

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
Высшего образования  
«Казанский государственный аграрный университет»

Г.А. Петрова, кандидат сельскохозяйственных наук  
Х.Г. Мусин, доктор сельскохозяйственных наук

**БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ  
В ЛЕСОКУЛЬТУРНОМ ПРОИЗВОДСТВЕ**

Учебное пособие для магистрантов направления подготовки  
35.04.01 «Лесное дело»

Казань, 2017

Рассмотрено и рекомендовано к изданию  
Методической комиссией факультета лесного хозяйства и экологии  
Казанского государственного аграрного университета

**Р е ц е н з е н т ы:**

Газизуллин А.Х. – д.с.-х.н., профессор, академик МАН ВШ, заслуженный лесовод России и Республики Татарстан

Сафин Р.И. – д.с.-х.н., профессор кафедры общего земледелия, защиты растений и селекции Казанского ГАУ

**Г.А. Петрова.** Биотехнология и генная инженерия в лесокультурном производстве: Учебное пособие / Петрова Г.А., Мусин Х.Г. - Казань: Казанский ГАУ, 2017. – 82 с.

Рассмотрено и одобрено:

решением кафедры лесоводства и лесных культур ФЛХиЭ (протокол № 8 от 20.02. 2017 года);

решением методической комиссии факультета лесного хозяйства и экологии (протокол № 8 от 13.03. 2017 года).

Председатель методической комиссии факультета лесного хозяйства и экологии д.б.н., профессор Сабиров А.Т.

В учебном пособии рассмотрены теоретические вопросы по разделам дисциплины «Биотехнология и генная инженерия в лесокультурном производстве». В конце каждого раздела приведены контрольные вопросы и список рекомендуемой литературы. Приведены экзаменационные вопросы и вопросы для промежуточного контроля знаний. В конце учебного пособия имеется словарь терминов. Предназначено для студентов магистратуры направления подготовки 35.04.01 «Лесное дело».

**УДК 630\*232**

@ Казанский государственный аграрный университет, 2017 г.

**Петрова Гузель Анисовна**  
**Мусин Харис Гайнутдинович**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ**  
**В ЛЕСОКУЛЬТУРНОМ ПРОИЗВОДСТВЕ**

Учебное пособие для магистрантов направления подготовки  
35.04.01 «Лесное дело»

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>1. БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ</b>	5
1.1. История и основные этапы развития биотехнологии	5
1.2. Современный уровень развития биотехнологии в мире и в Российской Федерации	13
<b>2. СТРУКТУРА И ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК</b>	17
2.1. Генетический материал клетки. ДНК, РНК их строение, черты сходства и различия	17
2.2. Деление клеток – митоз	21
2.3. Половое размножение - мейоз	25
2.4. Программы секвенирования геномов организмов	31
<b>3. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ У РАСТЕНИЙ</b>	34
3.1. Особенности применения микроклонального размножения ( <i>in vitro</i> )	34
3.2. Технология размножения растений <i>in vitro</i>	37
<b>4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ</b>	45
4.1. Основные этапы решения геноинженерной задачи	45
4.2. Генетическая инженерия у растений	48
4.3. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)	53
<b>ВОПРОСЫ ДЛЯ ПРОМЕЖУТОЧНОГО КОНТРОЛЯ</b>	59
<b>КОНТРОЛЬНОЕ ЗАДАНИЕ</b>	64
<b>СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ</b>	68
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b>	80
<b>ДЛЯ ЗАМЕТОК</b>	81

## ВВЕДЕНИЕ

## ДЛЯ ЗАМЕТОК

Дисциплина «Биотехнология и генная инженерия в лесокультурном производстве» относится к дисциплинам по выбору вариативной части профессионального цикла. Основная цель ее преподавания – профессиональная подготовка магистрантов лесного дела, владеющих теоретическими и практическими знаниями в области генной и клеточной инженерии растений. **Задачами** данного пособия являются помочь магистрантам при освоении теоретических основ генной и клеточной инженерии растений, научиться творчески применять эти знания, приобрести навыки в области размножения древесных растений методами клеточной инженерии, знать биоэкологические основы и новые технологии выращивания посадочного материала, теории и новейшие достижения практики России и в зарубежных странах в области биотехнологии.

Клеточная биотехнология - это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения (по В.С. Шевелуха, 1998).

В настоящее время методы биотехнологии в лесном хозяйстве России применяются для выращивания посадочного материала деревьев, устойчивых к различным заболеваниям и энтомовредителям, производства биологических средств защиты лесов, создания новых форм древесных растений с определенными нужными свойствами, особенно тех пород, которые плохо или совсем не размножаются традиционными способами, в том числе с применением методов генной инженерии и т.п.

## ПРИЛОЖЕНИЕ

**Состав различных питательных сред,  
применяемых при культивировании тканей растений**

Компонент среды	Концентрация веществ (мг/л) в различных питательных средах						
	WPM	ACM	Гамборга	Уайта	Нича	Као	N <sub>6</sub>
KNO <sub>3</sub>	-	-	3000	80	950	1900	2830
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400	400	-	-	720	600	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	-	2085	-	-	-
CaNO <sub>3</sub> · 4H <sub>2</sub> O	556	556	-	-	-	-	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990	990	-	-	-	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	134	-	-	-	463
CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	166	-	166
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	96	96	150	-	-	-	-
KCl	-	-	-	65	-	300	-
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	370	370	250	360	185	300	185
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	-	12	68	170	400
Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	200	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	-	-	169,6	18,7	-	-	-
Na <sub>2</sub> · ЭДТА · 2H <sub>2</sub> O	37,3	-	37,3	-	37,3	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	27,8	-	27,8	-	27,8	27,8	27,8
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	-	-	10	-	-	10	-
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3	13,2	7	25	-	4,4
ZnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	2	-
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6	2	3	10	-	1,5
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	3	1,5	10	3,6	1,5
KJ	-	0,83	0,75	0,75	-	0,75	0,8
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25	0,0025	0,25	0,25	-
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,25	0,025	0,025	0,001	0,025	0,025	-
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	-	0,025	0,025	-	-	0,25	-
Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	-	-	-	2,5	-	2,46	-
Sodium Ferric EDTA	-	30,0	-	-	-	-	-
Тиамин HCl	0,1	0,1	10	0,1	3	0,005	3
Пиридоксин HCl	0,5	0,5	1	0,5	1	0,005	1
Глицин	0,5	-	-	3	-	-	-
Лизин	-	100	-	-	-	-	-
Мезоинозит	100	100	100	-	200	100	200
Аскорбиновая кислота	-	-	-	-	3	-	3
Никотиновая кислота	0,5	0,5	1	0,5	-	-	-
Сахароза	30 000	30 000	20 000	20 000	60 000	125	60 000

## 1. БИОТЕХНОЛОГИЯ И ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

### 1.1. История и основные этапы развития биотехнологии

Биотехнология как наука представляет собой важнейший раздел современной биологии, которая в конце XX в. стала одним из ведущих приоритетов в мировой науке и экономике.

Биотехнология известна с давних времен, однако как самостоятельная прикладная наука сформировалась в середине 70-х годов XX столетия. Всплеск исследований по биотехнологии в мировой науке произошел в 80-х годах прошлого столетия, когда новые методологические и методические подходы обеспечили переход к эффективному их использованию в науке и практике и возникла реальная возможность извлечь из этого максимальный экономический эффект.

#### **Биотехнология включает в себя следующие разделы:**

**Генетическая инженерия** – технологии основаны на получении гибридных молекул ДНК и введение их в клетки бактерий, растений и животных.

**Клеточная инженерия** – технологии основаны на возможности выращивания тканей и клеток *in vitro*, слиянии соматических клеток или их протопластов.

**Биологическая инженерия** – технологии основаны на изучении биологических особенностей клеток и внедрении компьютерных методов контроля технологических режимов, позволяющих максимально реализовывать полезные свойства клеток.

Очень важным направлением биотехнологии является генная инженерия.

**Генная инженерия** – раздел молекулярной биологии, направленный на конструирование *in vitro* новых комбинаций генетического

материала, способного размножаться в клетке и синтезировать определенный продукт.

Используя методы генной инженерии в настоящее время обеспечивается экспрессия генов человека или животного в клетке микроорганизма или другого объекта и имеется реальная возможность получать в необходимых количествах дефицитные активные вещества и фармацевтические препараты, в их числе инсулин, гормоны роста, интерферон  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , интерлейкин 2, вакцина против гепатита В, вакцина против ящура, фактор крови VIII, IV и др.

В развитии генной инженерии значительную роль сыграли методы получения индивидуальных генов и их клонирование или практически неограниченное размножение в бактериальных клетках.

Техника генной инженерии включает выделение индивидуальных фрагментов ДНК любого происхождения, их стабильное воспроизведение в составе векторов, идентификация функций клонированных таким образом генов, их изменение и введение в клетки исходного или иного организма. Такая техника получила называние **техники рекомбинантной ДНК**.

Первый успешный эксперимент по выделению гена, а точнее группы генов лактозного оперона (lac-оперон) E. Coli был выполнен в 1969г. в лаборатории Дж. Беквита. Этот эксперимент принято считать началом генной инженерии. Главную роль на этапе выделения гена отводят ферментам эндонуклеазам рестрикции, или рестриктазами.

Большие задачи ставит перед генной инженерией селекция растений. На устойчивость к наиболее опасным вредителям и болезням, устойчивость к стрессам, гербицидам, солеустойчивость и др. Генная инженерия особенно перспективна при изучении процессов развития и дифференциации растений, что очень важно для оптимизации селекционного процесса.

**Цитопласт** – ограниченный мембраной участок цитоплазмы, возникший при фрагментации изолированного протопласта.

**Штамм** – культура, возникшая после первого субкультивирования, и состоящая из многих клеточных линий, возникших из клеток первичного каллуса.

**Эксплант** - это фрагмент ткани или органа, инкутируемый на питательной среде самостоятельно или используемый для получения первичного каллуса.

**Экспрессия гена** - проявление генетической информации, записанной в гене, в форме рибонуклеиновой кислоты, белка и фенотипического признака.

**Эуплоид** – ядро, клетки, организм с числом хромосом, кратным X.

**in vitro** - выращивание живого материала «в стекле», на искусственных питательных средах, в стерильных условиях.

**in vivo** - выращивание живого материала в естественных условиях.

вития при определенных условиях выращивания вплоть до образования взрослых растений и семян.

**Трансгенные, генетически модифицированные организмы (ГМО)** - растения, животные, микроорганизмы и вирусы с измененной неследственностью, вызванной включением в их геном чужеродных генов с помощью генно-инженерных методов.

**Трансляция** - синтез белка на рибосомах при участии информационной, транспортной РНК и других факторов.

**Транскрипция** - образование РНК-копии ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы.

**Трансплант** - часть каллусной (суспензионной) культуры, используемой для пересадки на свежую питательную среду.

**Фенотип** – сумма внешних признаков организмов, определяемых генотипом и условиями выращивания.

**Фитогормоны** – (гормоны растений) – биологически активные соединения, образующиеся в растениях в малых количествах, вызывающие специфический ростовой или формообразовательный эффект.

**Фиторегуляторы** - природные и синтетические препараты, вызывающие различные ростовые или формативные эффекты и не обладающие действием удобрений и гербицидов.

**Хромосомы** – генетические структурные образования ядра клетки, состоящие из ДНК и белков. В хромосомах заключена наследственная информация организма.

**Цикл выращивания** – период от помещения клеточного инокулюма или каллусного транспланта на питательную среду до последующего субкультивирования.

**Цитокинины** – фитогормоны (кинетин, 6-БАП), активизирующие развитие меристем, стимулирующие образование почек.

Молекулярная биология предлагает также методы диагностики вирусных заболеваний и идентификации фрагментов хромосом.

Исследования в области генной инженерии могут помочь снизить затраты на лесовосстановление и, тем самым, защитить нашу планету от уничтожения лесов. Однако, это очень длительный путь, на преодоление которого понадобятся многие годы.

Исследования, связанные с генной инженерией в лесном хозяйстве, проводятся в 35 странах мира, но надо отметить, что большинство этих исследований ограничиваются лабораторными опытами и лишь небольшая их часть переходит в полевые испытания. Лидером среди исследований в данной области является Китай. Сельскохозяйственный научно-исследовательский институт в г. Лайу провинции Шаньдун вместе с Шаньдунским сельскохозяйственным институтом вывели трансгенный солеустойчивый тополь. В коммерческих целях была запущена первая плантация трансгенных солеустойчивых тополей площадью около 500 га, где высажено 1,4 млн клонированных деревьев.

Все остальные страны, включая США, имеющие наибольшее количество опытных плантаций генномодифицированных деревьев, до коммерческого разведения искусственных деревьев пока не дошли.

Исследования в области генной инженерии проводятся примерно на 140 древесных породах. Около 60% научных исследований сосредоточено на пяти породах деревьев – это сосна, эвкалипт, ель, тополь и акация.

В настоящее время в России ведут работу над выведением новых быстрорастущих и высокопродуктивных сортов деревьев несколько организаций. Среди них: Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства (ВНИИЛМ, Московская область), Воронежский научно-исследовательский институт лесной гене-

тики и селекции, Сысертский лесхоз (Свердловская область) и Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск).

Первая в мире плантация клонированных сосен была заложена в Свердловской области в начале 80-х годов прошлого столетия. В тоже время в Сысертском лесхозе росли 20-летние деревья, которые отличались от природных более длинной хвоей и изогнутым стволом. Внешне они не похожи на своих сородичей – хвоя длиннее, а ствол светлый, они больше похожи на огромные ветви, растущие прямо из земли. Местные селекционеры ожидают, что, используя сысертскую технологию, в будущем можно будет заготавливать 600 кубометров древесины с гектара, а не 300–400, как сейчас.

В Сибирском институте физиологии и биохимии растений СО РАН, используя классические **методы клонирования**, вживили осине, тополю и сибирской сосне кукурузный геном. В результате этого эксперимента увеличился темп роста этих деревьев в среднем в 2 раза.

Особое значение имеют генные эксперименты с осиной. Осина – быстрорастущая древесная порода, возраст спелости ее древостоев наступает в 2-2,5 раза быстрее, нежели хвойных пород и дуба. Эта лесообразующая порода быстро растет на участках после пожаров и рубок, давая превосходный строительный материал. При всех ее положительных качествах эта порода страдает серьезным недостатком, к сожалению, осина сильно поражается грибными болезнями вызывающими сердцевинную гниль стволов, вследствие чего древесина осиновых древостоев характеризуется весьма низкой товарностью. Многие годы ученые-лесоводы думали над тем как решить эту проблему, как вырастить дерево, которое не подвержено этой болезни. Благодаря открытиям в области генной инженерии, на сегодняшний день уже научились выращивать растения, устойчивые к гербицидам и вирусам: сою, кукурузу, хлопок, помидоры, картофель, не восприимчивый к колорадскому жуку.

**Ризогенез** – процесс заложения, роста и развития корней.

**РНК** – молекула рибонуклеиновой кислоты, в состав которой входят нуклеотиды (аденин, гуанин, цитозин, урацил), рибоза и остатки фосфорной кислоты.

**Ростовой цикл** – рост популяции клеток в цикле периодического выращивания, характеризующийся сигмоидальной (S-образной) кривой. Фазы ростового цикла: латентная (лаг-фаза), экспоненциальная (лог-фаза, фаза логарифмического роста), замедления роста, стационарная, деградации.

**Слияние изолированных протопластов** – формирование одной клетки из двух и более объединением их поверхностных мембран.

**Сомаклоны** – регенеранты растений, полученные из соматических клеток и обладающие определенными отличиями от исходных форм.

**Сомаклональная вариабельность** – размах колебаний в различии признаков у растений, регенерированных из культивируемых соматических клеток.

**Соматическая гибридизация** - процесс вовлечения в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например, путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений.

**Соматический гибрид** – растение, полученное путем гибридизации изолированных протопластов.

**Стерилизация** – обработка спиртом с последующим обжигом.

**Субкультивирование** - перенос трансплантов (инокулюма) в другой культуральный сосуд на свежую питательную среду.

**Суспензионная культура** – суспензия клеток или их агрегатов (небольших групп) во взвешенном состоянии в жидкой среде при использовании аппаратуры, обеспечивающей их аэрацию и перемешивание.

**Тотипотентность** - свойство соматических клеток растений полностью реализовывать свою наследственную программу онтогенетического раз-

**Половые хромосомы** - хромосомы, определяющие пол особи (обозначаются буквами: X, Y, W, Z и т.д.).

**Пролиферация** – новообразование клеток и тканей путем размножения уже существующих.

**Промотор** - участок гена, ответственный за начало его транскрипции.

**Полиплоид** - ядро, клетка, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символы 3Х, 4Х и т.д.).

**Протопласт** – содержимое растительной клетки, лишенной клеточной стенки с помощью ферментативного разрушения или механическим способом.

**Плазмида** – основа плазмидного вектора - кольцевая двухцепочечная ДНК, обладающая способностью к автономной репликации, а так же к встраиванию в неё и передачи в геном реципиента чужеродных генов и других последовательностей ДНК.

**Профаг** - фаговый геном, интегрированный в бактериальную хромосому.

**Регенерация** – восстановление целостного организма из клетки, ткани, органа.

**Редифференциация** – переход специализированных клеток из одного состояния дифференцировки в другое с предшествующими делениями или непосредственно.

**Репликация (редупликация) ДНК** - самоудвоение молекулы ДНК путем образования ее копии при помощи набора ферментов (ДНК-полимераз, лигаз и др.).

**Рекомбинантный ген** – ген, состоящий из компонентов различных генов.

**Рекомбинация** - перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинативной изменчивости.

**Рецессив** – ген или генетически обусловленный признак, проявляющийся в диплоидной клетке или организме при условии, когда оба набора хромосом несут данные гены.

Что же касается древесных пород, то проведенные исследования показали, что темпы роста трансгенной осины оказались в 2-2,5 раза выше, чем у природных сородичей. В течение двух лет молодые побеги осины достигли высоты 50-70 см.

Трансгенные осины содержат в своем геноме фрагмент чужеродной ДНК, которая увеличивает образование гормона ауксина. Этот гормон способствует ускорению роста, что может позволить вырастить деревья, которые в короткие сроки смогут стать промышленным сырьем и при этом избежать заражения сердцевинной гнилью.

Исследованиями осины так же много лет занимается Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства (ВНИИЛМ) в Пушкино.

В середине XX века известные селекционеры Яблков и Иванников нашли в природе исполинскую триплоидную осину (с тройным набором хромосом в геноме). Она обладала быстрым ростом и высокой устойчивостью к сердцевинной гнили. Эти ученые первыми приступили к изучению этой породы.

В Воронежском научно-исследовательском институте лесной генетики и селекции около двух лет посвятили изучению проблеме изменения генной структуры тополя. Однако из-за недостатка финансирования вся работа, к сожалению, так и осталась на стадии первичных разработок.

Деревья являются самыми «сложными» объектами для исследований: сроки их созревания даже после генетической модификации исчисляются годами, что усложняет проведение опытов над ними.

Трансгенные деревья в России пока выращивают только в лабораторных условиях, высаживать их в лесу или в поле ученые опасаются. Несмотря на большой прогресс в науке, польза трансгенов пока остается под вопросом. Нельзя с уверенностью спрогнозировать, как будет вести

себя трансгенное дерево в природе. Опасность заключается в том, что трансгенное дерево, абсолютно защищенное от сердцевинной гнили, с его ускоренными темпами роста, вполне может вытеснить в естественной среде остальные виды деревьев. С другой стороны, ученые опасаются, что вставка чужеродного гена может привести к сбоям в процессе деления клеток, и растение окажется неспособным к размножению. Такая ошибка будет накапливаться в популяции, в результате чего весь вид осины может оказаться под угрозой вымирания. Последствия таких просчетов пока непредсказуемы, поэтому многие из ученых-селекционеров не торопятся высаживать трансгенные растения в природные условия. Поэтому Российские научные центры пока не ставят своей целью получение «совершенной» осины с целью ее коммерческого использования. В связи с этим, главной задачей ученых на сегодняшний день является изучение влияния трансгенных деревьев на природные популяции деревьев.

Работы над созданием новых форм осины ведутся не только в России. Несколько лет назад на Международном конгрессе физиологов растений Европы в Варне группа ученых из Израиля сообщила о получении ими трансгенной осины, способной расти в условиях засушливого климата.

Венгерские исследователи тоже проводили исследования с данной породой. Они ввели в геном дикой осины фрагмент ДНК, повышающий устойчивость к морозам, засухе и, возможно, к сердцевинной гнили.

Дальше всех продвинулась австралийская компания Fast Forests Inc, недавно продемонстрировавшая миру новую породу деревьев SupaTree. Новая порода лиственных деревьев SupaTree, созданная селекционерами этой компании, не нуждается в особом уходе и созревает для заготовки всего за 9 лет. Еще одной важной особенностью этих деревьев является то, что даже после вырубки корни дерева надолго сохраняют

10

**Меристема** – образовательная ткань с мелкими, активно делящимися клетками.

**Метаболизм** - промежуточный обмен, - т.е. превращение веществ внутри клеток с момента их поступления до образования конечных продуктов.

**Митоз** – процесс деления эукариотических соматических клеток.

**Моноплоид** – ядро, клетка, организм, характеризующиеся основным числом хромосом в полиплоидной серии (символ X).

**Морфогенез** - процесс формирования органов (органогенез), тканей (гистогенез) и клеток (цитогенез, или клеточная дифференцировка).

**Мутагены** - факторы, увеличивающие частоту возникновения мутаций в молекуле ДНК.

**Мутация** – спонтанное или индуцированное изменение гена, последовательности нуклеотидов хромосомы, генома, приводящее к изменению тех или иных признаков и сохранению их в поколениях.

**Незаменимые аминокислоты** - аминокислоты, которые не синтезируются в организме человека и животных.

**Нукleinовые кислоты** - это наиболее высокомолекулярные природные соединения (полимеры), состоящие из остатков различных нуклеотидов. Существует два типа нуклеиновых кислот: РНК, ДНК.

**Оперон** - единица генетической регуляторной структуры, в состав которой входят: один или несколько связанных между собой структурных генов, а также промоторный, операторный и другие регуляторные участки, контролирующие транскрипцию оперона.

**Органогенез** - процесс возникновения в неорганизованно растущей массе калусных клеток зародышей органов (корней и побегов).

**Очищение** – обработка от пыли и грязи спиртом.

**Полиплоид** – ядро, клетки, организм, характеризующиеся умноженным основным числом хромосом (символ 3X, 4X и т.д.).

честве дополнительного компонента осмотически активное вещество (стабилизатор) в оптимальной для данного вида концентрации. При регенерации стенок изолированные протопласты превращаются в культуру клеток.

**Культура корней *in vitro*** – асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней.

**Культура меристем *in vitro*** – асептическое выращивание на искусственной питательной среде изолированного апекса или пазушной почки побега конуса нарастания с одним или двумя листовыми примордиями.

**Культура органов *in vitro*** – асептическое выращивание на искусственной питательной среде в пересадочном режиме изолированных корней, стеблевых апексов, незрелых частей цветка, незрелых плодов.

**Культура тканей *in vitro*** – выращивание в длительной пересадочной культуре тканей, возникших путем пролиферации клеток изолированных сегментов разных органов или самих органов растений.

**Лигирование** - образование фосфодиэфирной связи между двумя основаниями одной цепи ДНК, разделенными разрывом. Этот термин употребляют также в случае соединения тупых концов и при формировании связи в РНК.

**Липкий конец** - свободный одноцепочный конец двуцепочечной ДНК, комплементарной одноцепочечному концу, принадлежащему этой же или другой молекуле ДНК.

**Мейоз** - процесс деления половых клеток, приводящий к редукции числа хромосом и рекомбинации генов.

**Меристема** - образовательные ткани с активно делящимися клетками.

**Маркер (ДНК)** - фрагмент ДНК известного размера, используемый для калибровки фрагментов в электрофоретическом геле.

**Маркерный ген** – ген, идентифицированный по месту расположения и имеющий чёткое фенотипическое проявление.

питательные вещества и могут воспроизводить новые ростки. По мнению авторов инновации, деревья сыграют важнейшую роль в восстановлении лесного фонда Австралии и многих других стран.

В развитии методов культуры клеток можно выделить следующие этапы (Калашникова, 2004):

**I этап (1892-1902 гг.).** Этот период связан с именами немецких исследователей Хаберландта, Фехтинга, Рехингера. Первые попытки культивирования различных растительных тканей были безуспешными. Был получен первичный каллус для сегментов стеблей одуванчика и тополя, а также определен минимальный размер сегмента, способного к каллусогенезу. Хаберландтом была высказана гипотеза totipotентности любой живой растительной клетки, т.е. способности клеток реализовывать свой потенциал развития и давать начало образованию целого растения.

**II этап (1902-1922 гг.).** Создание первых питательных сред для культивирования тканей животных. Эти питательные среды были природного происхождения и содержали, как правило, плазму крови и зародышевую жидкость. Попытки вырастить изолированные растительные ткани на искусственных питательных средах, содержащих растительные экстракты, оказались безуспешными.

**III этап (1922-1932 гг.).** Этот период связан с именами американского ученого Робине и немецкого — Котте. Они работали независимо друг от друга и обнаружили возможность культивирования растений на твердых питательных средах. 1932 год считается началом подлинного развития метода культуры тканей растений.

**IV этап (1932-1940 гг.).** Разработка приемов длительного культивирования в условиях *in vitro* растительных тканей за счет периодического пересаживания их на свежую питательную среду, которая связана с именем французского ученого Готре.

**V этап (1940-1960 гг.).** Открытие в 1955 году нового класса фитогормонов - цитокининов, и в частности кинетина дало возможность стимуляции деления клеток кусочка ткани сердцевинной паренхимы табака, лишенной проводящих пучков и камбия. В зависимости от концентрации и соотношения стимуляторов роста доказана возможность усиливать деление клеток экспланта, поддерживать рост каллуса, индуцировать морфогенез.

**VI этап (1960-1975 гг.).** Разработка профессором Ноттингемского университета Коккингом метода получения ферментативным путем изолированных протопластов из корней и плодов томата и культивирования их в контролируемых условиях. В 1970 году в той же лаборатории Пауэром совместно с сотрудниками осуществлено искусственное слияние протопластов, привело к появлению нового пути к созданию соматических гибридов. В этот период был разработан еще один метод - микроразмножение растений в условиях *in vitro* с использованием меристемной культуры.

**VII этап (1975 г. по настоящее время).** Происходит развитие техники *in vitro*, разрабатываются методы электрослияния изолированных протопластов, методы мутагенеза и клеточной селекции, методы получения гаплоидных растений, совершенствование метода глубинного культивирования клеток с использованием изолированных протопластов и векторов, созданных на основе Ti и Ri плазмид.

Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 20-х годов прошлого столетия и связаны с именем Готре, который показал, что камбимальные ткани некоторых растений способны к каллусогенезу *in vitro*. В последующих работах 40-х годов было сообщено о способности различных тканей вяза листового к образованию адVENTивных почек. Однако дальнейшие рост и формирование побегов не были отмечены. Лишь в середине 60-х годов Матесу удалось

конец, используя который ДНК-полимераза начинает синтез дизоксирибонуклеотидной цепи.

**Зигота** - оплодотворенная яйцеклетка.

**Изолированный протопласт** – растительная клетка, лишенная клеточной стенки с помощью ферментативного или механического разрушения.

**Инtron** – «молчащий», транскрибуируемый участок гена, не содержащий кодонов и удаляющийся из молекулы РНК в ходе её процессинга.

**Каллус** – группа дедифференцированных клеток, возникших *in vivo* или *in vitro* путем неорганизованной пролиферации.

**Кариотип** – набор хромосом, характерных для данного вида.

**Картирование** - идентификация генов и локализация места их расположения на хромосоме.

**Клеточная селекция** - метод выделения мутантных клеток и сомаклональных вариаций с помощью селективных условий.

**Клон** – культура, возникшая из одной клетки.

**Клональное микроразмножение** - получение *in vitro* неполовым путем растений, генетически идентичных исходному растению.

**Клонирование** - получение генетически идентичных популяций организмов.

**Кодон** - триплет нуклеотидов, соответствующий определенной аминокислоте или терминирующему сигналу.

**Компетенция** - способность клетки, ткани, органа, организма воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.

**Комплементарная цепь** - одна из цепей ДНК, используемая в качестве матрицы для синтеза РНК и соответствующая ей по взаимодействию пар нуклеотидов.

**Культура изолированных протопластов** – выращивание клеток, лишенных стенок, в жидкой или на агаризованной среде, содержащей в ка-

**Государственное регулирование генно-инженерной деятельности** - регулирование государственными органами в соответствии с законами и другими правовыми актами отношений между участниками генно-инженерной деятельности в сфере природопользования, охраны окружающей среды и обеспечении экологической безопасности.

**Дедифференциация** - переход специализированных, неделящихся клеток к образованию недифференцированных делящихся каллусных клеток.

**Детерминация развития** - приобретение клеткой, ткань, органом или организмом состояния готовности к развитию по определенному пути, сопровождающееся одновременным ограничением возможностей развития в других направлениях. В период детерминации создаются необходимые внутренние условия для последующей реализации нового направления развития.

**Диплоид** - ядро, клетка, организм, характеризующиеся двойным набором гомологичных хромосом, представленных числом, характерным для данного вида (символ  $2n$ ).

**Диплоидный набор хромосом** - два гаплоидных набора хромосом, содержащие хромосомы только одного или обоих родителей.

**Дифференциация** - комплекс процессов, приводящих к различиям между дочерними клетками, а также между материнскими и дочерними клетками.

**ДНК** – молекула дезоксирибонуклеиновой кислоты – системы, состоящей из нуклеотидов (аденин, гуанин, цитозин, тимин), дезоксирибозы и остатков фосфорной кислоты.

**Доминант** – ген, проявляющийся как признак при условии, когда гомологичные наборы имеют разные гены.

**Затравка** - короткая последовательность (часто это РНК), комплементарно взаимодействующая с одной из цепей ДНК; образует свободный 3-ОН-

получить первые растения-регенеранты осины, доведенные до почвенной культуры. Культивирование тканей хвойных пород *in vitro* долгое время редко использовалось как объект исследования. Это было связано со специфическими трудностями культивирования эвенильных и тем более взрослых тканей, изолированных с растения. В настоящее время насчитывается более 200 видов древесных растений, которые были размножены *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, осина, гибриды тополей с осиной, сосна, ель, можжевельник и др.). Работы в этих направлениях ведутся в разных научно-исследовательских учреждениях: Москве, Санкт-Петербурге, Воронеже.

## 1.2. Современный уровень развития биотехнологии в мире и в Российской Федерации

Лесные ресурсы — это огромный возобновляемый источник сырья, который имеет большое значение. Леса выполняют важные экономические и экологические функции, как в нашей стране, так и во всем мире. Они предоставляют товары и средства к существованию, также защищают почвы, регулируют водный режим и активно поглощают углекислый газ. Леса также содержат большую часть мирового биологического разнообразия.

Лесной и лесоперерабатывающий сектор экономики России является одним из самых экспортно ориентированных. Площадь российских лесов составляет 776 млн. га. Запасы древесины в российских лесах превышают 82 млрд. м<sup>3</sup> (106 м<sup>3</sup>/га) (по данным учета лесного фонда, УЛФ, 2003). Организация рационального лесопользования, охраны, защиты и воспроизводства лесов является важной задачей.

Эффективность лесоразведения связана с обеспеченностью посадочным материалом. Однако семена и всходы очень часто подвержены болезням. У традиционных способов создания новых форм лесных пород

и производства посадочного материала есть существенный недостаток – это низкая эффективность, несовместимая с потребностями плантационного лесоводства. Альтернативным способом является ускоренная селекция, с использованием методов биотехнологии.

В настоящее время в России над выведением новых быстрорастущих и высокопродуктивных сортов деревьев работают несколько организаций. Это филиал института биоорганической химии им. Академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Всероссийский научно-исследовательский институт лесоводства и механизации лесного хозяйства, Воронежский научно-исследовательский институт лесной генетики и селекции, Сысертский лесхоз (Свердловская область) и Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН.

Использование в лесокультурном производстве методов биотехнологии с целью создания устойчивых деревьев существенно помогает повысить скорость их роста. Методы биотехнологии, направленные на повышение продуктивности искусственных лесонасаждений, помогут существенно снизить нагрузку на естественные лесные массивы.

Но, не стоит забывать, что создание новых пород деревьев с помощью методов биотехнологии – процесс длительный, т.к. требует большого количества времени. Ученые ведут поиск новых методов повышения продуктивности и улучшают уже существующие методы. Например, они используют приемы биотехнологии в борьбе с грибковыми и прочими заболеваниями древесных пород. Разрабатываются препараты с целью защиты лесных насаждений от различных вредителей. Широко используются методы генной инженерии. Например, ведутся большие работы по выведению пород деревьев с повышенным количеством целлюлозы и пониженным содержанием лигнина.

**Генетический риск** – возможность проявления непредсказуемых, опасных для здоровья и жизни человека и для окружающей среды наследственных изменений генома и качества организма.

**Геном** – совокупность генов, содержащихся в гаплоидном (одинарном) наборе хромосом данного организма. Диплоидные организмы содержат два генома – отцовский и материнский.

**Генно-инженерная деятельность** – деятельность ученых, специалистов, научных организаций и государственных органов, направленная на получение, испытание, транспортировку и использование генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов.

**Генотерапия** – лечение наследственных болезней с помощью введенных в геном реципиента чужеродных генов.

**Генотип** – конкретный набор генов особи.

**Гетерозис** – повышение жизнеспособности гибридов первого поколения в результате скрещивания исходных родительских форм, отличающихся между собой по ряду признаков и свойств.

**Гиббереллины** – фитогормоны (ГК и др.), активизирующие рост стеблей, вызывающие прорастание семян.

**Гомозиготность** – отсутствие различий между идентичными генами родителей.

**Гормональная система растений** – регуляторный комплекс, состоящий из фитогормонов, их рецепторов и вторичных посредников.

**Гормональный статус** – состояние гормональной системы в онтогенезе растений и животных, уровни гормонов и соотношения между ними в процессах образования, передвижения, использования и инактивации в ответ на эндогенные и экзогенные воздействия.

**Гормон-рецепторный комплекс** – соединение гормона и белкового рецептора, первый необходимый шаг в реализации действия гормона.

**Вектор** – самореплицирующаяся (автономная) молекула ДНК, используемая в генной инженерии для переноса генов и других последовательностей от организма-донора в организм-реципиент, а так же для клонирования нуклеотидных последовательностей.

**Вторичный посредник** - физиологически активное регуляторное вещество, специфически стимулирующее активность протеинкиназ-ферментов, переносящих остаток фосфорной кислоты на другие белки, что приводит к изменению их конформации и биологической активности.

**Гаплоид** - ядро, клетка, организм, характеризующиеся одинарным набором хромосом, представляющим половину полного набора, свойственно го виду (символ  $n$  ).

**Ген** – единичная структура генетической информации, участок хромосомы (молекулы ДНК), кодирующий структуру одной или нескольких полипептидных цепей, или молекул РНК, или определенную регуляторную функцию.

**Генетическая инженерия** – совокупность приемов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.

**Генетически модифицированные растения (ГМ-растения)** – это растения, в которые введен чужеродный ген, или трансген.

**Генная инженерия** - совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезоксирибонуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с ними и введению их в другие организмы.

**Генетический код** - система записи наследственной информации в виде последовательности нуклеотидов в молекулах нукleinовых кислот. Единицей ГК служит кодон, или триплет (тринуклеотид). ГК определяет порядок включения аминокислот в синтезирующуюся полипептидную цепь.

В настоящее время задачи в области развития биоиндустрии Правительством РФ поставлены в нескольких документах, в том числе и перед лесопромышленным комплексом:

- **Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года**, утверждена Председателем Правительства Российской Федерации В.В. Путиным 24 апреля 2012 года (№1853 п-П8, разделы Промышленная биотехнология).

- **Технологические платформы**, утвержденные решением Правительственной комиссии по высоким технологиям и инновациям (Протокол от 01.04.2011 года №2): **Биоиндустрия и биоресурсы БиоТех 2030**; Разделы «**Промышленные биотехнологии (биополимеры)**»; «**Биотехнологии лесного сектора**».

- **Государственная программа Российской Федерации «Развитие науки и технологий**», утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 20 декабря 2012 года №2433-р.

- **Государственная программа Российской Федерации «Развитие промышленности и повышение ее конкурентоспособности**», утверждена распоряжением Правительства Российской Федерации от 27 декабря 2012 года №2539-р.

- Постановление Правительства РФ от 30 июня 2007 года №419 «**Об инвестиционных приоритетных проектах в области освоения новых лесов**» и выпуску новой продукции с высокой добавленной стоимостью методом глубокой переработки древесины.

Многие развивающиеся страны в настоящее время имеют правила и положения в отношении биобезопасности для сельскохозяйственных культур, включая плодовые деревья. Однако нет никаких правил и положений, которые бы были специфическими для генетически модифицированных лесных деревьев. Хотя правила и положения, принятые для сельскохозяйственных культур, также могут быть использованы для лесных

деревьев, с лесными деревьями связано много специфических проблем (продолжительные периоды времени и продолжительность жизни, наличие диких ресурсов, роль основных компонентов экосистемы). Леса, это не только деревья, поэтому лесные экосистемы являются более уязвимыми и менее контролируемые, чем сельскохозяйственные культуры. Таким образом, использование генетически модифицированных лесных деревьев рассматривается скорее как политическая и экологическая проблема, чем как техническая или торговая проблема.

#### *Рекомендуемая литература*

1. Воскобойников, И.В. Развитие биотехнологических процессов производства новых видов продукции из биомассы древесины / И.В. Воскобойников. - Межотраслевой альманах ДСР. - М. - №39, 2013.
2. Жигунов, А.В. Применение биотехнологии в лесном хозяйстве России / А.В. Жигунов. - «Лесной журнал». - № 2, 2013.
3. Калашникова, Е.А. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов биотехнологии / Е.А. Калашникова, А.Р. Родин. - Учебное пособие. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: МГУЛ, 2004. – 84 с.
4. Кузьмина, Н.А. Основы биотехнологии: Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Издание Омского педагогического университета, 2005.
5. Рябцева Е. Биотехнология в лесном хозяйстве / Е.Рябцева. - Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>, 2006.
6. Тенденции развития промышленного применения биотехнологий в Российской Федерации / Учреждение Российской Академии на-

**Биоценоз** - совокупность растений, животных и микроорганизмов, населяющих данный участок суши или водоема и характеризующихся определенными отношениями между собой и приспособленностью к условиям окружающей среды.

**Блоттинг ДНК по Саузерну** - процедура переноса денатурированной ДНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр для гибридизации с комплементарными нуклеотидными последовательностями.

**Блоттинг РНК** - перенос РНК из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр для последующей гибридизации с комплементарной ДНК.

**Брешь (пробел) в ДНК** - отсутствие одного или нескольких нуклеотидов в цепи ДНК.

**Биобезопасность** - состояние защищенности человека, общества, цивилизации и окружающей среды от вредного, опасного для жизни и здоровья человека воздействия токсических и аллергенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах.

**Биотехнология классическая** - наука о методах и технологиях производства, хранения и переработки сельскохозяйственной и другой продукции с использованием обычных, нетрансгенных растений, животных и микроорганизмов в природных (естественных) и искусственных условиях.

**Биотехнология новейшая** - наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных, микроорганизмов и вирусов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

**Ведущая цепь** - цепь ДНК, синтезирующаяся в 5'-3' -направлении.

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ

**Адвентивные почки** – почки на растениях, возникшие из клеток и тканей, обычно их не образующих.

**Анеуплоид** – ядро, клетки, организм с числом хромосом, отклоняющимся от Х и от чисел, кратных Х.

**Антигены** - белки, индуцирующие образование в иммунной системе антител, способных к специальному взаимодействию с веществом, вызывающим образование антител.

**Апекс** – верхушечная часть стебля или корня.

**Апикальное доминирование** - явление подавления роста верхушечных почек боковых побегов гормонами, вырабатываемыми в апикальной меристеме.

**Ауксины** – фитогормоны (ИУК, НУК, 2,4-Д), активизирующие рост стеблей и корней, стимулирующие образование корней у проростков.

**Автосомы** – набор хромосом, не включающий половые хромосомы (обозначаются цифрами: 1, 2, 3 и т.д.).

**Бактериофаги (фаги)** - вирусы, инфицирующие бактерии.

**Белки теплового шока (БТШ)** - стрессовые белки, вырабатываемые организмом в ответ на сверхоптимальное повышение температуры.

**Бессмысленный кодон** - один из трех триплетов, UAG, UAA, UGA, вызывающих терминацию синтеза белка (UAG известен как amber-кодон, UAA - как ochre- кодон, UGA - как opal- кодон). В настоящее время не рекомендуется употреблять термин «бессмысленный кодон», так как он выполняет конкретную функцию **терминатора трансляции**.

**Библиотека генома** - набор клонированных фрагментов ДНК, содержащий весь геном.

**Биомасса** - общая масса особей одного вида, группы видов или сообщества в целом на единицу поверхности или объема местообитания.

ук, Институт биохимии им. А.М. Баха РАН ИНБИ РАН). – Конспект от «30» декабря 2010 г. №30/12/10. - М., 2011.

7. <http://www.biotechnolog.ru>
8. [http://www.lesindustry.ru/issues/li\\_n6/Problemi\\_klonirovaniya\\_dereviev\\_33](http://www.lesindustry.ru/issues/li_n6/Problemi_klonirovaniya_dereviev_33)

### Контрольные вопросы

1. Что такое биотехнология?
2. Основные этапы в истории развития методов клеточной и генной инженерии.
3. Современный уровень развития биотехнологии в мире и в России.

## 2. СТРУКТУРА И ДЕЛЕНИЕ КЛЕТОК

### 2.1. Генетический материал клетки.

#### ДНК, РНК их строение, черты сходства и различия

Клеточная структура содержит и передает наследственную информацию от поколения к поколению в том случае, если она способна самоудваиваться и разделяться по дочерним клеткам в процессе их деления. Прямые доказательства такой способности получены для хромосом ядра, а из структур цитоплазмы наследственностью обладают: пластиды, митохондрии и гиалоплазма.

Наследственность, контролируемая элементами ядра называется **ядерной**, а структурами, сосредоточенными в цитоплазме – **цитоплазматической**.

Ведущая роль в передаче наследственной информации принадлежит ядру. Структурами ядра, отвечающими за наследственность являются **хромосомы**.

Классическим примером участия пластид в передаче наследственности является наследование пестролистности у многих видов растений, в том числе и у древесных и кустарниковых (клён ясенелистный, липа мелколистная, ясень обыкновенный и др.).

Генетические функции цитоплазмы ныне связывают с цитоплазматической мужской стерильностью у растений (ЦМС). ЦМС заключается в образовании недоразвитых тычинок, нежизнеспособной пыльцы, в нерастрашивании пыльников. Генетический контроль ЦМС сложный. Она может контролироваться ядром, цитоплазмой и взаимодействием наследственных структур ядра и цитоплазмы.

Цитоплазматический контроль ЦМС доказывается фактом материнского типа наследования, когда ЦМС наследуется только через цитоплазму яйцеклетки.

Способность к делению МХ и пластид предполагает известную автономность этих органелл клетки.

**Химический состав и структура нуклеиновых кислот.** Молекулы ДНК представляют собой биополимер, состоящий из нуклеотидов. В состав отдельного нуклеотида входит одно из четырех азотистых оснований: аденин (А), тимин (Т), гуанин (Г) и цитозин (Ц), пятиуглеродный сахар дезоксирибоза и остаток фосфорной кислоты. Азотистое основание связано с первым углеродным атомом дезоксирибозы, а остаток фосфорной кислоты может присоединяться эфирной связью либо к 3-му, либо к 5-му углеродному атому сахара, поскольку они содержат свободную ОН-группу. В зависимости от положения остатка фосфорной кислоты различают 5'- и 3'- нуклеотиды.

2. Особенности применения микроклонального размножения (*in vitro*) у хвойных видов.
3. Современные достижения генетической инженерии древесных пород.

#### **Вариант 8**

1. Современный уровень развития генной инженерии в мире и в Российской Федерации.
2. Особенности применения микроклонального размножения (*in vitro*) у лиственных видов.
3. Сравнительная оценка методов классической селекции с методами генетической инженерии.

#### **Вариант 9**

1. Половое размножение у древесных растений.
2. Приготовление питательных сред для микроклонального размножения.
3. Основные этапы решения генноинженерной задачи у древесных видов.

#### **Вариант 10**

1. Структура и деление растительных клеток.
2. Особенности применения микроклонального размножения (подготовка помещений, оборудование, состав питательных сред, стерилизация) у древесных растений.
3. Отбор генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

- Массовое тиражирование растений при микроклональном размножении. Приготовление питательных сред, посуды.
- Современные достижения генетической инженерии.

#### **Вариант 4**

- Деление клеток – митоз.
- Массовое черенкование березы повислой (подготовка помещений, оборудование, состав питательных сред, стерилизация).
- Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

#### **Вариант 5**

- Генетический материал клетки. ДНК, РНК их строение, черты сходства и различия.
- Микроклональное размножение осины (подготовка помещений, оборудование, состав питательных сред, стерилизация).
- Основные этапы решения генноинженерной задачи.

#### **Вариант 6**

- История и основные этапы развития генной инженерии.
- Особенности применения микроклонального размножения (*in vitro*) у осины (подготовка помещений, оборудование, состав питательных сред, стерилизация).
- Получения целевой ДНК в достаточных для работы количествах в генной инженерии.

#### **Вариант 7**

- Программы секвенирования (определения полных нуклеотидных последовательностей ДНК) геномов организмов.

Выяснению структуры ДНК во многом помогли данные о количественном содержании азотистых оснований и результаты рентгеноструктурного анализа. Э. Чаргаф обнаружил, что в молекуле ДНК содержание пуриновых оснований (А+Г) равно содержанию пиримидиновых оснований (Т+Ц), сумма аминооснований (А и Ц) равна сумме кетооснований (Г и Т). В молекуле ДНК молярное количество аденина равно количеству тимина, а молярное содержание гуанина равно содержанию цитозина (А=Т и Г=Ц). Количественные соотношения содержания азотистых оснований в молекуле ДНК называют **правилами Чаргана**. Равное молярное содержание А и Т, а также Г и Ц имеет важное значение при формировании двойной спирали ДНК. Это равенство не выдерживается только в случае одноцепочечных ДНК, как, например, у фага  $\phi$  X 174.

В 1953 г. Д. Уотсоном и Ф. Криком была предложена гипотеза о строении молекулы ДНК. Согласно этой гипотезе, молекула ДНК состоит из двух полинуклеотидных цепей и образует правую спираль, в которой 2-е цепочки закручены одна вокруг другой и удерживаются вместе водородными связями, возникающими между азотистыми основаниями.

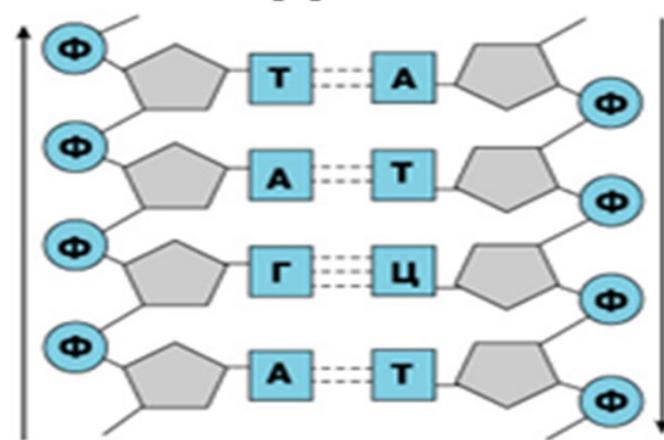
Нуклеотиды в одной цепи соединены чередованием фосфодиэфирных связей. Остаток фосфорной кислоты связывает 5'-углеродный атом дезоксирибозы одного нуклеотида и 3'-углеродный атом дезоксирибозы соседнего нуклеотида.

Полинуклеотидная цепочка в силу этого имеет определенную направленность фосфодиэфирных связей, что можно представить в следующем виде:

... Фосфат – 5' – Сахар – 3' – Фосфат – 5' – Сахар – 3' – Фосфат ...

Две полинуклеотидные цепи в молекуле ДНК удерживаются вместе водородными связями, возникающими между азотистыми основаниями

ми. Эти связи образуются только между определенными парами оснований. Между аденином в одной цепи и тимином в противоположной возникают 2-е водородные связи. Пара оснований гуанин-цитозин удерживается тремя водородными связями (рис. 1). Поскольку водородные связи возникают между пуриновым основанием в одной цепи и пиримидином в противоположной, двухцепочечная молекула ДНК на всем протяжении имеет одинаковую толщину. Способность образовывать водородные связи только между определенными азотистыми основаниями называется **правилом комплементарности**.



**Рисунок 1 – Водородные связи между азотистыми основаниями**

А - аденин, Т – тимин, Г – гуанин, Ц – цитозин, Ф – остаток фосфорной кислоты

Пунктирными линиями обозначены водородные связи между азотистыми основаниями

Важнейшим свойством ДНК является ее способность к самоудвоению, благодаря чему сохраняется постоянство ДНК в ряду клеточных

Работа выполняется в тонкой ученической тетради с указанием на ее обложке фамилии магистранта, курса, группы и номера зачетной книжки.

### Варианты контрольного задания

#### Вариант 1

1. История и основные этапы развития биотехнологии.
2. Особенности применения микроклонального размножения (*in vitro*) у древесных пород (подготовка помещений, оборудование, состав питательных сред, стерилизация).
3. Генетическая инженерия у древесных растений. Применяемое оборудование, совокупность методов, позволяющих искусственно переносить генетическую информацию из одного организма в другой с помощью специально созданных генетических конструкций.

#### Вариант 2

1. Современный уровень развития биотехнологии в мире и в Российской Федерации.
2. Технология размножения древесных растений *in vitro*. Достоинства и недостатки данного способа.
3. Конструирование (вне организма) рекомбинантных молекул ДНК (искусственно скомбинированных из фрагментов) с заданными наследственными свойствами.

#### Вариант 3

1. Половое размножение мейоз.

- 76) Как называется совокупность приёмов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы?
- 77) Назовите основные этапы решения генноинженерной задачи?
- 78) Какие ферменты используют чтобы встроить ген в вектор?
- 79) Как называется явление, в основе которого лежит примитивный половой процесс, который у бактерий сопровождается обменом небольшими фрагментами нехромосомной ДНК, плазмидами?
- 80) Как называется процесс внедрения чужеродной ДНК, используемый как принцип введения генетического материала в клетку?
- 81) Как называется техника удаления одного или большего количества генов, что позволяет исследовать последствия подобной мутации?
- 82) Как называется добавление в организм гена, которого у него ранее не было?
- 83) От чего прежде всего зависят особенности экспрессии гена?
- 84) Как называется экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты в биологическом материале.

### КОНТРОЛЬНОЕ ЗАДАНИЕ

Предназначено для магистрантов заочной формы обучения. Состоит из 3 вопросов по каждому из вариантов. Номер варианта соответствует последней цифре номера зачетной книжки магистранта. Ответы на вопросы контрольного задания должны быть полными, конкретными и, по возможности, краткими.

поколений. В определенный момент жизни клетки в молекулах ДНК разрываются водородные связи, и цепи расходятся. Далее каждая цепь строит другую по **принципу комплементарности**.

Репликация (удвоение) молекул ДНК имеет непосредственное отношение к передаче наследственной информации дочерним клеткам. Перед клеточным делением количество ДНК удваивается, а затем распределяется поровну между дочерними ядрами. Репликация происходит по **полуконсервативному механизму**.

#### **РНК структурно отличается от ДНК:**

- 1) Состоит из одной цепи;
- 2) Сахар представлен рибозой, а не дезоксирибозой, т.е. у рибозы на один атом кислорода меньше, чем у дезоксирибозы (кислород отсутствует у второго атoma углерода);
- 3) Из нуклеотидов вместо тимина (T), содержится урацил (U);
- 4) Молекулы РНК короче молекул ДНК, меньше их молекулярная масса.

### **2.2. Деление клеток – митоз**

Для древесных растений характерно размножение семенами и вегетативными частями тела. Оба способа осуществляются благодаря делению клеток. При делении клеточные структуры материнской клетки передаются дочерним, и тем самым осуществляется передача наследственных структур от клетки к клетке, от родителей потомкам.

У древесных растений различают 2 основных способа деления клеток: *митоз* и *мейоз*.

В основе бесполого и вегетативного размножения организмов лежит универсальный процесс – деление клетки. В результате из одной клетки возникают две.

Деление клетки состоит из двух основных этапов: деление ядра – **митоз** (кариокинез) и деление цитоплазмы – **цитокинез**.

**Митоз** (от греч. mitos – нить; синоним – кариокинез), или непрямое деление клетки – способ деления вегетативных клеток и спор. Представляет собой непрерывный процесс, в результате которого сначала происходит удвоение, а затем точное равномерное распределение наследственного материала, содержащегося в хромосомах, между двумя вновь возникающими клетками.

Он состоит из таких последовательно проходящих стадий: *профаза, метафаза, анафаза, телофаза*. Состояние клетки между двумя последовательными митотическими делениями называется *интерфазой*. Интерфазу иначе называют – стадией покоящегося ядра, на самом деле метаболические процессы в ядре в этот период совершаются с наибольшей активностью: клетка готовится к делению. В ядре в это время хорошо видна сетчатая структура, составленная из тонких нитей – хромосом. Термин «хромосома» буквально означает «окрашивающееся тело». Они поглощают и удерживают некоторые красители в большей степени, чем другие компоненты клетки.

*Интерфаза подразделяется на 3 периода:*

1. *пресинтетический ( $G_1$ )*, когда осуществляется синтез белков, а также РНК, и другие процессы, подготавливающие клетку к синтезу ДНК (длится от 10 часов до нескольких суток);
2. *синтетический (S)*, период синтеза ДНК, когда ее содержание в ядре удваивается (продолжительность 6-10 часов), также осуществляется синтез РНК и белка;
3. *постсинтетический ( $G_2$ )*, когда синтез ДНК закончился, идет синтез РНК и белков (в особенности ядерных), и клетка как бы

- 59) В чем заключается основное преимущество клонального микроразмножения?
- 60) С чего начинается приготовление питательной среды?
- 61) Какие весы применяют для взвешивания солей?
- 62) Какие весы применяют для взвешивания агар-агара, сахарозы, глюкозы?
- 63) Что делают после того как все компоненты для приготовления питательной среды взвешены?
- 64) Каким образом растворяют агар-агар, необходимый для приготовления питательной среды?
- 65) Какой набор микроэлементов используется во многих питательных средах?
- 66) Какое количество раствора микроэлементов добавляется на 1 л питательной среды?
- 67) Как называется фрагмент ткани или органа растения, инкутируемый самостоятельно при микроклональном размножении?
- 68) Какие почки используют для введения в культуру?
- 69) Какие черенки представляют особенную ценность для введения в культуру?
- 70) Для чего предназначен ламинар-бокс?
- 71) Что такое контаминация?
- 72) В чем заключается стерилизация?
- 73) В чем заключается очищение?
- 74) Каким образом осуществляется массовое черенкование при микроклональном размножении?
- 75) Какая среда применяется для массового тиражирования при микроклональном черенковании?

- 44) Какое азотистое основание присутствует в РНК, но не входит в состав ДНК?
- 45) По какому механизму происходит репликация ДНК?
- 46) Как называется участок ДНК, состоящий из нескольких нуклеотидов и контролирующий формирование элементарного признака через синтез белков?
- 47) Перечислите типы РНК.
- 48) Как называется процесс удвоения ДНК?
- 49) Как называется процесс, при котором происходит образование и-РНК на нити ДНК?
- 50) С помощью каких структур осуществляется перенос аминокислот к и-РНК при синтезе белка?
- 51) Как называется процесс транспортировки аминокислот к и-РНК в процессе синтеза белка?
- 52) Как называется процесс определения полных нуклеотидных последовательностей ДНК?
- 53) Какова основная задача секвенирования геномов?
- 54) Как называется направление современной молекулярной биологии, основными задачами которого являются секвенирование геномов, их картирование и сравнительный анализ структур геномов разных организмов?
- 55) Как называется процесс идентификации генов и локализации места их расположения на хромосоме?
- 56) Какое научное направление занимается системным анализом нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК, а также аминокислотных последовательностей белков, т.е. сравнительной геномикой?
- 57) Что является главной задачей функциональной геномики?
- 58) Как называются технологии основанные на возможности выращивания тканей и клеток *in vitro*, слияния соматических клеток или их протопластов.

находится в состоянии ожидания импульса или толчка к делению (продолжительность 3-4 часа).

Во время интерфазы ядро может находиться в состоянии наивысшей функциональной активности. В этой фазе удваивается количество ДНК в ядре, однонитчатые хромосомы становятся двунитчатыми. Это означает, что до удвоения ДНК каждая хромосома состояла из одной хроматиды, а после удвоения из двух хроматид, соединенных центромерой.

Митоз и интерфаза вместе взятые составляют *клеточный цикл* (или *митотический цикл*). У разных клеток митотические циклы имеют разную продолжительность. Большую часть времени клетка находится в состоянии интерфазы, и лишь сравнительно недолго продолжается митоз. В общем митотическом цикле собственно митоз занимает 1/25-1/10 часть времени и у большинства клеток длится от 0,5 до 2 часов.

В *профазе* хромосомы спирализуются, утолщаются и становятся видимыми в световой микроскоп. В конце профазы растворяются ядрышки и ядерная оболочка и хромосомы свободно располагаются в цитоплазме. Во время профазы центриоли (а их 2-е в каждой клетке) расходятся к полюсам клетки и между ними образуется веретено деления. Нити веретена имеют белковую природу, поэтому всегда перед их формированием в клетке идет интенсивный синтез и накопление белков. Профаза заканчивается, когда спирализация хромосом достигает максимума, и они превращаются в коротенькие сильноокрашивающиеся палочковидные тельца.

*Метафаза* – короткая по времени фаза митоза. В метафазе хромосомы максимально укорочены. Завершается образование веретена деления, хромосомы расположены в экваториальной плоскости клетки. Хромосомы, расположенные в этой плоскости, образуют экваториальную, или метафазную, пластинку. Каждая хромосома располагается таким об-

разом, что ее центромера находится точно в экваториальной плоскости. К центромере хромосомы, состоящей из двух хроматид, с двух сторон прикрепляются ахроматиновые нити.

Нити веретена приобретают более плотную консистенцию, чем остальная масса цитоплазмы. Они прикрепляются к хромосомам таким образом, что к каждой центромере подходят нити от двух полюсов.

В метафазе обычно изучают особенности кариотипа, т.к. структура хромосом четко просматривается.

В анафазе делятся центромеры и каждая хромосома распадается на 2-е хроматиды (которые теперь можно назвать уже хромосомами), которые расходятся к полюсам клетки. Расхождение хромосом в анафазе начинается одновременно и длится очень короткое время. Движение хромосом осуществляется благодаря нитям веретена, которые состоят из микротрубочек и сокращаются и растягивают дочерние хромосомы от экватора к полюсам клетки.

При движении хромосом используется энергия АТФ. Во время движения к полюсам хромосомы обычно принимают V-образную форму, причем вершина их обращена к полюсу.

После расхождения хромосом их количество у каждого полюса оказывается одинаковым и точно соответствует общему числу хромосом исходной клетки. Благодаря такому способу деления ядра обеспечивается постоянное число хромосом в клеточных поколениях.

Когда хромосомы достигают полюсов, начинается последняя фаза – *телофаза*. В телофазе хромосомы деспирализуются (раскручиваются), вытягиваются и возвращаются в состояние, когда виден лишь хроматин. Т.е. снова приобретают форму длинных нитей, переплетающихся друг с другом, приближаясь к тому состоянию, в котором они были в профазе. Затем восстанавливается ядрышко (или ядрышки), причем в том числе, в котором они присутствовали и в родительских ядрах. Ядро ре-

- 24) В какой фазе митоза растворяется ядерная оболочка?
- 25) В какой фазе митоза осуществляется разделение центромер и распад хромосом на две хроматиды?
- 26) Сколько делений в мейозе?
- 27) Сколько дочерних клеток образуется в результате митоза?
- 28) Перечислите стадии профазы I мейоза.
- 29) Как называется взаимное притяжение гомологичных хромосом в мейозе?
- 30) Что такое кроссинговер?
- 31) Как называется фаза между делениями мейоза?
- 32) Сколько дочерних клеток образуется в результате мейоза?
- 33) Что входит в состав отдельного нуклеотида молекулы ДНК?
- 34) К какому углеродному атому в молекуле ДНК может присоединяться остаток фосфорной кислоты?
- 35) Какую спираль имеет молекула ДНК?
- 36) Какими связямидерживаются цепочки ДНК?
- 37) С каким углеродным атомом в молекуле ДНК связано азотистое основание?
- 38) Какими связями в молекуле ДНК удерживается пара оснований аденин-тимин?
- 39) Какими связями соединяются нуклеотиды в одной цепи в молекуле ДНК?
- 40) Сколько водородных связей в молекуле ДНК возникает между парой оснований гуанин-цитозин?
- 41) Как называется способность образовывать водородные связи только между определенными азотистыми основаниями в молекуле ДНК?
- 42) Какое азотистое основание отсутствует в молекуле РНК?
- 43) Какой сахар присутствует в составе молекулы РНК?

- 6) Как называется техника генной инженерии, включающая выделение индивидуальных фрагментов ДНК любого происхождения, их стабильное воспроизведение в составе векторов, идентификация функций клонированных таким образом генов, их изменение и введение в клетки исходного или иного организма?
- 7) Каким ферментам отводят главную роль на этапе выделения гена?
- 8) Какие структуры ядра обладают наследственностью?
- 9) Какие структуры цитоплазмы обладают наследственностью?
- 10) Как называется наследственность, контролируемая элементами ядра?
- 11) Как называется наследственность, контролируемая структурами, со средоточенными в цитоплазме?
- 12) Какому органоиду клетки принадлежит ведущая роль в передаче наследственной информации?
- 13) В какой части хромосомы заключено основное наследственное вещество?
- 14) Наследование какого признака является классическим примером участия пластид в передаче наследственности у многих видов растений, в том числе и у древесных и кустарниковых?
- 15) С чем связывают генетические функции цитоплазмы?
- 16) Что является элементарной единицей наследственности?
- 17) Какое деление называется митозом?
- 18) Перечислите фазы митоза.
- 19) В какой фазе митоза хромосомы расположены в экваториальной плоскости клетки?
- 20) Какие изменения происходят в клетке во время анафазы митотического деления?
- 21) Что называется митотическим циклом (клеточным циклом) клетки?
- 22) На сколько периодов подразделяется интерфаза?
- 23) В какой фазе митоза растворяются ядрышки?

конструируется в обратном порядке по сравнению с теми изменениями, которые оно претерпевало в профазе. Цитоплазма делится пополам клеточной перетяжкой – *цитокинез*. Цитокинез начинается вслед за делением ядра (деление ядра – *кариокинез*). В животной клетке цитокинез происходит путем перешнуровки цитоплазмы по экватору материнской клетки от периферии к центру. В растительной клетке формирование клеточной перегородки идет при участии веретена от центра к периферии.

Продолжительность всего митотического цикла зависит от вида организма, типа ткани, физиологического состояния организма, внешних факторов (температуры, света и др.) и колеблется в пределах от 30 минут до 3 часов. Скорость прохождения отдельных фаз митоза также изменчива.

**Генетическое значение митоза** заключается в том, что обеспечивается постоянство количества ДНК и хромосом, а также идентичность наследственной информации в ряду поколений клеток и организмов при вегетативном размножении. Благодаря митозу сохраняются сортовые признаки растений при размножении черенками, прививками, отводками, отпрысками, порослью.

### 2.3. Половое размножение - мейоз

*В процессе развития половые клетки претерпевают мейоз.*

**Мейоз** (от греч. meiosis – уменьшение, редукция) – способ деления археспоральных клеток, ведущий к образованию спор у древесных растений. Этот тип деления происходит только в спорогенной ткани, в материнских клетках пыльцы, или микроспороцитах (в пыльниках), и в материнских клетках макроспор, или макроспороцитах (в семяпочках).

Мейотическое деление впервые было открыто в 1884 г. Оно существенно отличается от митоза и амитоза.

Мейоз состоит из двух последовательных делений: I деление – редукционное, при котором число хромосом в дочерних клетках уменьшается вдвое (клетки из диплоидных становятся гаплоидными); II деление – эквационное (уравнительное), когда клетки сохраняют гаплоидный набор хромосом, протекает по типу митоза. В каждом из них различают те же 4 фазы, которые наблюдаются и в митозе: *профазу, метафазу, анафазу, телофазу*.

К редукционному делению относятся изменения ядра от профазы I до телофазы I, а к эквационному от профазы II до телофазы II.

*Наиболее длительной и сложной* фазой мейоза является *профаза I*. Она состоит из ряда последовательных стадий.

Стадия *лептонемы* (*от греч. leptos – тонкий и нета – нить*) – хромосомы заметны в виде тонких нитей, состоящих из двух хроматид. Нити хромосом в лептонеме неясно спирализованы, и их половинки тесно прилипают друг к другу.

В стадии *зигонемы* (*двойная нить*) гомологичные хромосомы начинают притягиваться друг к другу сходными (гомологичными) участками. Это взаимное притяжение гомологичных хромосом называют *коньюгацией* или *синапсисом*. Процесс коньюгации (или синапсис) хромосом обеспечивается наличием в этот период в ядре особой структуры – *синаптонемного комплекса*. Соединение хромосом чаще всего начинается с концов или центромер. Сближение, начавшееся в одной точке, распространяется вдоль хромосомы подобно застежке-молнии. Механизм такого притяжения связывают иногда с наличием коньюгационной силы, но какова ее природа, остается невыясненным. Известно лишь, что эта сила действует по всей длине хромосомы и проявляется растянуто во времени соответственно длительности прохождения зигонемной стадии. В стадии зигонемы расположение хромосом в ядре не беспорядочное. В одном случае хромосомы собираются на одной стороне ядра, в другом распреде-  
26

2. Кузьмина, Н.А. Основы биотехнологии: Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Издание Омского педагогического университета, 2005.
3. Лебедев, В.Д. Я спросил у «трансгенного» тополя / В.Д. Лебедев // Лесная Россия: Лесная генетика, селекция и биотехнологии в лесном хозяйстве. – 2008. - №1. – С. 25.
4. Лебедев, В.Д. Биобезопасность трансгенных растений / В.Д. Лебедев, Я.И. Бурьянов // Лесная Россия: Лесная генетика, селекция и биотехнологии в лесном хозяйстве. – 2008. - №1. – С. 26-28.
5. Ребко, С.В. Основы генетической инженерии древесных видов / С.В. Ребко, Л.Ф. Поплавская. – Минск: УО «Белорусский государственный технологический университет», 2013. – 42 с.
6. <http://ru.wikipedia.org>

#### **Контрольные вопросы**

1. Что такое генетическая инженерия?
2. Каковы этапы решения генноинженерной задачи?
3. Возможности генетической инженерии растений, в том числе и древесных.

#### **ВОПРОСЫ ДЛЯ ПРОМЕЖУТОЧНОГО КОНТРОЛЯ**

- 1). Как называется наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных биологических объектов для интенсификации производства или получения новых видов продуктов различного назначения?
- 2) На чем базируется клеточная биотехнология?
- 3) На чем базируются биотехнологические процессы?
- 4) Какие разделы включает биотехнология?
- 5) Какие важные задачи решает генная инженерия?

щихся в препарате ДНК, также могут способствовать уменьшению эффективности протекания ПЦР.

**ДНК-полимераза.** При использовании малого количества ДНК-полимеразы наблюдается уменьшение синтеза конечного продукта прямо пропорционально размеру фрагментов. Избыток полимеразы в 2–4 раза приводит к появлению диффузных спектров, а в 4–16 раз – к появлению низкомолекулярных неспецифических спектров. Диапазон используемых концентраций – 0,5–1,5 единиц активности в пересчете на 25 мкл ПЦР смеси. Примесь в рекомбинантных полимеразах ДНК бактерий вызывает появление неспецифических ампликонов. Точность синтеза зависит от концентрации  $Mg^{2+}$ , НТФ, рН. В среднем частота ошибок Tag-полимеразы ниже одной замены на 100–300 п. н. Кроме основных компонентов смеси, используют дополнительные вещества, улучшающие качественные и количественные показатели ПЦР: ацетамид (5%) – увеличение растворимости основных компонентов; бетаин (0,8–1,6 М) – стабилизация ДНК-полимеразы, понижение температуры плавления ДНК; альбумин бычий (10–100 мкг/мл) – стабилизация ДНК-полимеразы; диметилсульфоксид (1–10%) – повышение растворимости основных компонентов; формамид (2–10%) – увеличение специфичности отжига в GC-насыщенных регионах; глицерин (15–20%) – увеличение термостабильности фермента, понижение температуры денатурации образца ДНК; сульфат аммония (15–30 mM) – снижение температуры денатурации и отжига.

#### *Рекомендуемая литература*

1. Калашникова, Е.А. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов биотехнологии / Е.А. Калашникова, А.Р. Родин. - Учебное пособие. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: МГУЛ, 2004. – 84 с.

ляются по всему ядру, но их концы почти всегда ориентированы к поверхности ядра, к месту, где находится в ЦП центросома. Все хромосомы от этого места расходятся радиально и попарно, образуя пучок петель. Такое состояние иногда называют *синаптическим букетом*. Важно подчеркнуть, что синапсис происходит лишь между гомологичными хромосомами.

С завершением полного синапсиса хромосом ядро вступает в следующую стадию – *пахинему* (*от греч. *rachis* – толстые; стадия толстых нитей*), во время которой дальнейшее усиление спирализации хромосом приводит к их утолщению. В гомологичных хромосомах этот процесс протекает синхронно. На этой стадии хорошо видно, что каждая хромосома состоит из двух сестринских хроматид, удерживаемых вместе одной центромерой. Две прокононгирировавшие хромосомы составляют *бивалент*, представленный четырьмя сестринскими хроматидами.

На стадии *пахинемы и диплонемы* (*от греч. *diploos* – двойной*) происходит перекручивание хромосом (хромосомы начинают укорачиваются). Во время диплонемы в идентичных участках хромосом идет процесс взаимного отталкивания. Он начинается в области центромер при расхождении происходит их раскручивание, вследствие чего образуются X-образные фигуры, названные *хиазмами*. Происходит обмен участками между гомологичными хромосомами – *кроссинговер*. Кроссинговер – специфическая особенность мейотического деления клетки. При митозе он в норме не происходит и образования хиазм не наблюдается.

Последняя стадия профазы I – *диакинез* – характеризуется максимальной спирализацией хромосом. Благодаря спирализации хромосомы утолщаются и укорачиваются. Биваленты обособляются, это позволяет подсчитать их гаплоидное число в клетке. В конце стадии диакинеза исчезают ядрышки и ядерные оболочки. Наступает вторая фаза первого деления мейоза – *метафаза I*. В этой фазе биваленты хромосом располагаются в центре ядра.

гаются в плоскости экватора, образуя так называемую метафазную пластинку.

Следующая фаза мейоза – *анафаза I*. Гомологичные хромосомы бивалентов расходятся к полюсам. Каждая из таких хромосом состоит из двух тесно связанных между собой хроматид. Такие хромосомы называются *диадами*. Вследствие расхождения число хромосом в ядрах дочерних клеток уменьшается вдвое. Отцовская и материнская хромосомы каждой пары (бивалента) могут отходить с равной вероятностью к любому из двух полюсов, но если одна из них отходит к одному полюсу, то вторая обязательно отходит к другому. В этом смысле гомологичные хромосомы зависят друг от друга. Однако, гомологичные хромосомы каждой пары ведут себя по отношению к хромосомам других пар независимо, поэтому в дочерних клетках возможны различные комбинации хромосом.

Следующая фаза – короткая по продолжительности *телофаза I*, сходная с телофазой митоза. В каждое из образующихся в телофазе I ядер попадает половина хромосом материнской клетки, т.е. происходит редукция (уменьшение числа хромосом).

После телофазы I не всегда наступает цитокинез. Если цитокинез не наступает после первого деления, то два гаплоидных ядра остаются всегда в одной клетке. Фазу между делениями мейоза называют *интеркинезом*. В интеркинезе в отличие от интерфазы не происходит репродукции хромосом и репликации ДНК, т.к. они уже удвоенные и состоят из двух сестринских хроматид, которые в профазе II остаются также с двойной природой, т. е. состоят из полухроматид. Репродукция произошла еще в интерфазе перед началом мейоза и обеспечила хромосомы полухроматидами. Поэтому профаза II не отличается от профазы митоза.

В профазу II вступают 2-е клетки возникшие в результате первого деления. Второе деление мейоза принципиально не отличается от митоза.

Кроме того, концентрация солей магния влияет на протекание процессов денатурации и отжига – повышение концентрации  $Mg^{2+}$  вызывает повышение температуры плавления ДНК (т.е. температуры, при которой 50% двухцепочных нитей ДНК разъединяются на одноцепочные).

**НТФ.** Нуклеотидтрифосфаты являются непосредственными мономерами нукleinовых кислот. Для предотвращения цепной терминации рекомендуется соотношение всех четырех нуклеотидтрифосфатов в равном количестве. При низкой концентрации этих компонентов в реакционной смеси (10–20 м) увеличивается вероятность ошибки при построении комплементарной цепи ДНК. Диапазон концентраций в пределах 50–500 мМ.

**Праймеры.** Используемый диапазон концентраций составляет 0,1–0,6 мМ. Наиболее оптимальным является использование праймеров с разницей температур плавления ( $T_t$ ) не более 2–4°C. Иногда при длительном хранении при +4°C или после большого количества замораживаний-оттаиваний праймеры образуют вторичные структуры – димеры, снижая эффективность протекания ПЦР. Устранение этой проблемы возможно путем инкубации на водяной бане ( $T = 95^{\circ}C$ ) в течение 3 мин. и резкому охлаждению до 0°C.

**Препараты ДНК.** Количество и качество препарата ДНК (матрицы) непосредственно влияет на ход и параметры полимеразной цепной реакции. При избыточном количестве образца ДНК происходит ингибирование ПЦР. Диапазон используемых концентраций ДНК-матрицы следующий: геномная ДНК млекопитающих – 10–500 нг; ДНК растений – 10–300 нг; ДНК бактерий – 1–10 нг; плазмидная, митохондриальная, хлоропластная ДНК – 0,2–5 нг.

Примеси различных веществ (ацетат и хлорид натрия, трилон Б, изопропанол, этанол, гепарин, фенол, мочевина, гемоглобин), находя-

ДНК-полимераза осуществляет достройку взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с праймеров. При синтезе ДНК праймеры физически встраиваются в цепь синтезирующихся молекул ДНК. Каждая цепь молекулы ДНК, образующаяся с помощью одного из праймеров, может служить матрицей для синтеза комплементарной цепи ДНК с помощью другого праймера.

Основными компонентами реакционной смеси являются: Трис-HCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>, смесь нуклеотидтрифосфатов (АТФ, ГТФ, ЦТФ, ТТФ), праймеры (олигонуклеотиды), препарат анализируемой ДНК, термостабильная ДНК-полимераза. Каждый из компонентов реакционной смеси непосредственно принимает участие в ПЦР, а концентрация реагентов напрямую влияет на ход амплификации.

**Трис-HCl.** Определяет pH реакционной смеси, создает буферную емкость. Активность ДНК-полимеразы зависит от pH среды, поэтому значение водородного показателя напрямую влияет на ход полимеразной цепной реакции. Обычно значение pH = 8–9,5. Высокое значение pH бывает из-за того, что при повышении температуры pH Трис-HCl буфера падает (температурный коэффициент равен 0,031 на 1°C) и при 72°C составляет pH = 7,5.

**KCl.** Концентрация хлорида калия до 50 мМ влияет на протекание процессов денатурации и отжига, концентрация выше 50 мМ ингибирует ДНК-полимеразу.

**MgCl<sub>2</sub>.** Поскольку ДНК-полимераза является Mg<sup>2+</sup>-зависимым ферментом, то концентрация ионов магния влияет на активность фермента (Mg<sup>2+</sup> образует комплексы с НТФ – именно эти комплексы являются субстратом для полимеразы). Высокая концентрация приводит к увеличению неспецифической амплификации, а низкая ведет к ингибированию реакции, оптимум (для различных полимераз) находится в области 0,5–5 мМ.

В *метафазе II* хромосомы (диады), теперь уже в половинном числе, выстраиваются в экваториальной плоскости, располагаясь центромерами по экватору веретена.

В *анафазе II* осуществляется разделение центромер, и каждая хроматида унивалента, становится самостоятельной хромосомой. В отличие от диады, т.е. хромосомы, состоящей из двух хроматид с одной центромерой, отдельную хромосому анафазы II называют *монадой*. В анафазе II к полюсам расходятся монады.

В *телофазе II* завершается расхождение хромосом к полюсам и наступает цитокинез.

Итак, в результате первого мейотического деления образуется два ядра с половинным, или гаплоидным, числом хромосом; поэтому первое деление мейоза называют редукционным. Во втором делении каждое дочернее ядро вновь делится, но в данном случае расходятся хромосомы, образовавшиеся по типу митоза из сестринских хроматид. Поэтому второе деление мейоза называется эквационным, уравнительным.

Следовательно, в результате мейоза из одной материнской клетки образуются 4 дочерние с половинным числом хромосом. Органоиды, по-видимому, так же как и в митозе, в мейозе распределяются между клетками случайно. В силу особенного поведения хромосом в профазе мейоза и редукции их возможны различные сочетания отцовских и материнских хромосом в гаплоидных ядрах половых клеток. Если в клетке число хромосом 2n = 6, как например у растений скерды (*Crepis capillaris* L.), то число возможных сочетаний при расхождении хромосом будет равно 23. У человека при 2n = 46 число возможных сочетаний равно 223. Это имеет прямое отношение к закономерностям наследования свойств и признаков при половом размножении.

**Генетическое значение мейоза** заключается в образовании клеток-спор у которых количество ДНК и хромосом вдвое меньше, чем у

археспоральных клеток. Вследствие кроссинговера и независимого расхождения негомологичных хромосом происходит перекомбинация генов. По этой причине в семенном потомстве происходит расщепление признаков, чистота сорта, как правило, не сохраняется.

#### **Сравнение митоза и мейоза:**

1) Основным отличием мейоза от митоза является наличие профазы I в мейозе, когда гомологичные хромосомы, из которых одна была привнесена женской, а другая мужской половой клеткой, соединяются в пары и обмениваются участками. В митозе подобного процесса нет.

2) В конце профазы I и начале метафазы мейоза в экваториальной плоскости располагаются пары гомологичных хромосом, называемые бивалентами. В митозе же на экваториальной пластинке располагаются отдельные хромосомы свободно, независимо.

3) В анафазе I при редукционном делении к полюсам деления отходят гомологичные хромосомы: из каждой пары гомологов одна из хромосом отходит к одному, другая – к другому полюсу; в результате число хромосом в дочерних клетках оказывается гаплоидным. В митозе же к полюсам отходят половинки хромосом всего набора, а поэтому число хромосом в дочерних клетках диплоидно.

4) В митозе каждый цикл деления ядра связан с репродукцией хромосом, в мейозе два деления обеспечиваются одной репродукцией в интерфазе, предшествующей ему.

5) Мейоз является лишь одним из этапов процесса развития половых клеток, после мейоза наступает этап формирования зрелых половых клеток – гамет. Весь процесс образования половых клеток называется гаметогенезом.

6) При половом размножении животных и растений преемственность между поколениями обеспечивается только через половые клетки – гаметы, которые не способны к самостоятельному существованию. Начи-  
30

Если температура отжига системы ниже оптимальной температуры, то число неспецифических амплифицированных фрагментов возрастает. Если же температура отжига высокая, то количество амплифицированных фрагментов уменьшается. При этом концентрация специфических ампликонов может резко снижаться, вплоть до ингибирования ПЦР. Увеличение времени отжига приводит к увеличению количества неспецифических ампликонов.

3. Элонгация: фермент ДНК-полимераза осуществляет достраивание комплементарной цепи. Как правило, для каждого вида термостабильной ДНК-полимеразы имеется индивидуальный температурный оптимум активности. Скорость синтеза ферментом комплементарной нити ДНК также является специфичной величиной для каждой полимеразы (30–60 нуклеотидов/с.), поэтому время элонгации подбирается в зависимости от типа ДНК-полимеразы и длины амплифицируемого региона.

#### *Общий вид программы ПЦР следующий:*

1 этап – первичная длительная денатурация препарата ДНК – 1 цикл;

2 этап – быстрая денатурация препарата ДНК; отжиг праймеров; элонгация – 30–45 циклов;

3 этап – длительная элонгация; охлаждение реакционной смеси – 1 цикл.

Денатурация, отжиг и элонгация имеют индивидуальные температурные и временные характеристики, которые подбирают опытным путем, в соответствии с качественными и количественными показателями продуктов амплификации.

Для амплификации избранного фрагмента используют два олигонуклеотидных праймера (затравки), фланкирующих определенный участок ДНК. Праймеры ориентированы 3'-концами навстречу друг другу и в сторону той последовательности, которую необходимо амплифицировать.

пробы ДНК в миллионы раз в течение нескольких часов. Во время каждого цикла реакции из исходной молекулы ДНК образуются две копии, каждая из которых будет служить матрицей для синтеза новых копий ДНК в следующем цикле. Многократное повторение циклов приводит к возрастанию количества копий в геометрической прогрессии. После прохождения уже 30 циклов число копий исходной молекулы ДНК будет составлять более 1 млрд.

Каждый цикл ПЦР состоит из следующих этапов:

1. *Денатурация*: повышение температуры вызывает раскручивание и расщепление двухцепочной молекулы ДНК на две одноцепочные. Денатурация происходит при температуре 90–95°C, но в случае, когда образец ДНК содержит большое количество гуанина и цитозина, температура должна быть увеличена до 98°C.

Для того чтобы произошло полное расщепление нитей ДНК и не случилось внезапного охлаждения или быстрого отжига, должна быть достаточная температура денатурации. Подбор оптимальных температурных параметров денатурации для соотношения праймер/образец ДНК является важным условием амплификации.

Если на первом этапе температура денатурации выше 95°C, тогда рекомендуется после первичной денатурации в реакционную смесь добавлять ДНК-полимеразу. Продолжительность данной стадии первого этапа в ходе ПЦР должна быть достаточной для полной денатурации ДНК, но не оказывать влияния на активность ДНК-полимеразы.

2. *Отжиг*: снижение температуры позволяет праймерам присоединиться к комплементарным участкам молекулы ДНК. Температура отжига ( $T_a$ ) является одним из важнейших параметров ПЦР, она подбирается индивидуально для каждого конкретного праймера и зависит от его длины и нуклеотидного состава. Обычно температура отжига ниже значения температуры плавления праймера ( $T_m$ ) на 2–4°C.

ло развития нового организма дает зигота, образованная в результате оплодотворения.

#### 2.4. Программы секвенирования геномов организмов

*Секвенирование* – это определение полных нуклеотидных последовательностей ДНК. Генноминженерные методы позволили реализовать программы секвенирования геномов многих организмов. Уже секвенированы ДНК сотен видов бактерий, дрожжей, плазмодия, риса, кукурузы, картофеля, дрозофилы, мыши; завершена международная программа "Геном человека".

Для чего же нужно секвенирование геномов? Одной из основных задач секвенирования геномов является выяснение строения генома и его работы как единого целого. Полная нуклеотидная последовательность – это предварительная карта генома организма. В первоначальном виде это просто длинная последовательность нуклеотидов, которая ни о чем не говорит. Для того чтобы с ней можно было работать, в ней выявляют гены, регуляторные элементы, мобильные элементы и другие последовательности ДНК, функция которых еще не известна.

Получила развитие новое направление – *геномика* – это направление современной молекулярной биологии, основные задачи которой – секвенирование геномов и их картирование.

Первым геномом, который был полностью секвенирован, стал геном бактериофага *jX 174*, расшифрованный в 1977 г. Он состоит всего из 5386 пар оснований. В результате дальнейших работ были получены нуклеотидные последовательности геномов некоторых вирусов. Но настоящего успеха исследования в области секвенирования геномов достигли сравнительно недавно, после того как были созданы автоматические секвенаторы, объединенные в целые «фабрики секвенирования» и программного обеспечения для обработки полученных данных.

Первыми свободно живущими организмами, чьи геномы были полностью расшифрованы, стали микоплазма *Mycoplasma genitalium* и бактерия *Haemophilus influenzae*.

К настоящему времени определена полная структура геномов более чем 100 микроорганизмов, основную часть которых составляют патогены.

Сейчас расшифровка геномов ведется со все возрастающей скоростью. Накоплен большой объем информации, который намного превышает возможности исследователей по анализу и экспериментальному использованию этой информации. В силу этих обстоятельств, очень актуальными становятся развитие новых математических методов компьютерного анализа геномов и способов хранения геномной информации. Для этого было создано программное обеспечение, позволяющее опознавать кодирующие и некодирующие участки генома по анализу нуклеотидной последовательности; организованы базы данных, где систематизируется информация о структурах геномов. Благодаря всему этому появилось новое направление - биоинформатика, которая занимается системным анализом нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК, а также аминокислотных последовательностей в молекулах белков, т.е. *сравнительной геномикой*.

Отдельным разделом биоинформатики является разработка алгоритмов и программ для предсказания пространственной структуры белков. Данная проблема является одной из основных в современной молекулярной биологии. До настоящего момента не создано точных методов предсказания трехмерной структуры белка по его аминокислотной последовательности. Однако в банках данных существует экспериментально полученная информация о трехмерной структуре сотен белков и во многих случаях на основе этой информации можно предсказывать пространственную структуру неизвестного белка с достаточной точностью. След-

32

переноса трансгенной ДНК, но не от распространения пыльцы экзотических видов деревьев.

**Репрессия** - это задержка цветения путем модификации экспрессии генов, которые усиливают вегетативный рост или подавляют переход к росту репродуктивных органов. Этот метод может отсрочить цветение, но полностью предотвратить его не может, однако, если предполагается короткий цикл ротации данного вида дерева, то этого метода достаточно для целей биобезопасности.

**Супрессия** - это подавление активности генов, необходимых для репродукции, на уровне ДНК, РНК или белка. Данный метод является одним из наиболее перспективных для предотвращения цветения.

На сегодняшний день только в Китае существуют коммерческие насаждения трансгенных деревьев тополя с устойчивостью к вредителям. Такая коммерциализация трансгенных лесных пород ожидается и в ряде других странах: в США возможно это будут холдоустойчивый эвкалипт и сосна лучистая с ускоренным ростом, в Бразилии - эвкалипт с ускоренным ростом и устойчивостью к гербицидам, в Чили - сосна лучистая с устойчивостью к вредителям и с уменьшенным содержанием лигнина. Несомненно, что при создании всех этих трансгенных деревьев учитывается фактор биобезопасности и их выращивание не будет представлять никакой угрозы для окружающей среды.

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

#### 4.3. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это процесс амплификации (размножения) *in vitro*, при котором фрагмент ДНК может быть размножен до  $10^8$  раз, т. е. ПЦР способна увеличить количество копий исходной

проведения полевых испытаний можно дать объективную оценку безопасности полученных трансгенных растений и их пригодности для дальнейшего коммерческого использования. В первую очередь при полевых испытаниях оценивается вероятность переноса чужеродного генетического материала из трансгенных растений в их дикорастущие родственные культуры путем опыления - это так называемая *вертикальная утечка генов*.

Вероятность утечки генов через пыльцу зависит от ряда экологических и генетических факторов. Для трансгенных лесных древесных пород на первом месте стоят вопросы экологической биобезопасности. Особое значение приобретает возможность переноса встроенных генов с пыльцой, которая у лесных культур способна переноситься на десятки километров. На сегодняшний день уже разработаны стратегии, направленные на блокирование цветения трансгенных растений. Также эти стратегии будут способствовать повышению продуктивности лесных плантаций за счет направления продуктов метаболизма на вегетативный рост.

Выделяют четыре генно-инженерных подхода, которые используются для предотвращения распространения чужеродного генетического материала с пыльцой трансгенных деревьев: 1) абляция, 2) эксцизия, 3) репрессия, 4) супрессия генов.

**Абляция** - это разрушение тканей цветка или нарушение их нормальной деятельности. При абляции используются тканеспецифические гены-промоторы, которые управляют работой гена-разрушителя, обычно кодирующего цитотоксин. Данный метод требует тщательного подбора промотора и цитотоксина.

**Эксцизия** - это удаление чужеродных генов до момента распространения генномодифицированной пыльцы путем использования системы сайт-специфичной рекомбиназы. Этот метод на фертильность дерева влияния не оказывает и может обеспечить защиту только от

52

дующим шагом в системных исследованиях геномов должен стать способ предсказания функции белка на основании знания его первичной (аминокислотной) структуры и предсказанной трехмерной структуры. Таким образом, *сравнительная геномика* переходит в новый раздел геномики - *функциональная геномика*, главная задача которой – выяснение биологических функций генных продуктов.

Анализируя последние тенденции развития геномных исследований, можно сделать вывод, что после установления структуры генома человека именно функциональная геномика станет ключевым направлением фундаментальных исследований в геномике.

#### ***Рекомендуемая литература***

1. Барабанчиков, Б.И. Молекулярная генетика / Б.И. Барабанчиков. – Учебное пособие. – Казань: Издательство Казанского университета. - 1985. – 92 с.
2. Котов, М.М. Генетика и селекция. Часть 1: Учебник для вузов/ М.М. Котов. - Йошкар-Ола: Мар ГТУ, 1997. - 280 с.
3. [www.portal-slovo.ru/](http://www.portal-slovo.ru/)

#### ***Контрольные вопросы***

1. Чем представлен генетический материал клетки?
2. Каков химический состав и структура нуклеиновых кислот?
3. Митоз, его генетическое значение.
4. Мейоз, его генетическое значение.
5. В чем заключается отличие митоза от мейоза?
6. Что такое секвенирование геномов?

### **3. КЛЕТОЧНАЯ ИНЖЕНЕРИЯ У РАСТЕНИЙ**

#### **Особенности применения микроклонального размножения (*in vitro*)**

Существует два способа размножения растений, в том числе и древесных пород: семенной (половой) и вегетативный. Оба способа имеют как преимущества, так и недостатки. К недостаткам семенного размножения относятся генетическая пестрота семенного материала и длительность ювенильного периода. При вегетативном размножении генотип материнского растения сохраняется, а также сокращается длительность ювенильного периода. Однако большинство видов плохо размножается вегетативным способом, к ним относятся многие древесные породы.

**Клеточная инженерия** – это технологии, основанные на возможности выращивания тканей и клеток *in vitro*, слиянии соматических клеток или их протопластов.

Достижения в области культуры клеток и тканей привели к созданию принципиально нового метода вегетативного размножения – клonalного микроразмножения – получение *in vitro* неполовым путем, генетически идентичных исходному экземпляру растений. В основе метода лежит уникальная способность растительной клетки реализовывать присущую ей totipotентность, т.е. под влиянием экзогенных воздействий давать начало целому растительному. Известно, что лесные древесные породы являются самым трудным объектом для выращивания методом культуры ткани, но этот метод имеет свои преимущества перед существующими традиционными способами размножения:

- получение генетически однородного посадочного материала;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;

- 1) ускорение прироста древесины путем повышения доступности питательных веществ или переключения метаболизма только на вегетативный рост;
- 2) улучшение качества древесины;
- 3) сокращение потерь во время выращивания путем повышения устойчивости к вредителям и болезням;
- 4) сокращение потерь во время лесозаготовок путем создания растений с наиболее оптимальными характеристиками габитуса.

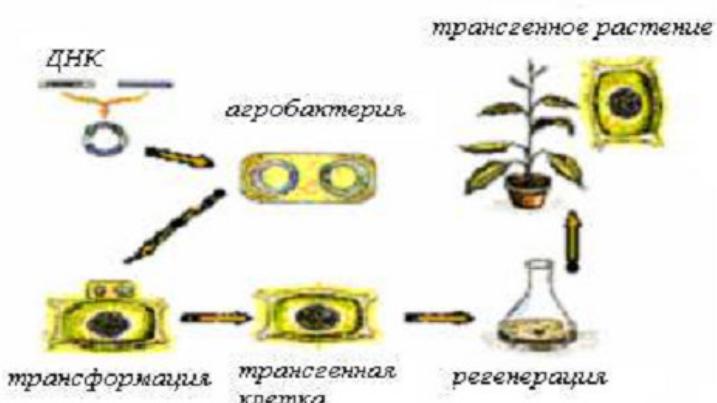
Однако с увеличением посадок трансгенных культур возникает вопрос о биобезопасности таких культур. Генетически модифицированные растения появились относительно недавно и пока нет достаточно информации о последствиях их использования в пищу и выращивания. В связи с этим в обязательном порядке проводится оценка биобезопасности трансгенных растений. Эта оценка ведется в двух направлениях:

- безопасность для употребления в пищу;
- безопасность для окружающей среды.

Именно на оценку биобезопасности генетически модифицированных растений приходится значительная часть затрат на выведение трансгенного сорта.

Растения, которые употребляются в пищу, проходят многоступенчатую проверку на биобезопасность. Оценка пищевой безопасности трансгенных сельскохозяйственных культур и полученных из них продуктов питания осуществляется путем их сравнения с нетрансгенными растениями».

Для оценки возможного воздействия трансгенных растений на окружающую проводятся полевые испытания генетически модифицированных культур в условиях естественного агробиоценоза. Таким образом оцениваются новые признаки, переданные путем генной инженерии, и их влияние на окружающую среду. Только после



**Рисунок 8 - Генетическая трансформация растений (рис. Шестибратова К.А.)**

**Генная инженерия древесных растений.** Для выведения перспективных древесных пород применяются методы генной инженерии. С помощью методов генной инженерии можно получать деревья, которые имеют новые признаки, которые нельзя получить традиционными способами селекции. У деревьев могут осуществляться модификации лигнина, изменяется содержание целлюлозы, сроки цветения, увеличивается образование гормонов (ауксина), устойчивость к гербицидам и др.

Например, используя методы генной инженерии, у трансгенного тополя удалось на 45% снизить содержание лигнина и на 15% повысить содержание целлюлозы.

К настоящему времени разработано несколько подходов повышения продуктивности деревьев с помощью методов генной инженерии:

- высокий коэффициент размножения ( $10^5$  -  $10^6$  - для травянистых, цветочных растений,  $10^4$  -  $10^5$  – для кустарниковых древесных растений и  $10^4$  – для хвойных);
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение всего года;
- возможность автоматизации процесса выращивания.

Таким образом, владея методом культуры изолированных тканей, можно получать в неограниченном количестве посадочный материал древесных растений, обладающих определенными нужными свойствами, особенно тех пород, которые плохо или совсем не размножаются традиционными способами.

Такой технологии выращивания посадочного материала улучшенного качества уделяют большое внимание зарубежные авторы.

Основное преимущество клonalного микроразмножения – это получение генетически однородного безвирусного посадочного материала.

Древесные виды являются самыми сложными объектами для культуры *in vitro*. Все типы тканей и органов у деревьев бывают сильно заражены грибами и бактериями, что в значительной степени затрудняет обеспечение асептики эксплантов. Большое влияние на размножение в условиях *in vitro* оказывают также видовые и генотипические особенности древесных пород, что требует иногда значительной модификации методик и сред для их размножения. В клетках хвойных пород содержится большое количество вторичных соединений (фенолов, терпенов и т.д.), которые в изолированных тканях активируются.

Окисленные фенолы обычно ингибируют деление и рост клеток – это приводит к гибели первичного экспланта или уменьшению способности тканей древесных растений к регенерации адвентивных (придаточных) почек.

**Оборудование и материалы.** Помещения, предназначенные для организации биотехнологической лаборатории должны быть просторными и изолированными. Также необходимо современное оборудование и высококачественные реактивы. Для удобства проведения дезинфекции полы стены и потолок в помещениях должны иметь водостойкое и ультрофиолетоустойчивое покрытие.

В моечных помещениях должны быть мойки с горячей и холодной водой, дистиллированная вода, дистилляторы, сушильные шкафы, шкафы для хранения чистой посуды и инструментов, емкости для хранения моющих средств, вытяжные шкафы.

Помещения для приготовления питательных сред должны быть оснащены лабораторными столами, холодильниками для хранения макточных растворов солей, гормонов и витаминов, аналитическими и электронными весами, плитками, газовыми горелками; набором посуды (колбы, стаканы, мерные цилиндры, мензурки, пробирки и др.), а также необходимым набором химических реагентов.

В помещениях для стерилизации должны быть: автоклавы, стеллажи для штативов с питательными средами, шкафы для хранения стерильных материалов. Данное помещение должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и иметь канализационный слив для отвода конденсата из автоклава.

Оборудование помещения для введения растительных эксплантов на питательные среды: ламинар-боксы, лабораторные столы, стеллажи, бактерицидные лампы, шкафы для материалов и оборудования.

Нынешний этап развития генетической инженерии растений получил название «*метаболическая инженерия*». При этом ставится задача не только улучшить имеющиеся качества растения, сколько научить растение производить совершенно новые соединения, используемые в медицине, химическом производстве и других областях. Такими соединениями могут быть: особые жирные кислоты, полезные белки с высоким содержанием незаменимых аминокислот, модифицированные полисахариды, съедобные вакцины, антитела, интерфероны, новые полимеры, не засоряющие окружающую среду и др. Использование трансгенных растений позволяет наладить масштабное и дешевое производство таких веществ и тем самым сделать их более доступными для широкого потребления.

В селекции лесных древесных растений наиболее широкое применение получило использование технологии *генетической трансформации* (рис. 8) с целью получения новых растений обладающих устойчивостью к корневым гнилям у ели (Канада), у тополей – с более длинным древесным волокном (Китай, США, Франция, Италия, Турция). Генетически модифицированные виды деревьев вызывают у специалистов заинтересованность, т.к. они обладают потенциалом, позволяющим увеличить производство древесины, улучшить ее качество, повысить сопротивляемость перед насекомыми, заболеваниями и гербицидами.

тивного размножения растений. В результате появляются растения с изменённым или неизменным генотипом, среди которых отбирают и скрещивают между собой только те растения, которые проявляют ожидаемые изменения.

### ***Задачи генной инженерии***

Основные направления генетической модификации организмов:

- приданье устойчивости к ядохимикатам (например, к определенным гербицидам);
- приданье устойчивости к вредителям и болезням (например, Bt-модификация);
- повышение продуктивности (например, быстрый рост трансгенного лосося);
- приданье особых качеств (например, изменение химического состава).

Создание ГМ организмов с повышенным содержанием витаминов

### **4.2. Генетическая инженерия у растений**

**Генетически модифицированные растения (ГМ-растения)** – это растения, в которые введен чужеродный ген, или *трансген*.

**Возможности генной инженерии растений.** Первые трансгенные растения были получены в 1983 г. Это были растения табака со встроенным генами из микроорганизмов. Первые успешные полевые испытания таких трансгенных растений табака, которые были устойчивы к вирусной инфекции, проведены в США в 1986 г.

Первые трансгенные растения, которые были допущены к практическому применению, содержали дополнительные гены устойчивости (к болезням, гербицидам, вредителям, порче при хранении, стрессам).

Оборудование для культуральной комнаты: стеллажи с подсветкой – 4 лампы дневного света над каждой полкой, кондиционер (охлаждающий и подогревающий) для поддержания постоянной температуры, термометры для контроля за температурой. В культуральной комнате должен быть 16-часовой световой день. Температура – 25-26 °С.

**Необходимый набор посуды, инструментов и материалов в биотехнологической лаборатории:** мерные колбы, колбы Эrlenмейера, химические стаканы, мерные цилиндры, чашки Петри, пробирки, бутылки, пипетки, стеклянные палочки, стеклянные и мембранные фильтры, ножницы, пинцеты, ножи, бритвенные лезвия, препарировальные иглы, шпатели, бумага (оберточная, пергаментная, фильтровальная), фольга алюминиевая, вата, марля, шпагат, спиртовка.

Необходимо помнить, что в биотехнологической лаборатории не должны находиться посторонние люди. Вход в лабораторию разрешается только во второй обуви. Также в помещениях лаборатории необходимо ежедневно проводить влажную уборку.

### **3.2. Технология размножения растений *in vitro***

**Микроклональное размножение** растений – один из способов вегетативного размножения в условиях «*in vitro*». Процесс клонального микроразмножения включает в себя четыре этапа: 1) выбор растения-донора и получение хорошо растущей стерильной культуры; 2) собственное микроразмножение; 3) укоренение микропобегов и при необходимости их депонирование при пониженных температурах; 4) адаптация пробирочных растений к почвенным условиям теплицы или открытого грунта.

Для культивирования тканей на каждом из перечисленных этапов требуется применение определенного состава питательной среды. Питательная среда для каждой древесной породы может иметь свои специфические особенности. В культуру можно вводить любые части растения

(корни, отрезки стволов, листья, почки). Но лучше вводить почки, так как они содержат больше меристемы. Для введения в культуру используют вегетативные почки (рис. 2).

На первом этапе необходимо добиться получения хорошо растущей стерильной культуры. Для древесных растений, у которых наблюдается тенденция к накоплению внутренней инфекции, рекомендуется вводить в состав питательной среды антибиотики (тетрациклин, бензилпенициллин и др.) в концентрации 100-200 мг/.



Рисунок 2 - Спящая почка осины, подготовленная для введения в культуру *in vitro*

Как правило, на данном этапе используют среду, содержащую минеральные соли по рецепту Мурасига и Скуга (табл. 1), а также различные биологически активные вещества и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта, вводимого в культуру. В некоторых случаях наблюдается ингибирование роста первичного экспланта из-за выделения им в питательную среду токсичных веществ (фенолов, терпенов и других вторичных соединений), тогда

Техника введения генов в бактерии была разработана после открытия явления *бактериальной трансформации*. В основе этого явления лежит примитивный половой процесс, который у бактерий сопровождается обменом небольшими фрагментами нухромосомной ДНК, плазмидами. Плазмидные технологии легли в основу введения искусственных генов в бактериальные клетки (рис. 7).

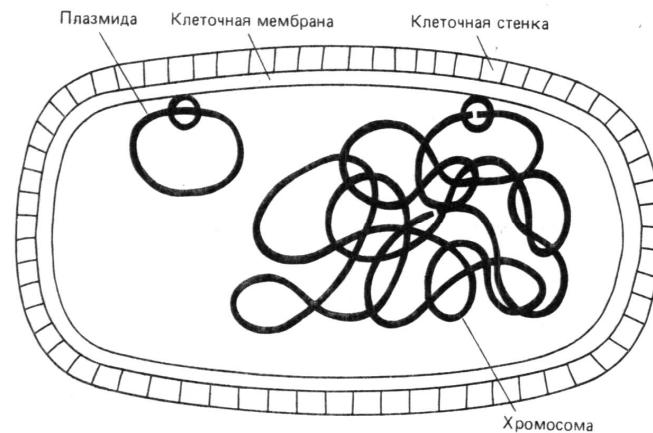


Рисунок 7 – Бактериальная клетка с хромосомой и плазмидой

Введение готового гена в наследственный аппарат клеток растений и животных претерпело значительные трудности. Ученые длительное время занимавшиеся этим вопросом смогли решить эту проблему. Они исследовали особенности внедрения чужеродной ДНК и использовали как принцип введения генетического материала в клетку. Такой процесс называли *трансфекцией*.

Если одноклеточные организмы или культуры клеток многоклеточных организмов подвергаются модификации, на этом этапе начинается *клонирование* – отбор организмов и их потомков или клонов, которые подверглись модификации. Если необходимо получить многоклеточные организмы, то клетки с изменённым генотипом используют для вегета-

рования новых регуляторных связей. **Геномная инженерия** оказывает более глубокое вмешательство в геном, приводящее к образованию новых не встречающихся в природе организмов.

В настоящее время выделены следующие этапы решения генно-инженерной задачи:

1. Получение изолированного гена.
2. Введение гена в вектор для переноса в организм.
3. Перенос вектора с геном в модифицируемый организм.
4. Преобразование клеток организма.
5. Отбор генетически модифицированных организмов (ГМО) и устранение тех, которые не были успешно модифицированы.

В настоящее время очень хорошо разработан процесс синтеза генов и даже в значительной степени автоматизирован. Созданы специальные аппараты, в памяти которых закладывают программы синтеза различных нуклеотидных последовательностей. Такой аппарат может синтезировать отрезки ДНК длиной до 100—120 азотистых оснований. Также очень широко распространена техника, позволяющая использовать для синтеза ДНК, полимеразную цепную реакцию. Синтезированная таким способом ДНК называется *комплементарной* или *кДНК*. Изолированный, так называемый «химически чистый» ген может быть также получен из фаговой библиотеки - это препарат бактериофага, в геном которого встроены случайные фрагменты из генома или *кДНК*, воспроизводимые фагом вместе со всей своей ДНК.

Для того чтобы встроить ген в вектор, необходимы следующие ферменты: рестриктазы и лигазы. Рестриктазы разрезают ген и вектор на кусочки, а лигазы такие разрезанные кусочки «склеивают», соединяют их в различных комбинациях, конструируя, таким образом, новый ген или заключают его в вектор.

в питательную среду добавляют антиоксиданты. В качестве антиоксидантов используют: аскорбиновую кислоту, глютатион, дитиотриэтол, диэтилдитиокарбомат, поливинилпирролидон. Продолжительность первого этапа от 1 до 2 месяцев, в результате которого наблюдается рост меристематических тканей и формирование первичных побегов.

**Таблица 1 - Состав питательной среды Мурасиге и Скуга**

Компоненты питательной среды Мурасиге-Скуга (MC)	Концентрация, мг/л
<b>Макросоли, мг на 1 л маточного раствора</b>	
<i>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></i>	1650
<i>KNO<sub>3</sub></i>	1900
<i>CaCl<sub>2</sub> * 2H<sub>2</sub>O</i>	440
<i>MgSO<sub>4</sub> * 7H<sub>2</sub>O</i>	370
<i>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>	170
<i>Na<sub>2</sub> ЭДТА</i>	37,3
<i>FeSO<sub>4</sub> * 7H<sub>2</sub>O</i>	27,95
<b>Микросоли, мг на 100 мл маточного раствора</b>	
<i>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></i>	6,2
<i>MnSO<sub>4</sub> * 4H<sub>2</sub>O</i>	22,3
<i>ZnSO<sub>4</sub> * 7 H<sub>2</sub>O</i>	8,6
<i>KI</i>	0,83
<i>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> * 2H<sub>2</sub>O</i>	0,25
<i>CuSO<sub>4</sub> * 5H<sub>2</sub>O</i>	0,025
<i>CoCl<sub>2</sub> * 6H<sub>2</sub>O</i>	0,025
Глицин	2,0
Мезоинозит	100
Никотиновая кислота	0,5
Пиридоксин - HCl	0,5
Тиамин - HCl	1,0
Сахароза	30000

**Второй этап** – это собственно микроразмножение. Одно из преимуществ метода клonalного микроразмножения – высокий коэффициент размножения, который возможно достичь путем микрочеренкования пробирочных растений. На этом этапе необходимо добиться получения максимального количества мериклонов. Сформировавшиеся на первичном экспланте микропобеги с 5-6 листочками, делят на черенки и расса-

живают в большее количество колб (рис. 3). При этом необходимо учитывать, что с увеличением количества субкультивирований увеличивается число растений-регенерантов с ненормальной морфологией и возможно образование мутировавших растений.



Рисунок 3 - Микрочеренок осины

На этом этапе также как и на первом этапе, используют питательную среду содержащую минеральные соли по рецепту Мурасига и Скуга, а также различные биологически активные вещества и регуляторы роста. Основную роль при подборе оптимальных условий культивирования эксплантов играют соотношение и концентрация внесенных в питательную среду цитокининов и ауксинов. Из цитокининов наиболее часто используют БАП в концентрациях от 1 до 10 мг/л, а из ауксинов—ИУК и НУК в концентрациях до 0,5 мг/л.

**Третий и четвертый этапы** — наиболее трудоемкие этапы. Здесь осуществляют укоренение микропобегов, их адаптацию к почвенным условиям и высадку на лесокультурную площадь. На третьем этапе, как правило, меняют основной состав питательной среды: уменьшают

9. Рябцева Е. Биотехнология в лесном хозяйстве / Е.Рябцева. - Интернет-журнал «Коммерческая биотехнология» <http://www.cbio.ru/>, 2006.
10. Широков, А.И. Основы биотехнологии растений / А.И. Широков, Л.А. Крюков. - Электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 49 с.

#### ***Контрольные вопросы***

1. Что такое клеточная инженерия?
2. Каковы преимущества клonalного микроразмножения?
3. Какое оборудование и материалы используют для создания биотехнологической лаборатории?
4. Какие этапы выделяют в процессе клonalного микроразмножения?

## **4. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ**

### ***4.1. Основные этапы решения генноинженерной задачи.***

**Генетическая инженерия** – совокупность приемов, методов и технологий получения рекомбинантных РНК и ДНК, выделения генов из организма (клеток), осуществления манипуляций с генами и введения их в другие организмы.

Генетическая инженерия не является наукой в широком смысле, но является инструментом биотехнологии, используя методы таких биологических наук, как молекулярная и клеточная биология, цитология, генетика, микробиология, вирусология.

*Генетическая инженерия* состоит из двух разделов – генной и геномной инженерии. *Генная инженерия* основана на введении в геном реципиентной клетки одного или нескольких чужеродных генов и форми-

### *Рекомендуемая литература*

1. Батыгина, Т.Б. Проблемы морфогенеза *in vivo* и *in vitro*. Эмбриоидогенез у покрытосеменных растений / Т.Б. Батыгина, В.Е. Васильева, Т.Б. Маметьева // Ботанический журнал. - 1978. – Т. 63. – № 1. – С. 87-110.
2. Беккер, М.Е. Биотехнология / М.Е. Беккер, Г.К. Лиепиньш, Е.П. Райпулис. - М.: Агропромиздат, 1990. - 333 с.
3. Бутенко, Р.Г. Индукция морфогенеза в культуре тканей растений / Р.Г. Бутенко // Гормональная регуляция онтогенеза растений: сб. науч. трудов. – М.: Наука, 1984. – С. 42-54.
4. Воскобойников, И.В. Развитие биотехнологических процессов производства новых видов продукции из биомассы древесины / И.В. Воскобойников. - Межотраслевой альманах ДСР. - М. - №39, 2013.
5. Жигунов, А.В. Применение биотехнологии в лесном хозяйстве России / А.В. Жигунов. - «Лесной журнал». - № 2, 2013.
6. Калашникова, Е.А. Получение посадочного материала древесных, цветочных и травянистых растений с использованием методов биотехнологии / Е.А. Калашникова, А.Р. Родин. - Учебное пособие. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: МГУЛ, 2004. – 84 с.
7. Кузьмина, Н.А. Основы биотехнологии: Учебное пособие для студентов биологического факультета / Н.А. Кузьмина. – Омск: Издание Омского педагогического университета, 2005.
8. Петрова, Г.А. Использование методов биотехнологии для получения здорового посадочного материала осины (*Populus tremula L.*) в условиях Республики Татарстан: дисс. канд. с.-х. наук / Г.А. Петрова. – М., 2011. – 116 с.

концентрацию минеральных солей по рецепту Мурасига и Скуга в два, а иногда и в четыре раза или заменяют ее средой Уайта, уменьшают количество сахара до 0,5-1% и полностью исключают цитокинины, оставляя лишь ауксин. В качестве стимулятора корнеобразования используют ИМК, ИУК или НУК. Укоренение микропобегов – трудоемкий и ответственный этап клonalного микроразмножения. Его проводят двумя способами:

- 1) выдерживание микропобегов в течение нескольких часов в стерильном концентрированном растворе ауксина (20-50 мг/л) и последующее их культивирование на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка);
- 2) непосредственное культивирование микропобегов в течение 3-4 недель на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1-5 мг/л в зависимости от исследуемого объекта).

Растения считаются полностью сформированными и готовыми к адаптации к почвенным условиям, когда на каждом формируется по 2-3 листа и развивается мощная корневая система (рис. 4).



**Рисунок 4 - Пробирочные растения осины, клон 34, диплоид F 2**

В последнее время предложен метод укоренения пробирочных растений в условиях гидропоники. Этот метод позволяет значительно

упростить этап укоренения и одновременно получать растения, адаптированные к естественным условиям.

Пересадка растений-регенерантов в субстрат является ответственным этапом, завершающим процесс клonalного микроразмножения. Наиболее благоприятное временем для пересадки пробирочных растений является весна или начало лета.

Растения с двумя-тремя сформировавшимися листьями и хорошо развитой корневой системой осторожно вынимают из колб или пробирок с помощью пинцетов с длинными концами или специальным крючком (рис. 5). С корней удаляют остатки агара и растения-регенеранты высаживаются в почвенный субстрат, предварительно проптерилизованный при 85-90° С в течение 1-2 ч. Для большинства растений в качестве субстратов используют: торф, песок (3:1); торф, дерновую почву, перлит (1:1:1); торф, песок, перлит (1:1:1).



**Рисунок 5 - Проросток осины, клон № 35, триплоид F 3**

Растения-регенеранты выращивают в приготовленных пикиро-вочных ящиках (пакетах) или торфяных горшочках, заполненных почвен-

ным субстратом (рис. 6). Горшочки с растениями помещают в теплицы с регулируемым температурным режимом (20-22° С), освещенностью не более 5 тыс. лк и влажностью 65-90%. Для лучшего роста растений создают условия искусственного тумана. Когда нет возможности создать такие условия, горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами, которые постепенно открывают до полной адаптации растений.



**Рисунок 6 - Пикировочные пакеты**

Через 20-30 дней после посадки хорошо укоренившиеся растения подкармливают растворами минеральных солей Мурасига и Скуга, Чеснокова, Кнопа (в зависимости от вида растений) или комплексным минеральным удобрением. По мере роста растений-регенерантов их рассаживают в большие емкости со свежим субстратом.

Дальнейшее выращивание акклиматизированных растений проводят согласно принятой агротехнике выращивания для каждого вида растений.