

меры и клетка» и дают некий временной срез нашей деятельности. Поэтому хочу сказать о сегодняшнем состоянии дел в институте и о наших планах, поскольку они недостаточно освещены в публикациях. Мы полагаем, что нам явно не хватает молекулярно-биологических и генноинженерных подходов. В этой связи более трети наших ученых сейчас выехали на длительные научные стажировки в лучшие зарубежные лаборатории — в результате мы надеемся получить обратно и более квалифицированных специалистов, и наладить нормальные полноценные связи с зарубежными научными центрами. При этом, естественно, подвергнутся модификациям в значительной степени и наши научные проекты.

Кроме человеческих, меняются и финансовые параметры, определяющие нашу научную политику. Вот уже несколько лет мы не получаем от государства никакой валюты на закупку приборов и реактивов, в нынешнем году нам не дали ее даже для приобретения научных журналов. В этих условиях институт все больше и больше своих усилий вынужден тратить на работы, финансируемые из-за границы. В настоящее время мы имеем исследовательские гранты от компаний «Америкен Сайанемид» (Принстон, США), «Нунхемс» (Голландия), а также от Фонда Кербера (ФРГ), ЮНЕСКО, Федерального министерства исследований и технологии (ФРГ), ведутся переговоры о совместных работах с «Келджин» (Дейвис, США), «Пи Джи ЭС» (Бельгия) и др. Пищу об этом без особой гордости, ниже радости. Во-первых, добывать эти деньги очень непросто, во-вторых, тот, кто платит, заказывает, как водится, музыку. Я уже предвижу попытки заняться вопросом о патристичности такого нашего поведения. Оно вполне патристично, потому что позволяет сохранить квалификацию наших ученых, до, даст Бог, время, когда у государства опять появятся деньги на такие «функции роскоши», как фундаментальная наука.

© Ю. Ю. ГЛЕБА, 1991

Директор Ин-та клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,  
академик АН УССР, член Европейской Академии

УДК 578.085

**И. В. Кириченко, Ю. Ю. Глеба**

## **ИНДИВИДУАЛЬНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПРЕСЕЛЕКТИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРОТОПЛАСТОВ И ПРОДУКТОВ ИХ СЛИЯНИЯ В МИКРОКАПЛЯХ**

«...исходный принцип по своей потенциальной значимости превосходит свою актуальную величину, вследствие чего маленькое вначале становится огромным в конце.»

(Аристотель. О небе. Кн. 1, гл. 5.)

*Показано успешное развитие единичных протопластов и клеток, а также продуктов слияния единичных преселектированных протопластов различных видов растений при помощи разработанного авторами метода индивидуального культивирования в микрокаплях. Эффективность высева составляла от 2 (клевер) до 75 % (табак), эффективность электрослияния единичных протопластов достигала 95 %. Описывается применяемая технология электрослияния, предлагается новая процедура добавления среды культивируемым в микрокаплях клеткам, позволяющая значительно повысить эффективность метода.*

**Введение.** Общеположенныя. Идея о плодотворности манипулирования с возможно большим числом возможно малых объектов вос-

© И. В. Кириченко, Ю. Ю. Глеба, 1991.

ходит к глубокой древности [1]. В свое время она произвела переворот в математике и физике, теперь, по-видимому, настала очередь биологии. Но даже в таких ее областях, как генетическая и клеточная инженерия, где данный подход особенно заметен, возможности его, скорее всего, далеко не исчерпаны.

Методы культивирования клеток растений и генноинженерных манипуляций с ними рассчитаны в основном на работу с большими популяциями клеток. Это позволяет надеяться на успех даже при очень низкой вероятности желаемого события, но в то же время вносит принципиально неустранимую неопределенность в начальные условия опыта. Данное обстоятельство нередко затрудняет интерпретацию полученного результата. Например, после получения соматических гибридов путем массового слияния протопластов трудно, как правило, судить о том, какова была первоначальная генетическая конституция продукта слияния клеток и сколько родительских протопластов принимало участие в слиянии. Противоречивые результаты опытов по направленному массовому электрослиянию [2—4] еще раз иллюстрируют сложность проблемы.

При решении прикладных и особенно фундаментальных задач часто бывает полезно, а иногда совершенно необходимо свести к минимуму неопределенность сведений о начальном состоянии продукта, получаемого при экспериментальной манипуляции (культивирование, химическое слияние, электрическое слияние, электропорация, микроинъекция и пр.). Получение потомства от заведомо одной клетки совершенно устраняет изначальную неопределенность процесса массового культивирования и дает возможность обойтись при различных генноинженерных манипуляциях без применения селективных маркеров.

**Истоки технологии.** Культивирование бактерий в жидкой среде под слоем масла впервые проведено Люмьером и Шевротье в 1914 г. ([6], цит. по [5]) и Унгерманном в 1918 г. ([7], цит. по [8]). В 1921 г. Михаэль модифицировал процедуру использованием твердой среды ([9], цит. по [8]). К концу 30-х годов культивирование под маслом применяли для консервирования многих видов бактерий ([10], цит. по [8]). Затем Шерф в 1943 г. ([11], цит. по [8]) использовал метод для консервирования *Actinomyces*, а позднее таким образом сохраняли коллекции и других видов грибов (см. [8]).

В это же время Фонбрюнн разработал технику культивирования животных клеток в микрокаплях под слоем парафинового масла (цит. по [12]), что нашло широкое применение в вирусологии ([13], цит. по [15]), культивировании зародышей млекопитающих [33] и в других областях.

Наконец, в 1958 г. Вилди и Стокер [12] сообщили о создании системы индивидуального культивирования животных клеток в микрокаплях питательной среды под слоем парафинового масла. Эффективность посева составляла около 30 %, на перенос одной клетки уходило 30 с. Оптимальный объем микрокапли составлял примерно 5 мкл. Скорость деления клеток была сходна с таковой в массовой культуре. Интересно, что авторы сообщают о влиянии размера микрокапли на выживание клеток и длительность лаг-периода перед делением, но связывают это явление с осмотическими эффектами вследствие испарения питательной среды из-под масла. Поскольку толщина слоя масла была значительной (60-миллиметровую чашку Петри заполняли 30 мл масла, следовательно, толщина слоя масла составляла около 1,5 см), продолжительность экспонирования чашки с микрокаплями при обычной влажности — очень небольшой (в одной чашке культивировали 10 клеток при скорости рассаживания 2 клетки в 1 мин), а масло уравнивали средой, то, скорее всего, описанное Вилди и Стокером явление аналогично зависимости эффективности посева растительных клеток от объема питательной среды.

Культивирование небольших количеств клеток растений (табак)

впервые описано Джонсом и др. в 1960 г. [14]. Клетки табака помещали между покровным и предметными стеклами в каплю питательной среды, окруженную минеральным маслом. При высокой влажности атмосферы клетки в таких условиях сохраняли жизнеспособность в течение месяцев и проходили несколько циклов деления. Предпосылкой применения масла (U. S. P. Heavy Mineral Oil) явились данные Каплина [5], показавшего, что оно нетоксично для клеток корня моркови. Интересно, что минеральное масло в 4—5 раз более проницаемо для кислорода, чем дистиллированная вода, а силиконовое масло — в десять раз ([15], цит. по [5]).

Система Джонса и сотр. для индивидуального культивирования растительных клеток в ее первоначальном варианте была не очень удобной при работе со значительным количеством единичных клеток. Следующий шаг сделан Глебой [16] — культивирование единичных протопластов в каплях микролитровых объемов в чашках Купрака. Впоследствии Коопом, Вебером и Швейгером [17, 18] была разработана высокоэффективная технология микрокультивирования в системе, управляемой компьютером. Протопласты культивировали на покровном стекле в микрокаплях объемом несколько десятков нанолитров под слоем масла. Для нанесения 50 микрокапель требовалось 20 мин, перенос одного протопласта осуществляли менее чем за 2 мин, во взрослые растения развивались 60—90 % первоначально рассаженных по микрокаплям протопластов.

В свою очередь, культивирование в микрокаплях под маслом является лишь одним из по меньшей мере четырех подходов, на основе которых потенциально могут быть разработаны способы индивидуального культивирования протопластов и/или клеток. Остальные три — это культивирование на богатых средах [19], использование при культивировании различий в метаболических потребностях протопластов и клеток [20], культивирование в сетчатых или мембранных камерах в присутствии культуры-няньки [21, 22]. К хорошим результатам иногда приводит также сочетание элементов нескольких технологий, например культивирование протопластов в микрокаплях под маслом на средах Кабоша [23].

Все эти подходы, по-видимому, имеют в основе нечто общее — представление о том, что протопласты или клетки, помещенные в среду, каким-то образом «кондиционируют» ее и в такой измененной среде лучше всего себя чувствуют. В простых питательных средах это происходит, как правило, при плотности посева  $10^4$ — $10^5$  клеток в 1 мл среды.

Культивирование в микрокаплях реализует, таким образом, одно из самых общих решений: если протопласты или клетки в среде простого химического состава развиваются успешнее всего при плотности посева  $10^4$ — $10^5$  клеток в 1 мл в массовой культуре, то для развития индивидуального протопласта или клетки нужен объем среды 1 : 10 000—1 : 100 000 мл, что составляет 10—100 нл. При этом неявно предполагается, что на развитие клеток в культуре межклеточные взаимодействия не оказывают сколько-нибудь существенного влияния.

Применение для культивирования сред сложного состава с большим количеством органических компонентов основывается, среди прочего [19], на стремлении не допустить диффузии из клеток в культуральную среду необходимых для их успешного развития продуктов метаболизма, что и достигается добавлением таких веществ в среду. Соответственно при оптимальной плотности посева количество клеток в единице объема среды таково, что диффузия важных для их развития соединений не превышает допустимого предела. Этот подход позволяет достичь хорошего результата — развития протопластов и клеток при плотности посева 1—4 клеток в 1 мл, но требует большой предварительной работы и учета тонких деталей метаболизма конкретной культуры. Очевидно также, что такие детали различны у разных видов и при разных способах культивирования.

Столь же малая плотность высева может быть достигнута, по Кабошу [20], культивированием протопластов вначале при высокой плотности высева в среде с гормональным составом 3 мг/л НУК и 1 мг/л БАП, а затем в среде с 1 мг/л БАП и 0,1 мг/л НУК. Образовавшиеся из протопластов в течение нескольких дней в среде с высоким содержанием ауксина клетки приобретали способность развиваться при очень низкой плотности высева.

Еще одним общим решением задачи о делении единичной клетки является, по-видимому, культивирование ее в камере, обеспечивающей механическую, но не химическую изоляцию в окружении протопластов или клеток культуры-няньки, которые кондиционируют среду [21, 22].

**Материалы и методы.** Общие положения. Большая трудоемкость работы с отдельными протопластами и клетками оправдана только в случае очень высокой эффективности используемых методик, и вся технологическая цепочка должна рассматриваться как некая целостность с тщательно подобранными компонентами: получением растительного материала, приготовлением ферментативной смеси, составлением сред для индивидуального культивирования, выделением протопластов, собственно культивированием, слиянием, а также некоторыми сопутствующими процедурами (например, добавлением среды развивающимся микроколониам).

**Среды для культивирования.** В отношении физических воздействий на протопласт индивидуальное культивирование отличается от массового прежде всего многократным пропусканием клетки через узкое отверстие микропипетки. При этом хрупкая плазмалемма протопласта может разрушиться из-за перепадов давления и большой скорости потоков жидкости. Избежать этого можно, увеличив вязкость среды для культивирования (что уменьшает перепады скоростей соседних слоев жидкости) и/или уменьшив поверхностное натяжение (что повышает устойчивость мембраны). Можно также увеличить диаметр микропипетки, но это снизит точность захвата протопласта и уменьшит производительность работы. Кроме того, протопласт не должен прилипать к микроинструменту или ко дну чашки Петри.

Наши наблюдения показали, что очень часто для того, чтобы соблюсти эти условия и сделать обычную среду для массового культивирования пригодной для ведения индивидуальной культуры, достаточно добавить в среду бычий сывороточный альбумин (БСА, V фракция, «Serva», ФРГ) в концентрации 1—4 мг/мл аналогично тому, как это делается при культивировании зародышей млекопитающих [24]. Однако на растительные протопласты БСА действует и при гораздо более низких концентрациях — начиная от 0,01 мг/мл. Одно лишь понижение поверхностного натяжения среды с помощью твина-80 дает более слабый эффект.

В модифицированных таким образом средах удалось успешно вести индивидуальную культуру различных видов растений — табака, рапса, гороха, люцерны, сои, клевера, капусты и др. (см. ниже).

Другим важным общим требованием является возможно более высокая чистота воды, посуды и реактивов, применяемых при составлении сред для выделения и культивирования протопластов.

**Приготовление масла.** Так как объем микрокапель для индивидуального культивирования очень мал (как правило, от двух до нескольких сот нанолитров), то отношение поверхности к объему становится достаточно большим; тем легче из микрокапли в окружающее масло могут диффундировать компоненты питательной среды. Состав культуральной среды вследствие этого может обедняться, а условия развития протопласта — ухудшаться. Кроме того, чистота различных партий масла не всегда одинакова, что мешает получению воспроизводимых результатов.

Во избежание этих проблем масло необходимо очистить от имею-

щихся в нем водорастворимых соединений, а затем насытить средой для культивирования.

150—200 мл вазелинового аптечного или парафинового («Мерск», ФРГ) масла смешивают в делительной воронке с бидистиллированной или деионизированной водой в соотношении 1 : 1 и энергично встряхивают до получения суспензии. Смесь отстаивают до полного разделения воды и масла, воду сливают и процедуру повторяют 5—10 раз, пока масло и вода не станут разделяться за несколько минут. Объем масла при этом несколько увеличивается. Воду сливают, а для удаления мельчайших капелек воды и частиц грязи масло центрифугируют на ультрацентрифуге Векман L5-50 при 20 000 об/мин 1,5 ч (ротор SW-27) или фильтруют через фильтр Millipore (диаметр пор 0,22 или 0,4 мкм). После этого к маслу добавляют 10—20 % (по объему) среды для культивирования (без белка!), встряхиванием или продуванием воздуха получают суспензию среды в масле, которую автоклавизируют 15—20 мин при 1 атм. Перед автоклавированием можно добавить 1—2 % аптечного активированного угля. Затем масло ставят на 5—7 дней в термостат (25—27 °С) для осветления, после чего оно пригодно к употреблению. Хранят масло вместе с уравнивающей его средой при 4 °С в течение 3 месяцев или замороженным при —20 °С — более длительное время.

Приготовление и очистка ферментативной смеси. Состав и качество ферментной смеси для выделения протопластов могут иметь решающее значение для успеха опыта. Хотя о выборе ферментных смесей существуют некоторые общие представления (см., например, обзор Кокинга [25]), в каждом конкретном случае их приходится подбирать эмпирически, поэтому каждая удачная находка приобретает особое значение.

Так, в случае мезофильных протопластов табака очень хорошие результаты дает ферментная смесь  $\Phi_k-2$  следующего состава (из [20], модифицировано нами): Maseozyme R 10 («Serva») — 20 мг; Opozuka R 10 («Serva») — 100 мг; Driselase («Sigma», США) — 50 мг; сахароза (х. ч.) — 17000 мг;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (х. ч.) — 100 мг;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (х. ч.) — 100 мг (для *N. tabacum* необязателен); вода (бидистиллированная или деионизированная) — до 100 мл; pH не доводить. Стерилизация фильтрованием. Хранить при 4 °С не более месяца или более длительное время — при —20 °С.

Эту же пропись с удвоенным содержанием ферментов можно использовать для выделения мезофильных протопластов других видов пасленовых.

Еще лучший результат получается при очистке ферментов гель-фильтрацией с сефадексом (см. [25]). По нашим наблюдениям, в смеси ФС-2К (очищенная  $\Phi_k-2$  с 4-кратным содержанием ферментов) время инкубации протопластов можно увеличить до 96 и более часов в случае «трудных» объектов (например, мезофилла раувольфии).

Добавление среды микроколониам. При индивидуальном культивировании протопластов и продуктов слияния преселектированных протопластов ввиду большой трудоемкости экспериментальных процедур особое значение приобретает проблема их эффективности. В то время как эффективность собственно электрослияния достигает 90 % [26], в ходе дальнейшего культивирования гибнет значительная часть продуктов слияния. Если так обстоит дело даже с протопластами табака, сравнительно легко поддающимися индивидуальному культивированию (см., например, [23]), то очевидны сложности при переходе к протопластам более «трудных» и интересных с практической точки зрения видов растений.

Длительные наблюдения за развитием продуктов индивидуального слияния протопластов привели нас к выводу о том, что значительная часть осложнений при культивировании может быть связана не только с составом среды, но и со способом ее добавления растущей клетке и

микроколонии. На рис. 1 представлена подобранная нами эмпирически (критерием служил успех культивирования) кривая зависимости объема микрокапли от времени культивирования микроколоний. По виду она оказалась близкой к экспоненциальной, что натолкнуло нас на мысль учесть при индивидуальном культивировании и некоторые закономерности роста организмов, известные с начала века (см. [27]).

Расчет требуемого (в ходе культивирования) роста объема микрокапель производили по формуле (из [27])

$$V = V_0 e^{ct}, \quad (1)$$

где  $V$  — объем микрокапли;  $V_0$  — начальный объем микрокапли;  $c$  — постоянная скорости роста;  $t$  — время.

В качестве  $V_0$  принята величина 46,23 нл — среднее значение начального объема микрокапель из наиболее успешных опытов.

При добавлении среды для культивирования синхронно с ростом и делением клеток  $V=2V_0$  за время удвоения объема клетки  $t$ . Тогда справедливо

$$2V_0 = V_0 e^{ct}, \quad (2)$$

откуда после простых преобразований получаем

$$c = (\ln 2)/t. \quad (3)$$

Для используемых объектов  $t$  принимали равным 3 сут. Среду подливали с помощью микропипетки и микроапликатора (Microapplicator M, «ISCO», США) каждые три—пять дней. Для расчета объема микрокапли использовали табл. 1.

Выращивание растений и выделение протопластов. Для опытов на табаке использовали асептически выращиваемые на среде МС [28] с 0,6—0,9 % агара («Serva») растения табака *N. tabacum* (L.) или *N. plumbaginifolia* (Viv.) в возрасте 1—3 месяцев (при 24—26 °С, 16-часовом дне и освещенности 10 000 лк. 3—5-е листья растения табака разрезали на полоски шириной 1—2 мм в ферментативной смеси в чашке Петри диаметром 90 мм. На один лист средней величины добавляли 4—5 мл смеси. Инкубировали 14—20 ч в темноте при 25,5 °С. Затем чашку слегка встряхивали и суспензию выпавших протопластов фильтровали через нейлоновую сетку с размером ячеек 200 мкм в центрифужную пробирку

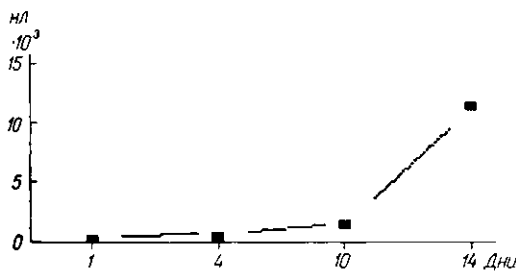


Рис. 1

объемом 10 мл. Сверху наслаивали 1—2 мл среды W-5 [29]. Пробирку центрифугировали 5 мин при 50 g, образующийся на границе раздела ферментной смеси и среды W-5 «поясок» протопластов собирали, дважды отмывали средой W-5 (осаждали центрифугированием 2 мин при 50 g) и дважды — средой для культивирования. При этом пользовались пастеровскими пипетками с широким кончиком. Так же выделяли протопласты растений других пасленовых и их гибридов.

Выделение протопластов других видов растений — см. [30, 31].

Индивидуальное культивирование. Основой для разработки нашей системы индивидуального культивирования растительных протопластов в микрокаплях под слоем масла явилось культивирование зародышей млекопитающих по Бринстеру (см. [24, 32, 33]).

Микроманипуляции с протопластами проводили с помощью микропипеток диаметром около 100 мкм, изготовленных на микрокузнице МЭ-4 (п/о Черноголовка) из капилляров молибденового стекла диамет-

ром 1,5 мм. Микропипетку закрепляли на головке манипулятора фон Брюнна из комплекта микроманипуляторов КМ-2 (п/о Черногловка) и соединяли тефлоновым шлангом диаметром 2 мм с микрошприцем на 50 мкл. Шприц и шланг были заполнены аптечным вазелиновым маслом. Головку манипулятора крепили к столику инвертированного микроскопа Reichert-Jung Microstar. На рис. 2 изображена установка для индивидуального культивирования и слияния единичных преселектированных протопластов.

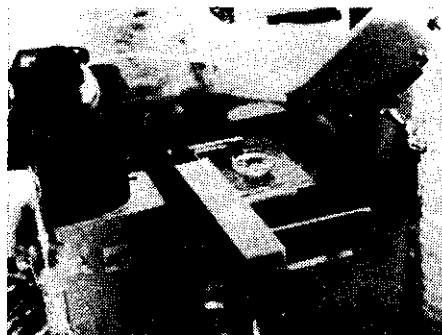


Рис. 2

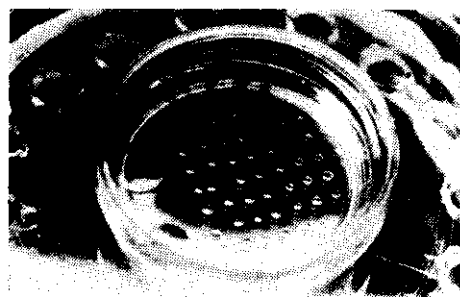


Рис. 3

Индивидуальное культивирование проводили в пластиковых чашках Петри диаметром 40 мм. Вначале в чашку вносили 2 капли среды для индивидуального культивирования объемом 100—200 мкл, затем чашку накрывали крышкой на 2—3 мин, после чего заполняли маслом до тех пор, пока под его слоем не скрывались верхушки капель. Далее в одну из капель вносили суспензию протопластов, а другая служила источником чистой среды для нанесения микрокапель. Капли сред для смены в ходе культивирования помещали в эту же чашку (рис. 3: камера для индивидуального культивирования. Видны микрокапли и большие капли среды для культивирования).

Микрокапли наносили с помощью микропипетки и микрошприца на дно чашки Петри. Для нанесения 40—50 микрокапель требовалось

Таблица 1

*Изменение объема микрокапли (нл) в ходе индивидуального культивирования клеток в зависимости от периода удвоения объема клетки и времени культивирования*

Время культивирования, дни	Период удвоения объема клетки, сут						
	1	2	3	4	5	6	7
1	92,46	65,38	58,24	54,98	53,10	51,89	51,04
3	369,83	130,75	92,46	77,75	70,07	65,38	62,22
5	1479,31	261,51	146,77	109,95	92,46	82,37	75,85
7	5917,24	523,02	232,98	155,49	122,00	103,78	92,46
9	23668,97	1046,03	369,83	219,90	160,98	130,75	112,71
11	94675,89	2092,06	587,06	310,99	212,41	164,74	137,39
13	378703,54	4184,12	931,91	499,80	280,28	207,56	167,48
15	1,51E+6	8368,25	1479,31	621,97	369,83	261,51	204,16
17	6,06E+6	16736,49	2348,26	879,60	487,99	329,48	248,88
19	2,42E+7	33472,98	3727,63	1243,95	643,91	415,12	303,38
21	9,69E+7	66945,96	5917,24	1759,21	849,64	523,02	369,83
25	1,55E+9	2,68E+5	14910,52	3518,41	1479,31	830,24	549,56
29	2,48E+10	1,07E+6	37572,15	7036,63	2575,63	1317,92	816,65
31	9,93E+10	2,14E+6	59642,07	9951,58	3398,56	1660,47	995,50
35	1,59E+12	8,57E+6	1,50E+5	19903,15	5917,24	2635,83	1479,31
39	2,54E+13	3,43E+7	3,79E+5	39806,31	10302,52	4184,12	2198,25
41	1,02E+14	6,86E+7	6,01E+5	56294,62	13594,25	5271,66	2679,69
50	5,20E+16	1,55E+9	4,81E+6	2,62E+5	47337,94	14910,52	6533,17

15—20 мин. После этого по микрокаплям из большой капли с суспензией рассаживали протопласты средней для данного вида величины, совершенной круглой формы, с равномерно распределенными хлоропластами или, в случае каллусных протопластов, с хорошо выраженными тяжами цитоплазмы. Избегали протопластов с выраженной зернистостью цитоплазмы. Рассаживание 40—50 протопластов занимало 15—20 мин. После рассаживания чашку Петри помещали во



Рис. 4

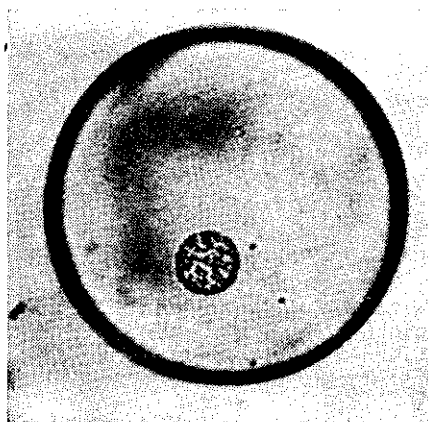


Рис. 5

влажную камеру и инкубировали в термостате в темноте (рис. 4: влажная камера с индивидуальной культурой).

В качестве примера можно привести хорошо отработанную процедуру индивидуального культивирования протопластов табака.

Протопласты, выделенные и отмытые, как описано ранее, помещали в микрокапли среды  $T_0$  [20] с добавлением 4 мг/мл БСА объемом 10—20 нл. Результаты представлены на рис. 5, где показан протопласт табака в микрокапле. В эту же чашку с маслом помещали каплю среды  $M_0$  [20] с уменьшенным на треть содержанием осмотика объемом 100—150 мкл. Чашку инкубировали при 25,5 °С в темноте. Первые деления начинались спустя 1—3 сут после начала культивирования; к 6-му дню делилось, как правило, 60—80 % исходно высаженных в микрокапли протопластов. Первое деление индивидуального протопласта табака в микрокапле изображено на рис. 6. Через неделю после начала культивирования делящимся микроколонию доливали по 1—5 мкл среды  $M_0$  из этой же чашки с маслом. Еще через неделю микроколонии, достигшие к этому времени 1—2 мм в диаметре, переносили для регенерации на среду  $M_C$  [28] с 0,5 мг/л БАП пастеровской пипеткой с тонким ровным кончиком и выращивали при 24—26 °С и освещенности 6 000—8 000 лк. Спустя 1—1,5 месяца происходила регенерация; образовавшиеся проростки переносили на безгормональную среду  $M_C$  для укоренения (см. выше).



Рис. 6

Электрослияние индивидуальных преселектированных протопластов в микрокаплях. Подготовку камеры для индивидуального слияния и культивирования продуктов и перенос протопластов по микрокаплям осуществляли, как описано выше. Протопласты рассаживали по микрокаплям раствора РЭС-34. Объем микрокапель для электрослияния составлял около 1 мкл.



Раствор для электрослияния РЭС-34: маннит (х. ч.) — 4 500 мг, ксилоза (ч. д. а.) — 3 800 мг;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (х. ч.) — 14,4 мг;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  (х. ч.) — 6,8 мг; БСА — 5 мг; вода бидистиллированная — до 100 мл.

Электрослияние проводили с помощью микроэлектродов, изготовленных из платиновой проволоки диаметров 50 мкм. Для создания переменного напряжения использовали генератор сигналов низкочастот-

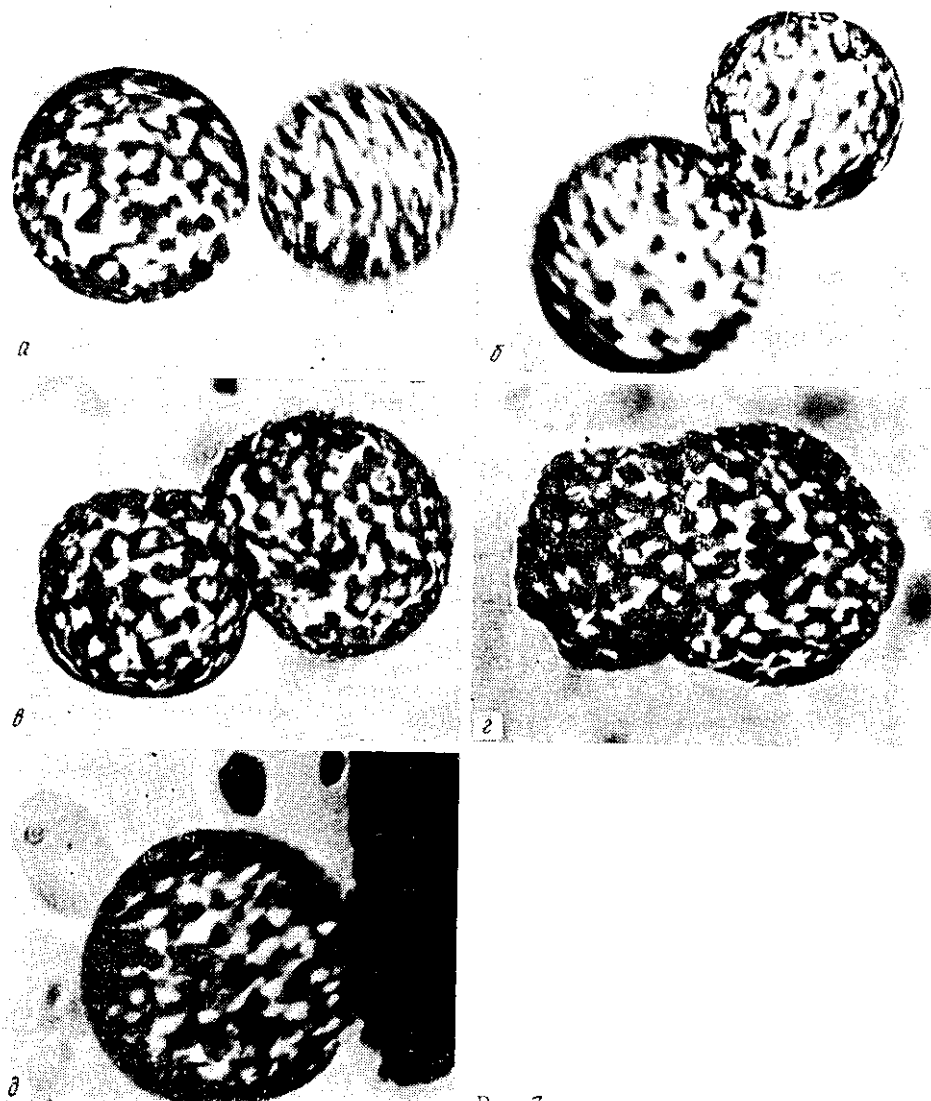


Рис. 7

ный ГЗ-112/1, для подачи прямоугольного импульса — электростимулятор лабораторный ЭСЛ-2. Расстояние между микроэлектродами составляло от 200 до 400 мкм, напряжение: диэлектрофореза — 5—10 В, прямоугольного импульса — 14—20 В. Частота переменного напряжения составляла 1 МГц, длительность прямоугольного импульса — 80 мкс. Скорость слияния достигала 50—100 пар за 1 ч. После завершения электрослияния РЭС-4 замещали 100 нл модифицированной среды КМ-8р [19], дополненной 1 мг/мл БСА.

**Результаты и обсуждение.** Слияние преселектированных протопластов. Разработанная нами технология электрослияния позволила достичь весьма хорошей эффективности процедуры — до 95 % (табл. 2).

Как правило, для индукции слияния (рис. 7, а — д: электрослияние преселектированных протопластов табака в микрокапле) было достаточно одного — двух прямоугольных импульсов. Длительность предшествующего диэлектрофореза составляла обычно менее минуты. На рисунке отчетливо видно, что продукт слияния по мере протекания процесса становится «сморщенным». Эти складки мембраны возникают, очевидно, как следствие изменившегося соотношения поверхности к объему у продукта слияния по сравнению с данным соотношением у родительских протопластов; в результате продукт слияния обладает избыточной поверхностью. Затем на протяжении 30—60 мин происходит округление продукта (рис. 7, д). Увеличение осмолярности среды замедляет процесс округления продукта. Эти наблюдения совпадают с данными Морикава и сотр. [38].

Таблица 2

Эффективность электрослияния некоторых комбинаций растительных протопластов

Родители	Число отобранных пар	Число слившихся пар	Эффективность, % (M±m)
<i>A. belladonna</i> + <i>N. tabacum</i> *	36	27	75,00±7,32
<i>A. belladonna</i> + <i>N. tabacum</i> **	25	18	72,00±9,17
<i>A. belladonna</i> + <i>N. tabacum</i>	30	22	73,33±8,21
<i>N. tabacum</i> +( <i>S. carniolica</i> + <i>N. tabacum</i> )***	34	29	85,29±6,17
<i>N. tabacum</i> +( <i>S. carniolica</i> + <i>N. tabacum</i> )***	37	35	94,59±3,77

\* Растения для опыта получены от М. К. Зубко; \*\* растения для опыта любезно предоставлены и протопласты *A. belladonna* облучены (200 Гр) М. К. Зубко; \*\*\* гибридная комбинация любезно предоставлена С. Г. Кушниром.

У нас сложилось впечатление, что время округления продукта слияния может служить критерием «естественности» протекающего слияния. Так, при слиянии протопластов в 0,3 М растворе на основе маннита округление происходило практически мгновенно, однако продукт почти сразу же, как правило, разрушался. С другой стороны, повышение молярности до 0,7 М не препятствовало слиянию (эффективность процесса в случае протопластов табака составляла около 60 %), округление почти не замедлялось и продукты слияния были стабильными. По нашим данным, нижней границей молярности раствора (на основе маннита) для (индивидуального) электрослияния, отделяющей слияние протопластов с последующим разрушением или гибелью фузанта при культивировании и слияние с образованием стабильного продукта, является 0,4—0,45 М.

Довольно часто подача первого прямоугольного импульса сопровождалась видимым (X400) повреждением соседних участков прилегающих друг к другу мембран протопластов и потоками внутриклеточного материала из одного протопласта в другой; такие же явления могут происходить на полюсах клеток. При этом протопласты резко вздрагивают. Несомненным признаком слияния (при применении описанной нами технологии) является растягивание исходной пары протопластов от одного микроэлектрода к другому, сменяющее предыдущее притяжение протопластов друг к другу в процессе диэлектрофореза. Иногда же слияние происходило через некоторое время после подачи первого импульса или такая подача приводила к тому, что протопласты слегка изменяли взаимное расположение, занимали «удобную» позицию и сливались лишь под действием второго импульса. Можно привлечь к объяснению этих явлений гипотезу об индукции под действием импульса специфического состояния мембраны, благоприятного для слияния; предполагается, что такое состояние существует довольно длительное время [39]. Или же при вздрагивании под действием импульса происходит очистка мембран протопластов от налипших загрязнений; контакт «обнаженных» мембран сам по себе достаточен для слияния [40].

Последнее обстоятельство могло бы прояснить тот факт, что при нашей технологии протопласты сливались с очень высокой эффективностью даже после 4—6-часового пребывания в растворе для электрослияния (см. «Материалы и методы»), если предположить, что под действием электрического импульса от мембраны протопласта могут отделяться синтезирующие блоки клеточной оболочки.

Из данных, представленных в табл. 2, можно сделать вывод о высокой воспроизводимости экспериментальных процедур. Как можно видеть, облучение не снижает эффективности индивидуального слияния (по крайней мере при применявшейся дозе).

Индивидуальное культивирование. Результаты ряда попыток индивидуального культивирования протопластов некоторых видов растений показаны в табл. 3.

Таблица 3

Эффективность индивидуального культивирования протопластов различных видов растений (из [31], с дополнениями)

Вид	Количество, шт.	Поделившиеся клетки, % (M ± m)	Время культивирования, сут
Рапс ( <i>Brassica napus</i> L.)*	60	30,00±5,97	3
Рапс ( <i>B. napus</i> L.)	251	11,55±2,02	6
Капуста ( <i>B. chinensis</i> L.)	50	18,00±5,49	7
Горох ( <i>Pisum sativum</i> L.)	9	44,44±17,57	7
Горох ( <i>P. sativum</i> L.)	51	9,80±4,21	8
Люцерна ( <i>Medicago sativa</i> L.)	90	12,22±3,47	4
Соя ( <i>Glycine max</i> L.)	39	46,15±8,09	6
Клевер ( <i>Trifolium pratense</i> L.)	40	2,50±2,50	7
Табак ( <i>N. tabacum</i> L.), мезофилл, объем микрокапли 2—10 нл, среда То [20] с добавлением 4 мг/мл БСА	45	75,56±6,48	7
Табак ( <i>N. tabacum</i> L.), мезофилл, объем микрокапли 2—10 нл, среда То без добавления БСА	41	75,61±7,69	7
Табак ( <i>N. tabacum</i> L.), мезофилл, объем микрокапли 1—2 мкл, среда То с БСА	53	15,09±4,96	5
Табак ( <i>N. plumbaginifolia</i> Viv.), мезофилл, объем микрокапли 100 нл, среда КМ (см. [19])	25	20,00±8,16	10
Табак ( <i>N. tabacum</i> L.), каллус, объем микрокапли 1—2 мкл, среда То с БСА	56	7,14±3,47	9

Звездочкой отмечены клетки растений, полученные при массовом культивировании протопластов в течение 1—2 сут.

Достоинны внимания высокая эффективность высева протопластов сои, а также то, что клетки рапса, помещенные в микрокапли спустя сутки после выделения протопластов, делятся успешнее, чем протопласты, помещенные в микрокапли сразу же после выделения. По-видимому, хрупкие протопласты при переносе в микрокапли повреждаются сильнее, чем клетки, несмотря на добавление в среду БСА. Эффективность высева индивидуальных протопластов рапса вполне согласуется с известными литературными данными (см. [41]), несмотря на различие в способе культивирования.

В течение первых суток массового культивирования разрушаются многочисленные протопласты, которые сразу после выделения кажутся вполне нормальными; так что выделение протопластов после такого суточного прекультивирования происходит из фракции более жизнеспособных клеток.

Интересен факт деления протопластов мезофилла табака в индивидуальной культуре при очень низкой плотности высева (объем микрокапли 1—2 мкл соответствует плотности 500—1 000 клеток в 1 мл). Это гораздо ниже порога плотности, при которой табак обычно делится в массовой культуре [20]. Рост при сильном разбавлении был характерен

рен и для наших массовых культур протопластов табака на среде Кабоша То [20], содержащей БСА.

Из продуктов слияния с довольно высокой частотой удавалось получать взрослые растения (табл. 4). Как видно из таблицы, стадией, на которой гибнет больше всего продуктов слияния, является культивирование микроколоний. Приводимые величины близки к аналогичным данным Эспанхенберха и соавт. [35].

Т а б л и ц а 4

Эффективность электрослияния индивидуальных протопластов *N. tabacum* (NT) и *N. plumbaginifolia* (NP) (из [37])

Партнеры	Исходное число пар	Слились, % (M±m)	Микроколонии, % (M±m)	Регенерировали, % (M±m)
NT+NP	32	12 (37,5±8,7)	4 (12,5±5,9)	3 (9,4±5,2)
NT+NT	41	35 (85,4±5,6)	9 (21,9±6,5)	5 (12,2±5,2)

Для нас было неожиданным, что продукты обих комбинаций не развиваются на среде То [20] с добавлением 1—4 мг/мл БСА, на которой протопласты обоих партнеров в массовой и индивидуальной культурах делились удовлетворительно. Поскольку растения *N. tabacum*, использованные в опытах по слиянию, были получены из завсегомо одного протопласта путем индивидуального культивирования (см. [23]), регулярная гибель продуктов слияния пар протопластов в комбинации *N. tabacum* + *N. tabacum* на среде То с БСА (при том, что эффективность массового культивирования родительских протопластов достигает на этой среде 50 %, а индивидуального — 80 %, см. [23]) заставляет по-новому взглянуть на проблему подбора сред для культивирования индивидуальных продуктов слияния. Интересно в этой связи отметить, что на среде КМ-8р с БСА протопласты обоих видов развивались гораздо хуже, чем на среде То с БСА.

Предлагаемая нами методика добавления среды микроколониям в микрокаплях, возможно, облегчит подбор среды для культивирования продуктов слияния и повысит эффективность процедуры. По предварительным данным, ее применение значительно увеличивает выживаемость микроколоний, которая достигает 40—60 %. Становится также возможным культивирование продуктов слияния комбинаций таких партнеров, которые очень плохо или совсем не развиваются в микрокаплях при традиционном эмпирическом подходе к добавлению среды (например, последняя комбинация из табл. 2).

Приведенные в табл. 1 данные охватывают почти весь возможный диапазон скоростей развития растительных клеток. Период удвоения объема клетки является в случае индивидуального культивирования более удобным показателем, чем время деления. Как отмечалось еще Джонсом и соавт. [14], некоторые клетки в индивидуальной культуре увеличивают свой объем, не делясь, в течение очень долгого времени; затем (спустя несколько недель или даже месяцев) происходит быстрое развитие микроколоний. По нашим наблюдениям, именно такие клетки особенно уязвимы при неправильном добавлении среды и гибнут в первую очередь. Признаком неправильного добавления среды и приближающейся гибели служат темные или коричневые гранулы (по-видимому, фенольной природы), появляющиеся на дне и стенках микрокапли; гранулы эти возникают и в случае слишком быстрого увеличения объема микрокапли, и при запаздывании с добавлением среды.

Интересно, что успех развития микроколонии зависит не только от собственно объема микрокапли, но и от соблюдения определенного ритма добавления культуральной среды. Нам почти никогда не удавалось получить активно развивающиеся микроколонии, если добавлять среду

реже, чем раз в неделю; с другой стороны, клетки и микроколонию неизменно гибнут и при ежедневной доливке среды. Наилучший результат, по крайней мере для наших объектов, был достигнут при добавлении среды каждые 3—4 дня. Сопоставляя этот срок с подобранным нами эмпирически периодом удвоения объема клетки (3 дня, см. «Материалы и методы»), очень соблазнительно предположить, что правильный режим увеличения объема микрокапли может поддерживать быстрое развитие клеток и микроколонию при соответствии ритму развития последних (о роли периода удвоения объема клетки см. [27]).

Индивидуальное культивирование в той или иной форме уже применяется для культивирования единичных протопластов и клеток [16, 18, 31], гибридных продуктов [34, 35], инъецированных протопластов [36], а иногда его сочетают с методом культуры-няньки [21]. Работа с единичными клетками позволяет провести ценные наблюдения, практически невозможные при массовом культивировании [14].

Кроме этих очевидных приложений, нам хотелось бы обратить внимание читателя на некоторые возможности, вытекающие из логики самой концепции.

1. Манипуляции с отдельными протопластами позволяют работать с видами, для которых выделение и/или очистка протопластов затруднены. Мизерного количества материала становится достаточно для проведения самых сложных клеточно-инженерных операций.

2. Отбор индивидуальных протопластов и наблюдение за их развитием позволяют фенотипически идентифицировать фракцию протопластов, подходящую для определенных процедур. Это значительно повышает эффективность работы и может содействовать совершенствованию «массовых» методик.

3. Индивидуальное культивирование обеспечивает непрерывный мониторинг всех этапов развития клеток и/или реконструированных клеточных систем.

4. Получение отдельного растения или колонии из индивидуального протопласта дает возможность исследовать проблему соматической изменчивости и определить ее «фон» в конкретных условиях культивирования, что может иметь существенное значение для тонких фундаментальных исследований.

5. Метод индивидуального культивирования продуктов слияния преселектированных протопластов и/или субпротопластов позволяет вести культуру без применения селективных маркеров.

6. На основе метода индивидуального культивирования могут быть разработаны принципиально новые технологии слияния индивидуальных протопластов и субпротопластов, микроинъекции индивидуальных клеток, пересадки ядер и органелл и др.

Авторы благодарят И. Костенюка, А. Околота, М. Коросташ за ценные критические замечания при просмотре статьи. Они признательны М. Зубко за любезно предоставленные линии растений, тщательный просмотр рукописи и ценную критику, а также С. Кушниру — за любезно предоставленные линии растений, использованные в данной работе.

#### Резюме

Показано успешный розвиток одиначних протопластів і клітин, а також продуктів злиття одиначних преселектованих протопластів різних видів рослин за допомогою розробленого авторами методу індивідуального культивування у мікрокраплях. Ефективність висіву складала від 2 (конюшина) до 75 % (тютюн), ефективність електрозлиття одиначних протопластів сягала 95 %. Описано застосовану технологію електрозлиття, запропоновано нову процедуру додання культурального середовища клітинам, що знаходяться в мікрокраплях, яка дозволяє значно підвищити ефективність методу.

## Summary

Successful development of different plant species single cells, protoplasts and products of preselected single protoplast fusion has been shown using the method of individual culturing in microdroplets developed. The highest plating efficiency among the individual protoplasts reached about 75 % (soybean), the lowest one — 2,5 % (clover). Electrofusion efficiency was as high as 95 %. In this article we describe our individual culturing and electrofusion technology.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аристотель*. Сочинения. М.: Мысль, 1981.— Т. 3.— 613 с.
2. *Modulation and direction of the electrofusion response in plant protoplasts* / M. J. Tempelaar, A. Duyst, S. Y. de Vlas et al. // *Plant Sci.*— 1987.— 48, N 2.— P. 99—105.
3. *Tempelaar M. J., Jones M. G. K.* Directed electrofusion between protoplasts with different responses in a mass fusion system // *Plant Cell Repts.*— 1985.— 4, N 2.— P. 92—95.
4. *Tempelaar M. J., Jones M. G. K.* Analytical and preparative electrofusion of plant protoplast // *Oxford surveys of plant mol. and cell biol.*— 1985.— 2.— P. 347—351.
5. *Caplin S. M.* Mineral oil overlay for conservation of plant tissue cultures // *Amer. J. Bot.*— 1959.— 46, N 5.— P. 324—329.
6. *Lumiere A., Chevrotier A.* Sur la vitalite des cultures de gonocoques // *Compt. Rend. Acad. Sci.*— 1914.— 158.— P. 1820—1821.
7. *Ungermann E.* Eine Einfache Methode zur Gewinnung von Dauerkulturen Empfindlicher Bakterienarten und zur Erhaltung der Virulenz Tierpathogener Keime // *Arb. Reichsgesundheitsamte.*— 1918.— 51.— S. 180—199.
8. *Buell C. B., Weston W. H.* Application of the mineral oil conservation method to maintaining collection of fungus cultures // *Amer. J. Bot.*— 1947.— 34, N 10.— P. 555—561.
9. *Michael M.* Die Konservierung Schwer Haltbarer Bakterienkulturen, Insbesondere des Gonococcus (Modifikation der Ungermanschen Methode) // *Zbl. Bakteriol., Parasitenk., Infektionskrankh. und Hyd. I.*— 1921.— 0.86.— S. 507—510.
10. *Morton H. E., Pulaski E. J.* The preservation of bacterial cultures // *J. Bacteriol.*— 1938.— 35, N 1.— P. 163—183.
11. *Sherf A. F.* A method for maintaining *Phytopomonas sepedonica* in culture for long periods without transfer // *Phytopathology.*— 1943.— 33.— P. 330—332.
12. *Wildy P., Stocher M.* Multiplication of solitary *HeLa* cells // *Nature.*— 1958.— 181, N 4620.— P. 1407—1408.
13. *Vogt M., Dulbecco R.* Properties of *HeLa* cell culture with increased resistance to poliomyelitic virus // *Virology.*— 1958.— 5, N 2.— P. 425—434.
14. *Growth of somatic tobacco cells in microculture* / L. E. Jones A. C. Hildebrandt, A. J. Riker, J. H. Wu // *Amer. J. Bot.*— 1960.— 47, N 6.— P. 468—475.
15. *Rodnight L.* Manometric determination of the solubility of oxygen in liquid paraffin, olive oil, and silicone fluids // *Biochem. J.*— 1954.— 57, N 3.— P. 661—663.
16. *Gleba Yu. Yu.* Microdroplet culture: tobacco plants from single mesophyll protoplasts // *Naturwissenschaften.*— 1978.— 65.— S. 158.
17. *Koop H.-U., Weber G., Schweiger H.-G.* Individual culturing of selected single cells and protoplasts of higher plants in microdroplets of defined media // *Zbl. Pflanzenphysiol.*— 1983.— 112.— P. 21—34.
18. *Koop H.-U., Schweiger H.-G.* Regeneration of plants from individually cultivated protoplasts using an improved microculture system // *J. Plant Physiol.*— 1986.— 121, N 3.— P. 245—257.
19. *Kao K. N., Michayluk M. R.* Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media // *Planta.*— 1975.— 126, N 2.— P. 105—110.
20. *Caboche M.* Nutritional requirements of protoplast-derived haploid tobacco cell grown at low densities in liquid medium // *Ibid.*— 1980.— 149.— P. 7—18.
21. *An intergeneric hybrid cell line of *Duboisia hopwoodii* and *Nicotiana tabacum* by protoplast fusion* / T. Endo, T. Komiyama, Y. Masumitsu et al. // *J. Plant Physiol.*— 1987.— 129, N 5.— P. 453—459.
22. *Culture of low numbers of forage legume protoplasts in membrane chambers* / D. M. Gilmour, M. R. Davey, E. C. Cocking, D. Pental // *Ibid.*— 126, N 4/5.— P. 457—465.
23. *Кириченко И. В., Мельников П. В., Глеба Ю. Ю.* Регенерация растений из индивидуально культивируемых протопластов табака // *Докл. АН УССР. Сер. Б.*— 1989.— № 7.— С. 63—65.
24. *Eibs H.-G., Spielmann H.* Preimplantation embryos. I. Laboratory equipment, preparation of media, sampling and handling of the embryos // *Meth. in prenatal toxicology* / Eds D. Neubert et al.— Stuttgart: Thieme publ., 1977.— P. 210—220.
25. *Cocking E. C.* Plant cell protoplasts-isolation and development // *Ann. Rev. Plant Physiol.*— 1972.— 23.— P. 29—50.
26. *Koop H.-U., Schweiger H.-G.* Regeneration of plants after electrofusion of selected pairs of protoplasts // *Eur. J. Cell Biol.*— 1985.— 36, N 7 (Suppl.)— P. 46—49.

27. Шмальгаузен I. Ріст організмів.— К. : Медвидав, 1932.— 81 с.
28. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant*.— 1962.— 15, N 2.— P. 473.
29. Medgyesy P., Menczel L., Maliga P. The use of cytoplasmic streptomycin resistance for chloroplast transfer for *Nicotiana sylvestris* and isolation of their somatic hybrids // *Mol. and Gen. Genet.*— 1980.— 179, N 3.— P. 693—698.
30. Kuchuk N. V. Isolation and cultivation of protoplasts from five legume species // *Sov. Plant Physiol.*— 1989.— 36, N 4.— P. 675—677.
31. Індивідуальне культивування растительных протопластов и клеток / И. В. Кириченко, Н. В. Кучук, Л. А. Сахио, Ю. Ю. Глеба // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1990.— № 3.— С. 63—65.
32. Eibs H.-G., Spielmann H. Preimplantation embryos. II. Culture and transplantation // *Meth. in prenatal toxicology* / Eds. D. Neubert et al.— Stuttgart: Thieme publ., 1977.— P. 221—227.
33. Brinster R. L. *In vitro* cultivation of mammalian ova // *Adv. Biosci.*— 1969.— N 4.— P. 200—233.
34. Скаржинська М. В. Одержання гібридних клітинних клонів шляхом індивідуального культивування одиничних продуктів злиття ізольованих протопластів // Укр. бот. журн.— 1980.— 36, № 6.— С. 58—73.
35. Somatic hybridization by microfusion of defined protoplasts in *Nicotiana*: morphological, genetic, and molecular characterization / G. Spangenberg, M. Osusky, M. M. Oliveira et al. // *Theor. and Appl. Gen.*— 1990.— 80, N 5.— P. 577—587.
36. Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts / A. Grossway, J. V. Oakes, J. M. Irvine et al. // *Mol. and Gen. Genet.*— 1986.— 202, N 2.— P. 179—185.
37. Кириченко И. В. Слияние индивидуальных пар преселектированных протопластов табака при помощи электрического поля // Докл. АН УССР. Сер. Б.— 1990.— № 6.— С. 71—74.
38. Cellular and vacuolar fusion of protoplasts electrofused using platinum microelectrodes / H. Morikawa, Y. Hayashi, Y. Hirabayashi et al. // *Plant Cell Physiol.*— 1988.— 29, N 1.— P. 189—193.
39. Sowers A. E. The mechanism of electroporation and electrofusion in erythrocyte membranes // *Electroporation and electrofusion in cell biol.* / Eds E. Neumann et al.— New York; London: Plenum press, 1989.— P. 229—256.
40. Vollet J. J., Roth L. E. Cell fusion by nascent-membrane induction and divalent-cation treatment // *Cytobiologie.*— 1974.— 9, N 3.— P. 249—262.
41. Microculture of single protoplasts of *Brassica napus* / G. Spangenberg, H.-U. Koop, R. Lichter, H. G. Schweiger // *Physiol. Plant.*— 1986.— 66, N 1.— P. 1—8.

Ин-т клеточ. биологии и генет. инженерии АН УССР,  
Киев

Получено 14.01.91

УДК 575.1

Т. П. Пастернак

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЗЛАКОВ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

*Рассмотрены современное состояние и перспективы в генетической трансформации злаков. Показана ограниченная возможность применения для злаков традиционных методов трансформации (прямая трансформация протопластов и др.) и перспективность нетрадиционных методов, исключающих этапы культивирования ткани *in vitro* (использование прорастающих пыльцевых трубок, инъекция в незрелые соцветия или в свежесплодотворенную завязь).*

В последние годы в практической селекции растений начинают все более широко использоваться растения, полученные методами генетической инженерии — соматические гибриды, трансформанты. Однако в подавляющем большинстве это — двудольные растения, в первую очередь растения семейства *Solanaceae*, что обусловлено прежде всего тем, что основная масса новых технологий разрабатывается сначала для представителей семейства *Solanaceae* и лишь затем модифицируется для плохо поддающихся культивированию *in vitro* растений семейства *Gramineae*. Между тем именно растения семейства *Gramineae* играют важ-

© Т. П. Пастернак, 1991.