он основан на снятии апикального доминирования. Этого можно достичь двумя методами: а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега *in vitro* на безгормональной среде и б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов. Как правило, в качестве цитокининов используют 6-бензиламинопурин (БАП) или 6-фурфуриламинопурин (кинетин) и зеатин. Полученные таким образом побеги отделяют от первичного экспланта и вновь самостоятельно культивируют на свежеприготовленной питательной среде с добавлением ауксинов, индуцирующих образование корневых примордиев (Бутенко, 1960; Шевелуха, 2003).

Часто в качестве экспланта используют верхушечные или пазушные почки, которые изолируют из побега и помещают на питательную среду с цитокининами. Образующиеся пучки делят на отдельные побеги, которые при необходимости черенкуют и переносят на свежую питательную среду. После необходимого числа пассажей побеги укореняют *in vitro*, добавляя в питательную среду ауксины, а затем переносят в почву, где создают условия, способствующие адаптации растений. Так, при размножении герберы методом активации пазушных меристем можно получить до 1 млн растений-регенерантов в год (Катаева, Бутенко, 1982).

Вторым типом микроклонального размножения растений является индукция возникновения почек или эмбриоидов *de novo*. Его можно подразделить на несколько направлений (рис. 1). Один из них – это гистогенез (дифференциация с образованием тканей). В массе каллусных клеток появляются сообщества специализированных клеток напоминающие различные ткани. Так, в каллусной ткани могут образовываться трихомы и элементы сосудистой системы. Вторым путем развития клеток в культуре *in vitro* – это органогенез, образование монополярных структур. Это более высокая, чем гистогенез, степень дифференциации каллусных клеток.

Третьим направлением клеточной дифференциации в культуре клеток является соматический эмбриогенез (эмбриоидогенез). При этом формируются биполярные структуры – соматические зародыши (эмбриоиды), которые в большинстве случаев со временем утра-

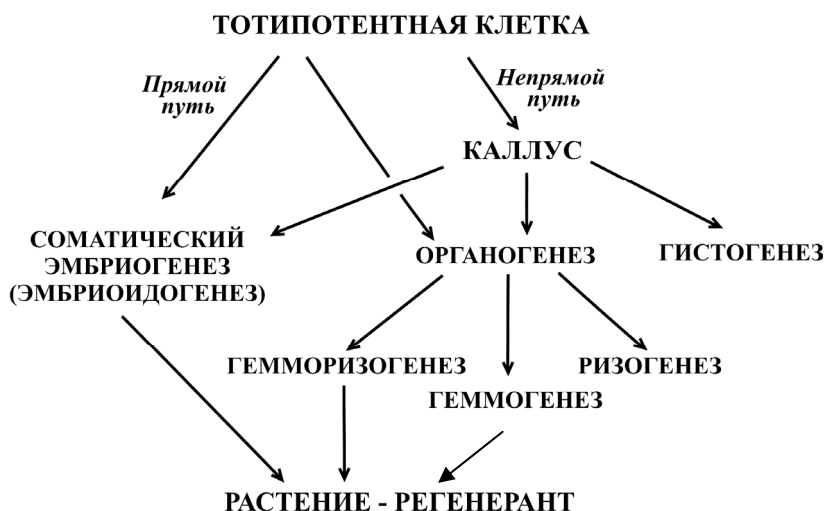


Рис. 1. Морфогенетические пути развития клетки *in vitro* (по: Батыгина, 1999, с изменениями)

чивают связь с материнским каллусом (Steward et al., 1958; Komamine et al., 1992). В эмбриогенной клеточной суспензии обычно формируются независимые биполярные эмбриоиды. Те и другие способны развиваться в целое растение (Батыгина, 1999). Как правило, соматические эмбриоиды проходят основные стадии формирования эмбриоидов, соответствующие стадиям развития зиготических зародышей (глобулярной, сердцевидной, торпедовидной) (Steward et al., 1958; Батыгина, Васильева, 2002). Исключение составляет стадия зиготы, которая может иметь аналогию *in vitro* только в том случае, когда соматический эмбриогенез стартует от одной специализированной клетки.

Образование соматических эмбриоидов может происходить прямым и непрямым путем. Прямой соматический эмбриогенез заключается в формировании эмбриоида из одной или нескольких клеток ткани экспланта без образования стадии промежуточного каллуса (Halperin, Wetherell, 1964; Катаева, Бутенко, 1983; Pareek, Kothari, 2003). При непрямом соматическом эмбриогенезе первоначально образуется каллус, в котором формируются эмбриогенные клеточные комплексы (ЭКК). В ЭКК с течением времени происходит развитие проэмбриональных структур, впоследствии формиру-

ются биполярные эмбриониды (Гумерова и др., 2003; Ryschka et al., 1991; Atmane et al., 2000; Rout et al., 2000).

Явление соматического эмбриогенеза в культуре клеток и тканей обнаружено у представителей более 150 видов из более чем 30 семейств цветковых растений, например, рис, соя, дуб, яблони (Heuser et al., 1983; Raghava Ram, Nabors, 1985; Ozawa, Komamine, 1989; Ikeda-Iwai et al., 2002). На основе этого способа регенерации растений была создана техника искусственных семян. Соматические эмбриониды, в отличие от зиготических и полученных из зигот семян, не имеют эндосперма и не могут обеспечить себя питательными веществами, поэтому предлагается заключать эмбриониды в капсулу из желатина с элементами питательной среды и с повышенным содержанием сахарозы. По мнению специалистов, искусственные семена, в первую очередь, перспективно использовать для гибридных овощных культур и для размножения генетически трансформированного материала (Лутова, 2003).

Соматический эмбриогенез с точки зрения биотехнологии имеет преимущество перед органогенезом. Растение-регенерант, развившееся из соматического зародыша, является изначально целым растением, оно имеет побег и корень и развивается под действием своей собственной гормональной регуляторной системы. В то время как регенеранты, полученные на основе геммогенеза, не всегда имеют собственные корни и нуждаются в укоренении, что нередко составляет нелегкую задачу (Батыгина, 1997; Бутенко, 1999).

Практикуется также способ регенерации растений из изолированных зиготических зародышей. При этом зиготический зародыш изолируют из семени или семязачатка, помещают в искусственные условия, заменяющие эндосперм (Третьякова, Новоселова, 2003). Этот метод особенно эффективен для получения ценных форм растений, которые не могут быть получены с помощью традиционных методов вследствие некроза эндосперма, а также для воспроизведения этапов развития зиготического зародыша (Kranz, Kumlehn, 1999).

Методы клонального микроразмножения *in vitro* и культуры изолированных клеток и тканей позволяют решать важные вопросы в размножении и селекции и получать за более короткий промежуток времени генетически однородный безвирусный посадочный материал с высоким коэффициентом размножения. Кроме цветочных культур с помощью микроклонирования размножают цитрусовые, виноград, картофель и в последнее время – древесные культуры. Для

некоторых культур, таких как картофель, технология клонального размножения поставлена на промышленную основу.

Несмотря на многолетнюю историю существования метода культуры клеток и тканей, многочисленные разработки конкретных методик по реализации различных морфогенетических путей не всегда применимы к конкретным объектам, т.к. клеточные и молекулярные основы и механизмы морфогенеза остаются малоизученными и требуют более глубоких исследований.

Еще одним методом биотехнологии растений является криоконсервирование. Это сохранение культуры клеток и тканей, семенного материала новых и перспективных сортов, лекарственных и редких видов растений без занятия посевных площадей. Он позволяет селекционерам использовать в любое время генотипы, обладающие искомыми признаками (пыльцу для проведения гибридизации; семена, не способные переносить обезвоживание; трансформированные, мутантные, гибридные клетки разных видов растений, способных к морфогенезу *in vitro*; зиготические и соматические зародыши и т.д.).

ПОЛУЧЕНИЕ СОМАТИЧЕСКИХ ГИБРИДОВ МЕТОДОМ СЛИЯНИЯ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПРОТОПЛАСТОВ

Соматическая (парасексуальная) гибридизация – создание неполовых гибридов путем слияния изолированных протопластов, полученных из соматических клеток. Использование соматической гибридизации позволяет скрещивать филогенетически отдаленные виды растений; получать асимметричные гибриды, несущие генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами, органеллами или цитоплазмой другого; проводить слияние трех и более клеток; получать гибриды, представляющие сумму генотипов родителей; переводить мутации в гетерозиготное состояние и получать жизнеспособные формы растений; получать растения, гетерозиготные по внеядерным генам и др. (Кузьмина, 2005).

Протопласты выделяют из клеток листьев, меристем, стебля или из каллусных, суспензионных клеток. Они являются уникальной моделью для изучения фундаментальных физиологических функций у растений, незаменимы при изучении состава, структуры и функционирования плазмалеммы в норме и при воздействии на нее гормонами, ингибиторами, фитотоксинами, а также при взаимодействии самих протопластов в популяции.

Выделение протопластов растительных клеток путем их плазмолиза и механистического разрушения клеточной стенки было осуществлено еще в конце XIX в. Метод изолированных протопластов получил развитие лишь после того, как в 1960 г. I.K. Cocking (1960) впервые осуществил ферментированное разрушение клеточной стенки и выделил голые протопласты.

В настоящее время продолжается разработка и совершенствование методов выделения и культивирования протопластов на искусственных питательных средах, используемых для культуры изолированных клеток и тканей, но с повышенным осмотическим давлением на первых этапах культивирования. Это обеспечивается высокой концентрацией маннита или CaCl_2 .

Слияние протопластов может происходить спонтанно (чаще у протопластов из молодых тканей или суспензионных культур) и индуцировано. Для стимуляции слияния протопластов предложен ряд методов, как физических, так и химических. Для индукции слияния протопластов используют методику с применением полиэтиленгликоля (ПЭГ) (рН 9-11, концентрация Ca^{2+} 100-300 ммоль/л), которая дает до 50% слившихся протопластов. Предварительно протопласты агглютинируют концентрированным раствором полиэтиленгликоля. Предполагается, что рН и ионы кальция увеличивают текучесть мембран, что связано с их жидкостно-мозаичной структурой. Для слияния протопластов также используют физический метод с применением импульсов электромагнитного тока в качестве индуктора. Слияние протопластов приводит к образованию либо гибрида, либо цибрида. Соматический гибрид получают при слиянии как цитоплазмы, так и ядер обоих протопластов. Цибрид (цитоплазматический гибрид) содержит цитоплазму обоих родителей и ядро одного из них. Цибриды получают, облучая перед слиянием один из протопластов γ -лучами для разрушения ядра. Скрининг таких клеток проводится по генам – маркерам ядерного и цитоплазматических (митохондриального и хлоропластного) геномов.

При слиянии могут образовываться и так называемые асимметричные гибриды – продукты слияния, имеющие полный хромосомный набор одного из партнеров и часть хромосом другого партнера. Такие гибриды часто возникают при слиянии клеток организмов, филогенетически удаленных друг от друга. В этом случае вследствие неправильных делений клетки, обусловленных некоординированным поведением двух разнородных наборов хромосом, в ряду поколений теряются частично или полностью хромосомы од-

ного из родителей. Асимметричные гибриды бывают устойчивее, плодovitее и жизнеспособнее, чем симметричные, несущие полные наборы генов родительских клеток. В целях асимметричной гибридизации возможна избирательная обработка клеток одного из родителей для разрушения части его хромосом. Возможен прицельный перенос в клетку нужной хромосомы. Из таких гибридных клеток могут быть выращены растения–регенеранты.

Первый зрелый межвидовой гибрид, полученный в результате парасексуальной гибридизации протопластов двух сортов табака (*Nicotiana glauca* с 24 хромосомами и *N. langsdorfii* с 18 хромосомами) описан в 1972 г. (Carlson et al, 1972). Каллус амфиплоидного гибрида мог расти на безгормональной среде. Гибридное растение цвело. Впоследствии были получены жизнеспособные внутривидовые, межвидовые и межродовые гибриды (Кузьмина, 2005).

Изучение межцарственных гибридов клеток «животное × растение» показало, что на этапе слияния видоспецифичность не проявляется, поэтому можно слить даже животную и растительную клетки. На более поздних этапах онтогенеза эти различия сказываются, что было установлено в экспериментах по слиянию протопластов арабидопсиса и табака с лимфоцитами человека. При этом происходило слияние цитоплазмы, ядра не сливались. E. Cocking параллельно проводил изучение ультраструктуры таких гибридов, работая с клетками амфибий и протопластами моркови. После объединения клеток ядра амфибии были окружены тонким слоем собственной цитоплазмы, но уже через 48 часов отмечались полное смешивание цитоплазмы и регенерация клеточной стенки вокруг гетерокариона. Это доказывает, что использование изолированных протопластов открывает широкие перспективы перед клеточной селекцией.

Таким образом, изолированные протопласты имеют ряд областей применения как теоретического, так и прикладного характера:

1. Изучение химии и структуры клеточной стенки (и при разрушении, и при синтезе «*de novo*»).
2. Изучение свойств плазмалеммы, трансмембранных перемещений.
3. Манипуляции с внутриклеточными органеллами.
4. Наблюдение за закономерностями дифференцировки клеток при слиянии протопластов, отслеживание взаимодействия ядра и цитоплазмы в полученной гибридной клетке, изучение соматических гибридов.

5. Введение чужеродных генов в растительную клетку (трансгенез).

На сегодняшний день широко применяют метод транзientной (временной) экспрессии нужных генов в протопластах для изучения большого спектра сигнальных механизмов растительной клетки, преимущественно работы фитохромов, гормонов (ауксинов, цитокининов), мембранного транспорта и механизмов апоптоза (Sheen, 2001). Биологическое конструирование на уровне клетки с применением протопластов может оказаться полезным и перспективным для создания клеток, клеточных систем и целых растений.

ГАПЛОИДНЫЕ РАСТЕНИЯ

Гаплоидные растения имеют важное значение для селекции, т.к. открывают возможности для ускоренного получения гомозиготных генетически стабильных линий. Обычно для стабилизации используют традиционные методы – отдаленную гибридизацию, обработку фитогормонами и температурные шоки. Но эти приемы трудоемки, требуют много времени и неэффективны вследствие низкого коэффициента выхода гаплоидных растений. Для увеличения эффективности индуцирования гаплоидов используют следующие методы: 1) андрогенез в культуре пыльников и пыльцы; 2) элиминация хромосом в гибридном зародыше (в селекции злаковых) и 3) псевдогамия – развитие гаплоидного зародыша после оплодотворения инородной пыльцой без оплодотворения яйцеклетки, или же гиногенез – развитие изолированного семязачатка.

В основе метода культуры изолированных пыльников лежит феномен андрогенеза *in vitro* – процесса образования гаплоидного растения-регенеранта из спорогенной клетки пыльника, как правило, находящейся в фазе сильновакуолизированной микроспоры (Горбунова, 1993; Круглова, 2001). Микроспоры являются уникальным объектом для изучения тотипотентности растительных клеток, процессов морфогенеза и регенерации растений на гаплоидном уровне. Достоверно установлено, что спорогенные клетки пыльника способны в условиях *in vitro* переключать программу своего развития с обычного гаметофитного пути на принципиально иной – спорофитный путь. Таким образом, спорогенные клетки в полной мере проявляют свой морфогенетический потенциал, вплоть до развития целого растения-регенеранта, причем контролируемые условия позволяют управлять этим процессом (Горбунова, 1993; Круглова, 2000;

Wang et al., 2000; Chupreau et al., 1998). Процесс культивирования пыльников связан с реализацией двух путей спорофитного морфогенеза *in vitro* – каллусогенеза и соматического эмбриогенеза (Reynolds, 1997; Круглова, Куксо, 2006).

Впервые гаплоидные растения были получены индийскими исследователями S. Guha и S. Maheshwari (1964) при культивировании пыльников *Datura innoxia* L. С тех пор этим методом получены гаплоидные растения более чем у 200 видов, в том числе у пшеницы, ячменя, ржи, риса, картофеля и других культур. Для культуры пыльников используют целые пыльники, стерильно выделенные из бутонов в определенной фазе развития. Их помещают на твердую питательную среду либо на поверхность жидкой питательной среды. В редких случаях культивируют бутоны или соцветия.

Получение гаплоидных растений из изолированных пыльников может идти по трем направлениям: индукция соматического эмбриогенеза из культуры изолированных микроспор, прямая регенерация соматических зародышей и косвенная – через каллусогенез (рис. 2). В первом случае микроспоры, освобожденные от соматических тканей пыльника, в жидкой среде начинают делиться и формировать эмбриониды, развивающиеся затем в гаплоидные растения. Во втором – внутри пыльников из отдельных пыльцевых зерен формируются проэмбриональные структуры, которые при определенных условиях культивирования развиваются в эмбриониды, дающие начало гаплоидным растениям. В третьем – пыльца делится, но клетки, возникшие в результате делений, быстро увеличиваются в размерах и, разрывая оболочку пыльцевого зерна, образуют каллус. В результате дальнейшего морфогенеза из этих каллусных клеток регенерируют растения. При этом растения могут иметь разную степень пloidности – ди-, поли-, анеуплоидные. Последние часто стерильны, но после обработки растений колхицином (или другим антитубулиновым агентом) происходит удвоение числа хромосом, в результате чего можно получить фертильные гомозиготы (Reynolds, 1997).

Уникальность метода культуры *in vitro* изолированных пыльников состоит в том, что на сегодняшний день это единственный способ закрепить ценный гетерозисный эффект гибридов 1-го поколения (Круглова и др., 2006).

Важно отметить, что способность к андрогенезу у разных видов растений сильно варьирует. Так, некоторые виды семейств *Solanaceae* и *Brassicaceae* имеют очень высокую способность к андро-

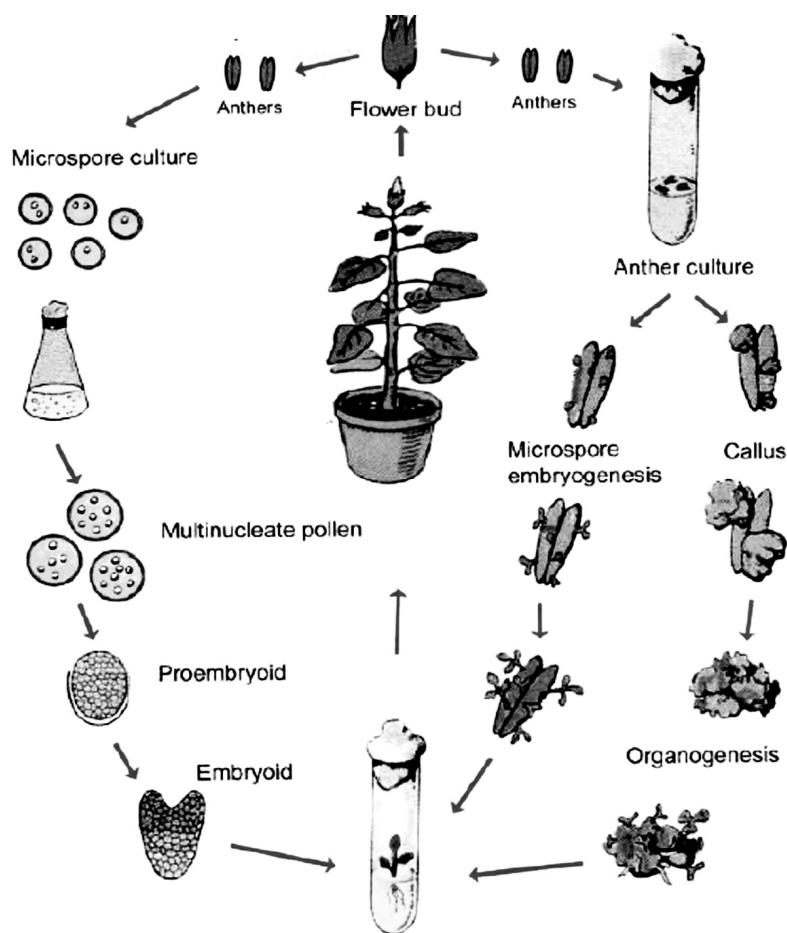


Рис. 2. Схема получения гаплоидных растений в культуре пыльников и микроспор по Reynolds (1997)

генезу, тогда как у *Poaceae* она несколько слабее, а у *Fabaceae* – сильно ограничена (Лутова, 2003).

Существенная разница наблюдается также между отдельными линиями и сортами. Дигаплоиды характеризуются более высокой частотой андрогенеза по сравнению с исходными (донорными) растениями. Способность к андрогенезу наследуется при скрещивании.

Пыльцевой соматический эмбриогенез обусловлен функциональной и структурной детерминацией пыльцевого ядра и клеток гаметофита, поэтому в развитии могут принимать участие или только вегетативные клетки, или только генеративные клетки, или оба типа клеток. Если вегетативные и генеративные клетки сольются, то образуется диплоидный эмбриоид. Например, для пасленовых характерен только соматический эмбриогенез, для злаковых – образование как каллусов, так и эмбриоидов. Среди гаплоидов много альбиносов, особенно у злаков. Наибольший выход регенерантов-альбиносов в культуре пыльцы, что вызвано, по-видимому, нарушениями развития пыльцы. Причина не установлена, возможно, это результат мутаций в микроспорах при культивировании.

При отдаленной гибридизации некоторых видов выявлена селективная элиминация (уничтожение) хромосом одного из родителей на ранней стадии развития гибридного зародыша. Это явление хорошо изучено у ячменя. При скрещивании диплоидных ячменей *Hordeum vulgare* (культурный) и *H. bulbosum* (многолетний луковичный дикий) на стадии роста зародыша и эндосперма (через 5 дней после оплодотворения) происходит выпад хромосом дикого вида. Возникает гаплоид с набором хромосом *H. vulgare*. Через 15 суток после оплодотворения рост гибридного зародыша на материнском растении прекращается, но при культивировании *in vitro* из таких зародышей развиваются проростки. Частота и количество образовавшихся растений при этом способе достаточно высоки. Следует отметить что, растения-альбиносы не образуются. С помощью этого метода были выведены сорта Исток и Одесский-115 за 4 года вместо 10-12 лет обычной селекции (Шамина, 1981). Элиминация хромосом встречается и у других родов. Если в качестве опылителя использовать дикий ячмень, то можно индуцировать гаплоиды у ржи и пшеницы.

Альтернативным методом получения гаплоидных растений является метод индукции партеногенеза в культуре семязачатков и завязей до оплодотворения (гиногенез). В ранних работах наблюдалась пролиферация соматических тканей зародышевого мешка. Впервые гаплоидный каллус из неоплодотворенного семязачатка был получен в 1964 г. Тулеком в культуре гинкго, но органогенез индуцировать не удалось. Это случилось лишь в 1976 г., когда Сан Ноум при работе с культурой неоплодотворенных завязей ячменя получил нормальные зеленые гаплоидные растения.

У растений с мужской стерильностью культивирование неоплодотворенных семязачатков является единственной возможностью получения гаплоидов. Женский гаметофит может быть источником получения гаплоидов даже у растений с низким морфогенетическим потенциалом каллусной ткани, а также если каллусная ткань регенерирует растения-альбинос. У некоторых растений, например у ячменя и риса, индукция зеленых растений намного выше при гиногенезе по сравнению с андрогенезом (Лутова, 2003).

Удвоения числа хромосом у гаплоидных растений можно достичь не только обработкой антигубулиновыми веществами, но и повторным введением в культуру *in vitro*. В этом случае в качестве экспланта используют стебли и черешки листьев, которые помещают на питательную среду для индукции каллуса. После нескольких пассажей такие каллусы переносят на среды для морфогенеза. Для подтверждения уровня пloidности дигаплоидных растений проводят цитологический контроль. Полученные дигаплоидные растения включают в селекционно-генетические программы (Лутова, 2003).

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

В качестве инструмента прямого генетического воздействия на растения уже в течение многих лет широко применяются технологии генетической трансформации клеток, т.е. перенос чужеродной ДНК в клетку-реципиент. Основными приемами трансформации являются введение целевого гена из генома других организмов (или синтезированного искусственно) в геном реципиента для изменения его свойств и признаков, избирательная активация или блокировка генов, позволяющая вывести из строя или активировать любой ген внутри живой клетки, и целенаправленное изменение гена – мутагенез. Основными целями введения чужеродного гена (генов) являются повышение сельскохозяйственной ценности, устойчивости к патогенам и декоративных качеств культурных растений. Трансгенные растения или их клеточные культуры служат живыми биореакторами при малозатратном производстве экономически важных белков и метаболитов (Glick, Pasternak, 2002). Применяя специальные приемы и оборудование, из одной клетки, созданной с помощью генноинженерных методов, может быть регенерировано фертильное растение, несущее чужеродные гены. Генетическая трансформация позволяет решать и фундаментальные задачи, в частности, изучать действие генов в ходе дифференциации клетки, развития растения и других биологических процессов (Akasaka-Kennedy et al., 2004).

За последние годы кроме маркерных генов изолированы, клонированы и перенесены в геномы растений чужеродные гены, определяющие устойчивость к гербицидам (Тищенко, Моргунов, 2004), насекомым-вредителям, вирусам, а также гены, ответственные за синтез запасных белков (Vetten et al., 2003). Большинство чужеродных генов в клетках растения экспрессируется нормально, стабильно наследуется и не влияет негативно на фенотип растения-хозяина и его потомства (Глазко, Глазко, 2003). Первые трансгенные растения (растения табака со встроенными генами из микроорганизмов) были получены в США в 1983 г. Первые трансгенные продукты появились в продаже в США в 1994 г., после прохождения всех необходимых тестов на токсичность, аллергенность, мутагенность и т.д. Это были томаты Flavr Savr с замедленным созреванием, созданные фирмой «Calgen», а также гербицидустойчивая соя компании «Monsanto». Уже через 2 года биотехнологические фирмы поставили на рынок целый ряд генетически измененных растений: томатов, кукурузы, картофеля, табака, сои, рапса, кабачков, редиса, хлопчатника (Лещинская, 1996).

Наиболее остро стоит вопрос о получении растений, устойчивых к вредителям сельского хозяйства. Традиционно для этого используют ген *bt*, продуктом которого является бактериальный токсин *Bacillus thuringiensis*. Эта тюрингская бактерия продуцирует крупный белок (протоксин), контролируемый геном *bt*, который, попадая в кишечник личинок насекомых, разрушается под действием ферментов, а его фрагмент (эндотоксин) приводит к их гибели. В настоящее время уже синтезирован искусственный ген *bt*, конструкция с которым более эффективна, а сами трансгенные растения обладают широким спектром устойчивости к насекомым. Трансгенные растения картофеля, хлопка, кукурузы с геном *bt* уже производятся фирмами «Monsanto», «Ciba Seeds» и продаются на рынках мира, хотя дискуссии о безопасности их использовании еще не закончены (Лутова, 2000).

Получение гербицидустойчивых культурных растений позволяет удешевить их производство. По новой технологии обработки полей неселективными гербицидами можно проводить весь сезон, что улучшает результаты их применения. Но это направление генной инженерии таит ряд экологических опасностей: накопление гербицидов (или продуктов их детоксикации) в сельскохозяйственных продуктах; возможность переноса генов устойчивости к гербицидам из культивируемых растений в сорняки (возникновение «суперсор-

няков»); передозировка гербицидов в связи с возможностью вносить их избыток на поля без видимого вреда, что увеличит сток гербицидов с полей в водоемы и грунтовые воды. Таким образом, использование гербицидустойчивых трансгенных растений является наиболее опасной из разрабатываемых технологий.

В последние годы ученые используют новый подход для получения трансгенных растений с «antisense RNA» (антисмысловой РНК), который позволяет управлять работой интересующего гена. В этом случае при конструировании вектора копию ДНК (к-ДНК) встраиваемого гена переворачивают на 180°. В результате в трансгенном растении образуются нормальная молекула мРНК и перевернутая, которая в силу комплементарности нормальной мРНК образует с ней комплекс, и закодированный белок не синтезируется (Лутова, 2000). Такой подход впервые был использован для получения трансгенных растений томатов с улучшенным качеством плодов. Вектор включал к-ДНК гена *PG*, контролирующего синтез полигалактуроназы (polygalacturonase) – фермента, участвующего в разрушении пектина (основного компонента межклеточного пространства растительных тканей). Продукт гена *PG* синтезируется в период созревания плодов томатов, а увеличение его количества приводит к тому, что томаты становятся более мягкими, что значительно сокращает срок их хранения. Отключение этого гена в трансгенах позволило получить растения томатов с новыми свойствами плодов, которые значительно дольше сохранялись, и сами растения при этом были более устойчивы к грибным заболеваниям.

Таким образом, стратегия антисмысловых конструкций широко применима для модификации экспрессии генов. Эта стратегия используется не только для получения растений с новыми качествами, но и для фундаментальных исследований в генетике растений.

К настоящему моменту разработано несколько эффективных методов переноса ДНК в геном клетки растения: микроинъекция, электропорация, упаковка в липосомы, баллистическая трансфекция и прямая трансформация ДНК (Пирузян, 1988; Bhat, Srinivasan, 2002). Введение в клетку генетической информации осуществляется с помощью специально сконструированных генноинженерными методами систем, которые называют векторами. Для высших растений наиболее часто применяются векторы, разработанные на основе агробактерий. Установлено, что только около 3 % из 257 видов однодольных растений чувствительны к агробактериальной трансформации, из них наиболее восприимчивыми являются представители се-

мейств *Liliaceae* и *Amaryllidaceae*, в то время как у двудольных растений эта цифра увеличивается – более 60 % видов (Глазко, Глазко, 2003).

Областей применения трансгенных разработок так много, что все имеющиеся сведения невозможно изложить в рамках одной статьи. На уровне лабораторных экспериментов ведутся работы по получению растений, устойчивых к холоду, тяжелым металлам, повышенному содержанию солей и др. Не менее интересен и другой аспект работ – получение трансгенных растений с измененными декоративными свойствами. Например, получены растения петунии с разноцветными цветками, на очереди голубые розы с геном, контролирующим синтез голубого пигмента, клонированным из дельфиниума (Лутова, 2000).

Генетически модифицированные культуры сегодня в мире занимают площадь 8,1 млн га, а продажи ежегодно растут на 20%. Крупнейшим в мире производителем и потребителем генетически модифицированных растений является США (35,7 млн га пахотных земель), далее следуют Аргентина (11,8 млн га), Канада (3,2 млн га) и Китай (1,5 млн га). Основной генетически измененной культурой остается соя (35,7 млн га, что составляет 63% общей площади земель), затем кукуруза (10 млн га) и трансгенный хлопок (6,8 млн га). В настоящее время 46% всей выращиваемой сои составляют ее генетически модифицированные варианты, тогда как в 2000 г. доля трансгенной сои составляла только 36%. В странах Европейского Союза под выращивание генетически модифицированных растений отведены очень малые площади земель. Это связано с негативным общественным мнением. Правительства стран-участниц Европейского Союза в 1998 г. приняли решение запретить проведение испытаний новых генетически модифицированных растений (Маркина, 2006).

Российские ученые-биотехнологи в производстве трансгенных растений достигли определенных результатов. Например, в Институте биоорганической химии РАН и ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур создана морковь с геном тауматина, который обуславливает устойчивость к ряду заболеваний и более сладкий вкус. В Институте сельскохозяйственной биотехнологии создаются томаты с генами дифензинов, которые должны обеспечить устойчивость к грибковым заболеваниям. Институт цитологии и генетики СО РАН работает над созданием моркови с функциями так называемой «съедобной вакцины», способной препятствовать распространению болезней животных. Похожая программа реализуется в цен-

тре «Биоинженерия» РАН. Ее отличие в том, что действие «съедобной вакцины» направлено против гепатита. Это далеко не полный перечень исследований в области создания трансгенных растений, проводимых в нашей стране (Гаевский, 2006).

С увеличением доли генномодифицированных организмов (ГМО) в рационе простого обывателя все больше разгораются споры о их полезности и безвредности. Так, все больше поступает сведений как о токсичности генетически модифицированных растений, так и о снижении репродуктивности и патологических изменениях в органах тех животных, которые поглощают ГМО. По данным ветеринарно-санитарных служб Голландии, Швейцарии, Дании, агрокомпаний и специалистов Медицинского Совета Великобритании, употребление нового вида кукурузного зерна, в котором в 2-3 раза повышено содержание белка, может со временем необратимо изменить иммунную систему людей, спровоцировать онкологические и нервные заболевания (Чирков, 2002). Наиболее известными и значимыми являются исследования А. Pusztai (1998, 2001) из Университета Абердина (Великобритания). В проведенных им исследованиях было показано, что кормление крыс генномодифицированным картофелем с геном лектина луковиц подснежника в течение 10 дней приводило к угнетению иммунной системы и нарушению деятельности внутренних органов (разрушалась печень, изменялись зубная железа и селезенка, уменьшался объем мозга) по сравнению с крысами, которые питались обычным картофелем (Pusztai, 1998). Его исследования были подтверждены независимой группой 23 ученых из 13 стран мира, возглавляемой профессором Брюссельского университета Е. van Driessche. В другой серии экспериментов при включении в рацион питания крыс генномодифицированного картофеля были выявлены серьезные изменения в желудочно-кишечном тракте крыс (быстрая пролиферация клеток слизистой оболочки) (Ewen, Pusztai, 1999). Однако кроме отрицательного воздействия ГМО есть и положительные стороны их создания. Сорты, полученные в результате биотехнологии, дают урожай больше, чем обыкновенные культуры. Улучшились и потребительские свойства продуктов. Например, из ГМ-кукурузы, соевых бобов и рапса получается растительное масло, в котором снижено количество насыщенных жиров. Усовершенствованные помидоры, тыква и картофель лучше сохраняют витамины С, Е и бета-каротин. Рис – основной продукт питания во многих развивающихся странах – содержит витамин А и железо, что избавляет от тяжелых болезней, порожденных их дефицитом.

В России на сегодняшний день к выращиванию на полях не разрешено ни одно трансгенное растение. Испытания проводятся только на специальных полигонах под строгим контролем. Основным нормативным документом в сфере производства, импорта и реализации ГМ-продуктов является Закон РФ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» от 05.07.1996 г. № 86-ФЗ. Статья 11 этого Закона прямо устанавливает: «Продукция (услуги), полученная с применением методов генно-инженерной деятельности, должна соответствовать требованиям экологической безопасности, санитарных норм, фармакопейных статей, обязательным требованиям государственных стандартов РФ».

Во всем мире нет единого мнения по отношению к генномодифицированным организмам, поэтому каждый потребитель сам решает, как относиться к новым чудо-растениям.

ЛИТЕРАТУРА

- Анапиев Б.Б.** Культура микроспор и гаплоидная биотехнология пшеницы / Под. ред. И.Р. Рахимбаева. Алматы, 2001. 220 с.
- Батыгина Т.Б.** Эмбриогенез и морфогенез половых и соматических зародышей // Физиол. раст. 1999. Т. 6. № 6. С. 884-898.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е.** Размножение растений. СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2002. 232 с.
- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е., Маметьева Т.Б.** Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro*. Эмбриогенез у покрытосеменных растений // Бот. журн. 1978. Т. 63. № 1. С. 87-110.
- Батыгина Т.Б., Титова Г.Е., Шамров И.И., Брагина Е.А., Васильева В.Е., Рудской И.В.** Проблема ствольных клеток у растений (с позиций эмбриологии) // Матер. X школы по теор. морфол. раст. Киров, 2004. С. 20-30.
- Беккр М.Е., Лиепиньш Г.К., Райпулис Е.П.** Биотехнология. М.: Агропромиздат, 1990. 333 с.
- Биотехнология** / Отв. редактор А.А. Баев. М.: Наука, 1984. 309 с.
- Бутенко Р.Г.** Применение метода культуры изолированных верхушечных почек для изучения процесса роста и органогенеза растений // Физиол. раст. 1960. Т. 7. № 6. С. 715-723.
- Бутенко Р.Г.** Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, 1964. 272 с.
- Бутенко Р.Г.** Индукция морфогенеза в культуре тканей растений // Гормональная регуляция онтогенеза растений М.: Наука, 1984. С. 42-54.
- Бутенко Р.Г.** Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.

- Бутенко Р., Кучко А.** Физиологические аспекты получения, культивирования и гибридизации изолированных протопластов картофеля // Физиол. раст. 1979. Т. 26. № 5. С. 1110-1118.
- Быков В.А., Крылов И.А., Манаков М.Н.** и др. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. М.: Вышш. шк., 1987. 142 с.
- Гаевский Н.А.** Трансгенные растения // <http://edu.krasu.ru/mod/resource/view.php?id=1694>. 2006.
- Гинтер Е.К.** Генотерапия наследственных болезней. // Биомед. химия. 2000. № 3; <http://medi.ru/pbmc/8800306.htm>
- Глазко В.И., Глазко Г.В.** Введение в генетику: биоинформатика, ДНК-технология, генная терапия, ДНК-экология, протеомика, метаболика. Киев: Изд-во КВИЦ, 2003. 639 с.
- Горбунова В.Ю.** Генетические предпосылки спорофитного пути развития микроспор злаков в условиях *in vitro*. Уфа: УНЦ РАН, 1993. 104 с.
- Гумерова Е.А., Галеева Е.И., Чуенкова С.А., Румянцева Н.И.** Соматический эмбриогенез и геммогенез в культуре тканей гипокотилей *Fagopyrum esculentum* // Физиол. раст. 2003. Т. 50. № 5. С. 716-721.
- Евтушенко А.Н., Фомичев Ю.К.** Введение в биотехнологию: Курс лекций. Минск: БГУ, 2002. 105 с.
- Еще о трансгенных растениях: мнения специалистов** // SciDev.Net, 20 декабря 2004 г. <http://www.cbio.ru/modules/news/print.php?storyid=577>
- Катаева Н.В., Аветисов В.А.** Клональное размножение в культуре ткани // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С. 137-149.
- Катаева Н.В., Бутенко Р.Г.** Принципы микроклонального размножения растений на примере герберы // Изв. АН СССР. Сер. биол. 1982. № 1. С. 126-130.
- Катаева Н.В., Бутенко Р.Г.** Клональное микроразмножение растений. М.: Наука, 1983. 96 с.
- Квеситадзе Г.И., Безбородов А.М.** Введение в биотехнологию. М: Наука, 2002. 347 с.
- Круглова Н.Н.** Андроκлиния с позиции экспериментальной эмбриологии растений: унификация терминологии // Вестн. Башкир. ун-та. 2001. № 2. Ч. 1. С. 135-137.
- Круглова Н.Н.** Морфогенез в культуре пыльников пшеницы: эмбриологический подход. Уфа: Гилем, 2001. 175 с.
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б.** Биотехнология получения *in vitro* гибридов яровой мягкой пшеницы с закрепленным гетерозисным эффектом // 3-я междунар. конф. из серии «Наука и бизнес», 2006. http://www.rusbio.biz/ru/nb2006_content.shtml
- Круглова Н.Н., Батыгина Т.Б., Сельдимирова О.А.** Морфогенетический потенциал репродуктивных клеток пыльника злаков // Усп. соврем. биол. 2000. Т. 120. Вып. 5. С. 490-500

- Круглова Н.Н., Куксо П.А.** Начальный этап индукция андроклинии // Усп. соврем. биол. 2006. Т. 126. № 5. С. 462-471.
- Кузьмина Н.А.** Основы биотехнологии // <http://www.biotechnolog.ru/>, 2005.
- Лещинская И.Б.** Генетическая инженерия // Соросовский образовательный журн. 1996. № 1. С. 32-39.
- Лещинская И.Б.** Современная промышленная микробиология // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6. № 4. С. 14-18.
- Лутова Л.А.** Генетическая инженерия растений // Соросовский образовательный журн. 2000. Т. 6. № 10. С. 10-17.
- Лутова Л.А.** Биотехнология высших растений. СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2003. 228 с.
- Маркина Н.** От биотехнологии – к биоэкономике // http://www.inform-nauka.ru/rus/eve-2006-12_r.shtml
- Найдыш В.М.** Концепции современного естествознания. М.: Юнити, 2004. 622 с.
- Пирузян Э.С.** Основы генетической инженерии растений. М.: Наука, 1988. 303 с.
- Семенова М.Л.** Зачем нужны трансгенные животные // Соросовский образовательный журн. 2001. Т. 7. № 4. С. 13-20.
- Шевелуха В.С., Калашникова Е.А., Дегтярев С.В.** и др. Сельскохозяйственная биотехнология: Учеб. / Под ред. В.С. Шевелухи. М.: Высш. шк., 2003. 496 с.
- Тищенко Е.Н., Моргунов Б.В.** Экспрессия трансгенов, проблемы и стратегии для практического применения // Физиол. и биохим. культ. раст. 2004. Т. 36. № 4. С. 279-290.
- Третьякова И.Н., Новоселова Н.В.** Особенности развития мегagamетофитов и зародышей сосны кедровой сибирской в культуре *in vitro* // Онтогенез. 2003. Т. 34. № 4. С. 282-291.
- Чирков Ю.Г.** Время химер. Большие генные игры. М.: ИКЦ «Академкнига», 2002. 397с.
- Шамина З.Б.** Андрогенез и получение гаплоидов в культуре пыльников и микроспор // Культура клеток растений. М.: Наука, 1981. С. 124-136.
- Akasaka-Kennedy Y., Tomita K., Ezura H.** Efficient plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation via somatic embryogenesis in melon (*Cucumis melo* L.) // Plant Sci. 2004. Vol. 166. P. 763-769.
- Atmane N., Blervacq A.S., Michaux-Ferriere N., Vasseur J.** Histological analysis of indirect somatic embryogenesis in the Mach clubmoss *Lycopodiella inundata* (L.) Holub (Pteridophytes) // Plant Sci. 2000. Vol. 156. P. 159-167.
- Bhat S.R., Srinivasan S.** Molecular and genetic analyses of transgenic plants: considerations and approaches // Plant Sci. 2002. Vol. 163. P. 673-681.
- Briggs R , King T. J.** Transplantation of living nuclei // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1952. Vol. 38. P. 455-463.

- Carlson P.S., Smith H.H., Dearing R.D.** Parasexual interspecific plant hybridization // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. Vol. 69, p. 2292-2294.
- Chupeau Y., Caboche M., Henry Y.** (eds.). Androgenesis and haploid plants (in memory of J.-P.Bourgin). Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer-Verlag, 1998. 297 p.
- Clement C., Pacini E., Aurdan J.C.** (eds.). Anther and pollen. From biology to biotechnology. Berlin; Heidelberg; N.Y.: Springer-Verlag, 1999. 318 p.
- Cocking E.C.** A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles // Nature. 1960. Vol. 187. P. 962-965.
- Ewen S.W., Pusztai A.** Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing Galanthus nivalis lectin on rat small intestine // Lancet. 1999. Vol. 354. No. 9187. P. 1353-1354.
- French** Biotechnology Industry Association, 2002 // <http://www.france-biotech.org>
- Haberlandt G.** Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen // Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien, math.-naturw. – KL. 1902. Bd. 111. S. 69-92.
- Heyser J.W., Dykes T.A., DeMott K.J., Nabors M.W.** High frequency, long term regeneration of rice from callus culture // Plant Sci. Let. 1983. Vol. 29. P. 175-182.
- Gautheret R.** Sur la culture d'extremities de raciness // C.r. soc. bil., Paris. 1932. Bd. 109. P. 1236-1238.
- Glick B., Pasternak J.** Molecular Biotechnology. Principles and applications of recombinant DNA. 2nd ed. Washington: ASM Press., 1998. 589 p.
- Guha S., Maheshwari S.** *In vitro* production of embryos from anther of Datura // Nature. 1964. Vol. 204. No. 4957. P. 497.
- Ikedai-Iwai M., Satoh S., Kamada H.** Establishment of reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos // J. Exp. Bot. 2002. Vol. 53. No. 374. P. 1575-1580.
- Khan M. Y., Dahot M. U., Khan M. Yousuf** Single cell protein in production by *Penicillium Javanicum* from pretreated rice husk // J. Islamic Acad. Sci. 1992. Vol. 5. No. 1. P. 39-43.
- Knudson L.** Viability of detached root-cap cells // Amer. J. Bot. 1919. Vol. 6. P. 309-310.
- Komamine A., Kawahara R., Matsumoto M., Sunabori S., Toya T., Fujiiwara A., Tsukahara M., Smith J., Ito M., Fukuda H., Nomura K., Fujimura T.** Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry, and molecular biology // *In vitro* Cell. Dev. Biol. 1992. Vol. 28. No. 1. P. 11-14.
- Kranz E., Kumlehn J.** Angiosperm fertilization, embryo and endosperm development in vitro // Plant sci. 1999. Vol. 142. P. 183-197.
- Lamprecht W.** Über die Kultur and Transplantation kleiner Blattstückchen // Beitr. allg. Bot. 1918. Bd. 1. S. 353-398.

- McGrath J, Solter D.** Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro // Science. 1984a. Vol. 226. P. 1317-1319.
- McGrath J, Solter D.** Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes // Cell. 1984b. Vol. 37. P. 179-183.
- Molliard M.** Sur le developpement des plantules fragmentees // Compt. rend. Soc. biol. 1921. T. 84. P. 770-772.
- Murashige T.** Plant propagation through tissue culture // Plant Tissue Cult. and Its Bio-technol. Appl., B. ets. N.Y.: Springer-Verlag, 1977. P. 392-403.
- Ozawa K., Komamine A.** Establishment of a system of high-frequency embryogenesis from long term cell suspension cultures of rice (*Oryza sativa* L.) // Theor. Appl. Genet. 1989. Vol. 77. No. 2. P. 205-211.
- Pareek A., Kothari S.L.** Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus* // Scientia Horticulturae. 2003. Vol. 98. P. 449-459.
- Pusztai A.** Report of Project Coordinator on data produced at the Rowett Research Institute. SOAEFD flexible Fund Project RO 818. 22 Oct. 1998 // <http://www.rowett.ac.uk/gmo/>
- Pusztai A.** Genetically Modified Foods: Are They a Risk to Human / Animal Health // Biotechnology: genetically modified organisms. 2001. (*An ActionBioscience.org original article*) // <http://www.actionbioscience.org/biotech/pusztai.html>
- Peer review vindicates scientist let go for «improper» warning about genetically modified food // “naturalSCIENCE” Heron Publishing, Victoria, Canada. 1999. <http://naturalscience.com/ns/cover/cover8.html>
- Raghava Ram N.V., Nabors M.W.** High-frequency plant regeneration in long-term tissue cultures of rice // Tissue Cult. Forest. and Agr. Proc. 3rd Tenn. Symp., Plant Cell and Tissue Cult., Knoxville, Tenn., 9 -13 Sept., 1985. London, 1985. P. 344-345.
- Reade AE , Smith RH, Palmer RM :** The production of protein for non-ruminant feeding by growing filamentous fungi on barley // Biochem. J. 1972. Vol. 27. P. 32.
- Reynolds T.L.:** Pollen embryogenesis // Pl. Mol. Biol. 1997. Vol. 33. P. 1-10.
- Rechinger C.** Untersuchungen über die Grenzen der Teilbarkeit im Pflanzenreich // Abhandl. Zoöl. Bot. Ges., Wien. 1893. Bd. 43. S. 310-334.
- Rout G.R., Samantaray S., Das P.** *In vitro* somatic embryogenesis from callus cultures of *Cephaelis ipecacuanha* A. Richard // Scientia Horticulturae. 2000. Vol. 86. P. 71-79.
- Ryschka S., Ryschka U., Schulze J.** Anatomical studies on the development of somatic embryoids in wheat and barley explants // Biochem. Physiol. Pflanzen. 1991. Vol. 187. P. 31-41.
- Sheen J.** Signal transduction in *Maize* and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts // Plant Physiol. 2001. Vol. 127. P. 1466-1475.

- Steward F.C.**, Mapes O., Smith J. 1958. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells // Amer. J. Bot. V. 5. P. 693-703.
- Vetten N. de, Wolters A.-M., Raemakers K., Meer I. van der, Stege R. ter, Heeres E., Heeres P., Visser R.** A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop // Nat. biotechn. 2003. Vol. 21. P. 439-442.
- Vöchting H.** Über Transplantation am Pflanzenkörper. Untersuchungen zur Physiologie und Pathologie // Tübinger.
- Wang M., Bergen van S., Duijn van B.** Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding // Plant Physiol. 2000. Vol. 124. No. 2. P. 523-530.
- Willadsen S.M.** Nuclear transplantation in sheep embryos. // Nature. 1986. Vol. 320. P. 63-65.
- Wilmot I. Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cell line // Nature. 1997. Vol. 385. P. 810-813.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

«Комаровские чтения» – серийное издание, основано в 1947 г., публикует статьи по тематике докладов, сделанных на ежегодных конференциях, «Комаровских чтениях», посвященных различным проблемам ботаники. Периодичность издания – 1 выпуск в год.

Издание нацелено на широкий круг проблем исследования строения, разнообразия, распространения, функционирования, экологии, эволюции и использования растений и публикует экспериментальные, теоретические и обзорные статьи по следующим направлениям:

- Теоретические проблемы современной ботаники
- Растительный покров и его организация
- Строение и функции растительных экосистем
- Проблемы таксономии и систематика растений
- Морфология и анатомия растений
- История ботаники и ботанического образования
- Охрана и использование растительного покрова

Главным условием публикации статьи в выпуске «Комаровских чтений», является устное представление доклада на ежегодной конференции, обычно организуемой в декабре.

Функции редколлегии издания выполняет Комиссия по Комаровским чтениям, включающая ведущих специалистов в различных областях ботаники. Рукописи статей по тематике доклада принимаются комиссией и рассматриваются в течение года. Решение о включении доклада в программу Чтений принимается на основании отзывов 2 анонимных рецензентов на заседании комиссии в ноябре-декабре. При необходимости к рецензированию статьи может привлекаться 3-й рецензент.

Комиссия по Комаровским чтениям просит авторов при направлении материалов для публикации руководствоваться следующими правилами.

Статьи должны быть обязательно представлены в электронном виде и в виде распечатанной на принтере копии формата А4 с под-