

## Лекции 6-7.

### 6. Применение методов *in vitro* в селекции растений.

Использование методов *in vitro* для размножения нежизнеспособных гибридов. Эмбриокультура, тотипотентность растительных тканей. Соматический эмбриогенез. Использование культуры изолированных тканей и клеток в селекции растений.

### 7. Клональное микроразмножение растений и оздоровление растительного материала. Этапы

клонального микроразмножения растений. Микрочеренкование. Технология получения безвирусного посадочного материала картофеля, земляники, смородины, и других культур. Технология и агротехника возделывания картофеля из пробирочных микрорастений и производства оздоровленного элитного посадочного материала



# 7. Клональное микроразмножение растений

Клональное микроразмножение – это метод получения растений идентичного материнскому с использованием техники *in vitro*.

По своей сути микроклональное размножение один из способов вегетативного размножения растений с той лишь разницей, что оно протекает в пробирке в условиях *in vitro*, где из клеток изолированных тканей в итоге можно получить достаточно большое количество растений.

Микроклональное размножение проводится в условиях стерильности и в с использованием спецоборудования.



В настоящее время число видов растений, которые можно клонировать «в пробирке» уже составляет несколько тысяч. Самые популярные с/х культуры: картофель (оригинальное семеноводство), плодово-ягодные культуры (земляника, яблоня, малина и др.), декоративные растения (роза, лилия, гортензии и др.)

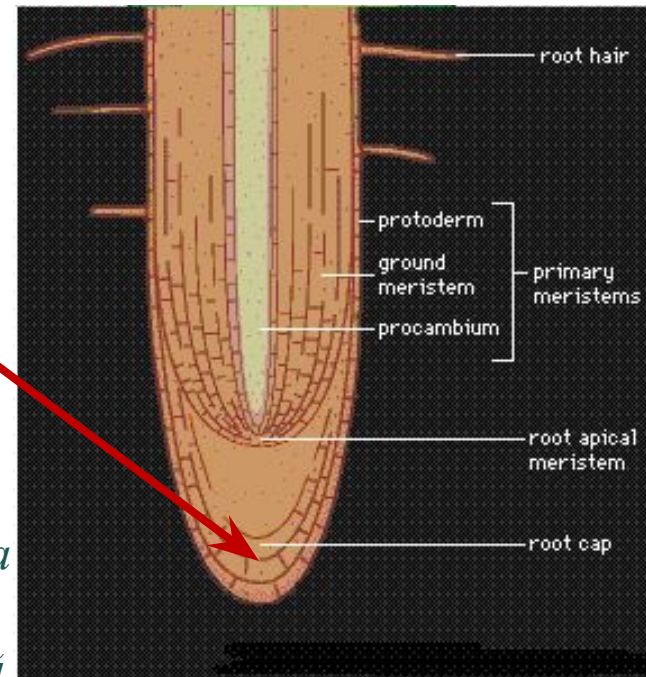
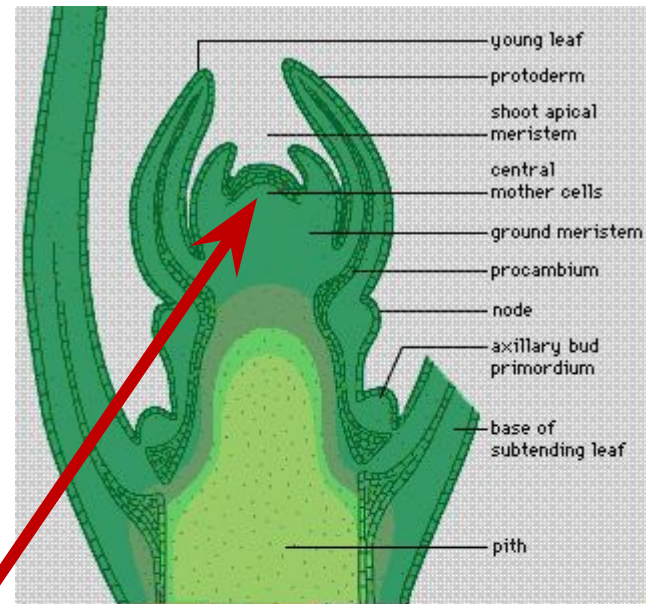
# ПРЕИМУЩЕСТВА ПЕРЕД СУЩЕСТВУЮЩИМИ ТРАДИЦИОННЫМИ СПОСОБАМИ РАЗМНОЖЕНИЯ:

- высокий коэффициент размножения;
- возможность круглогодичной работы, экономия площадей;
- получение генетически однородного посадочного материала;
- освобождение растений от вирусов за счет использования меристемной культуры;
- ускорение перехода растений от ювенильной к репродуктивной фазе развития;
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- получение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность автоматизации процесса выращивания.

# Области применения клонального микроразмножения

1. в селекции для поддержания и размножения растений с уникальными генотипами;
2. для быстрого размножения новых и уже существующих сортов;
3. массового получения оздоровленного посадочного материала у растений, подверженных вирусным заболеваниям;
4. для быстрого размножения некоторых гетерозиготных садовых культур, обычно размножающихся семенами и расщепляющихся при скрещивании;
5. для быстрого клонального размножения *in vitro* лучших экземпляров взрослых древесных растений, разведение и селекция которых осуществляется медленно вследствие длительности процесса полового размножения;
6. для сохранения редких и исчезающих видов.

- Основное требование к объектам, которые используются для микроклонального размножения, это сохранение генетической стабильности на всех этапах онтогенеза.
- Этому требованию удовлетворяют апексы и пазушные почки стеблевого происхождения.
- Для микроклонального размножения также могут быть использованы меристематические ткани и изолированные органы, способные давать адвентивные почки.
- Такие почки могут развиваться на корнях, побегах и листьях.

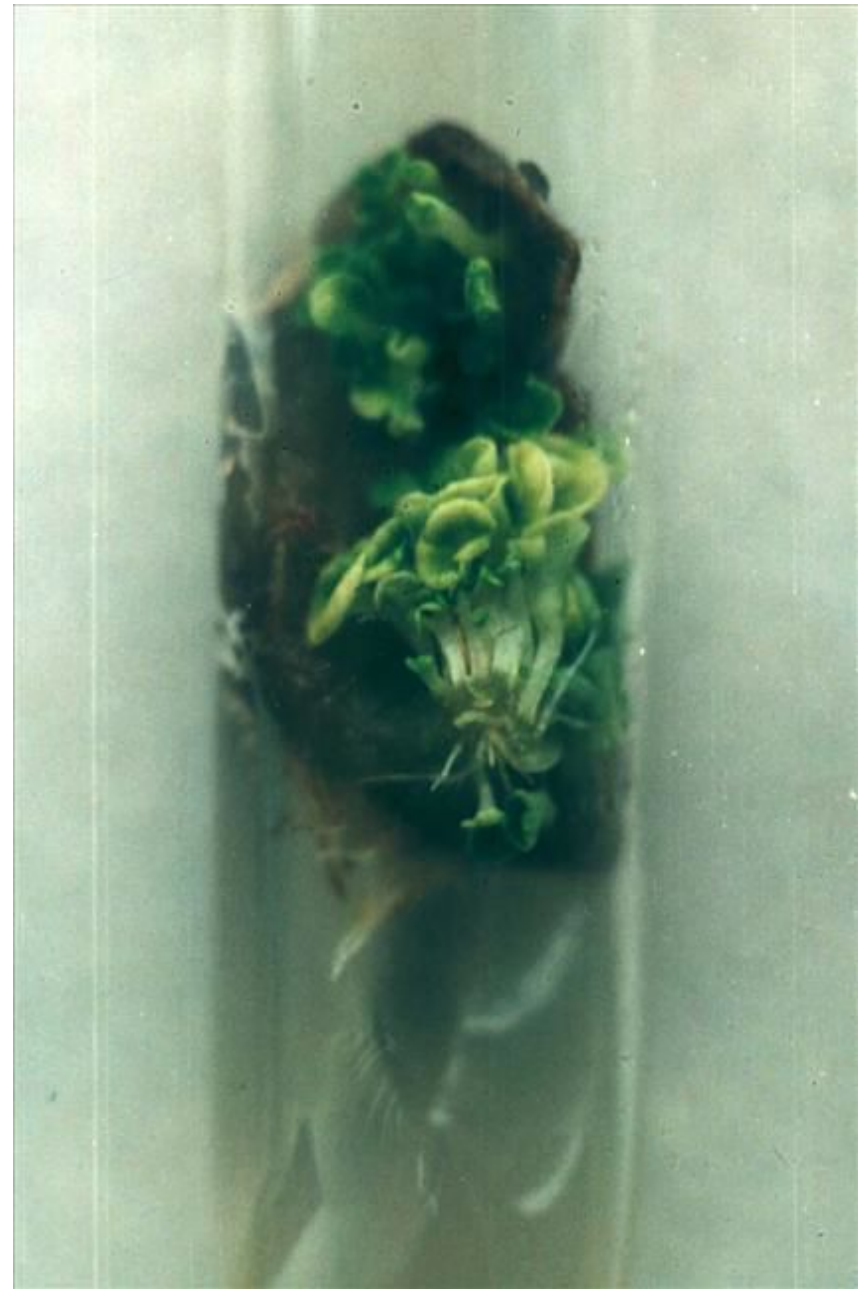


Адвентивные побеги — побеги, которые образуются на любом участке стебля, корня или листа.

Адвентивные почки – почки, образующиеся на любой части растения, кроме пазухи листа.



Например, африканская фиалка (сенполия) размножается с помощью адвентивных почек, образующихся на листовых черешках. Разработан метод, с помощью которого *in vitro* в результате использования отрезков размером 2 мм, можно получить до 20 000 проростков из каждого черешка.

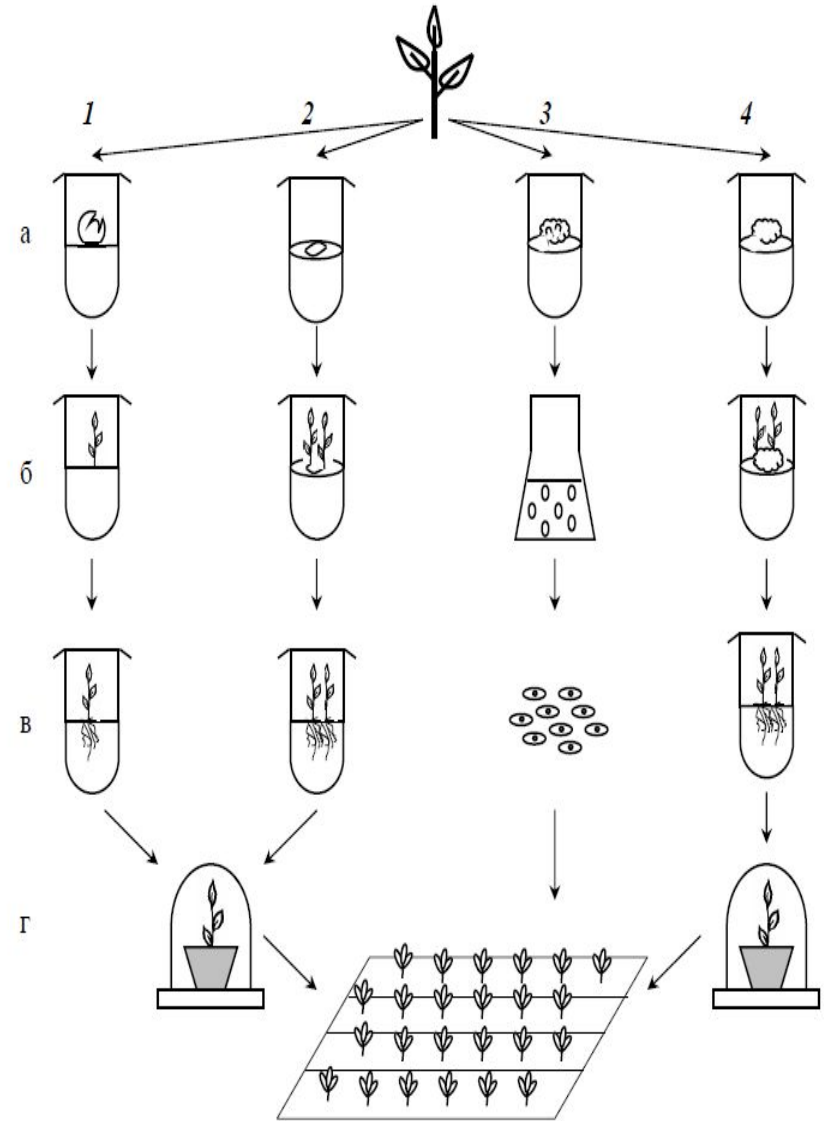




# Схемы клонального микроразмножения растений

- 1 – активация развития меристемы;**  
**2 – образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте;**  
**3 – индукция соматического эмбриогенеза в каллусе и суспензионной культуре;**  
**4 – образование адвентивных почек в каллусной ткани:**

- а – получение стерильной культуры;*  
*б – формирование микропобегов и развитие соматических эмбриоидов;*  
*в – укоренение микропобегов и образование искусственных семян;*  
*г – перевод растений–регенерантов в тепличные условия с последующей высадкой в поле*

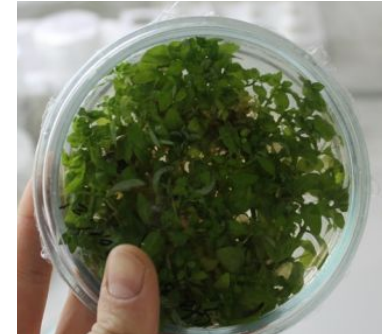


1. Основной метод, используемый при клональном микроразмножении растений, – **это активация развития уже существующих в растении меристем.** Он основан на снятии явления апикального доминирования, что может быть достигнуто следующими путями:



а) удалением верхушечной меристемы стебля и последующим микрочеренкованием побега на безгормональной среде;

б) добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа действия, индуцирующих развитие многочисленных пазушных побегов.

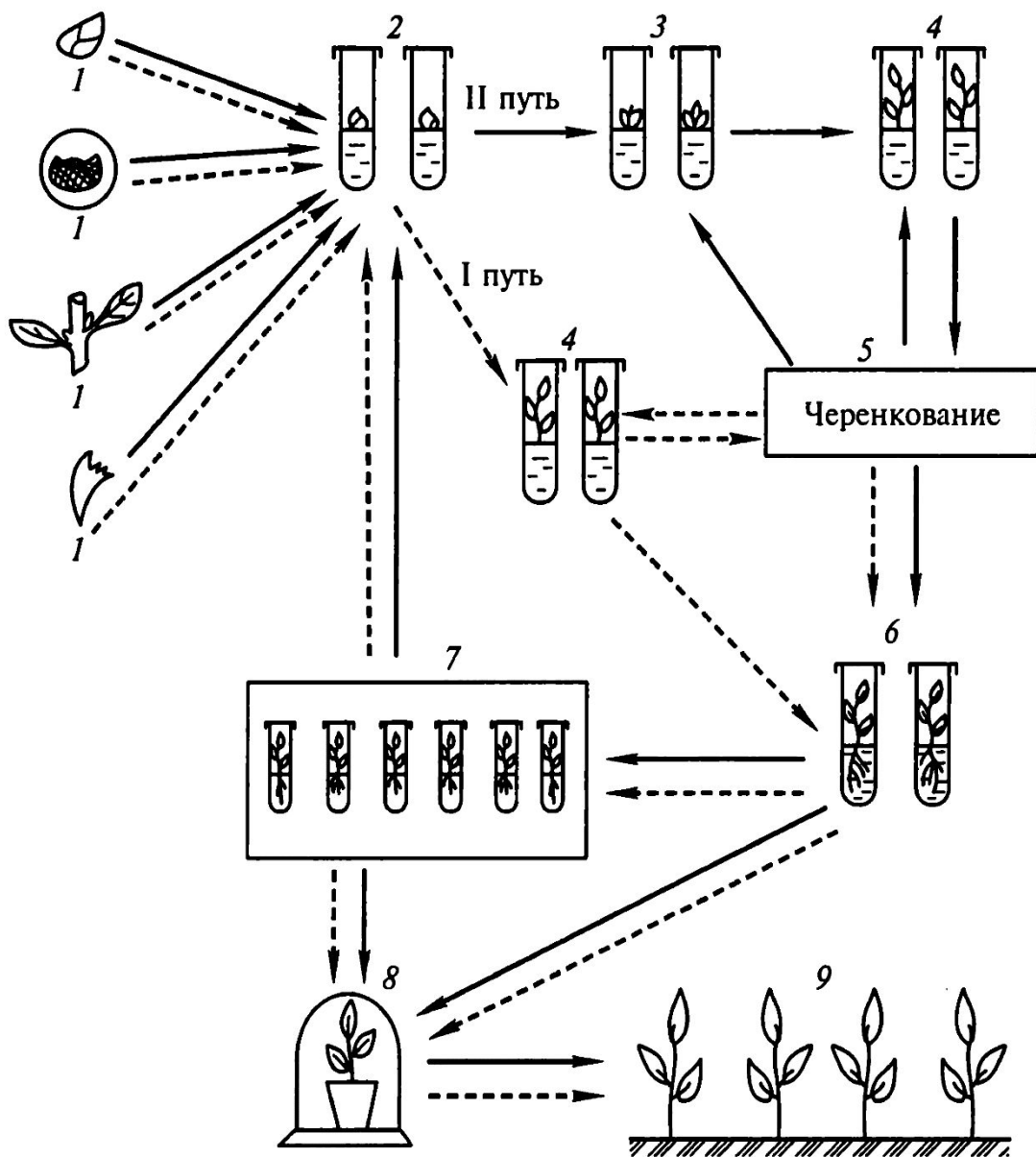


Для этого используют **БАП** или **кинетин**, а также **2-изопентениладенин** и **зеатин**.

Полученные побеги отделяют от первичного материнского экспланта и вновь культивируют на свежеприготовленной питательной среде, стимулирующей пролиферацию пазушных меристем и возникновение побегов более высоких порядков.



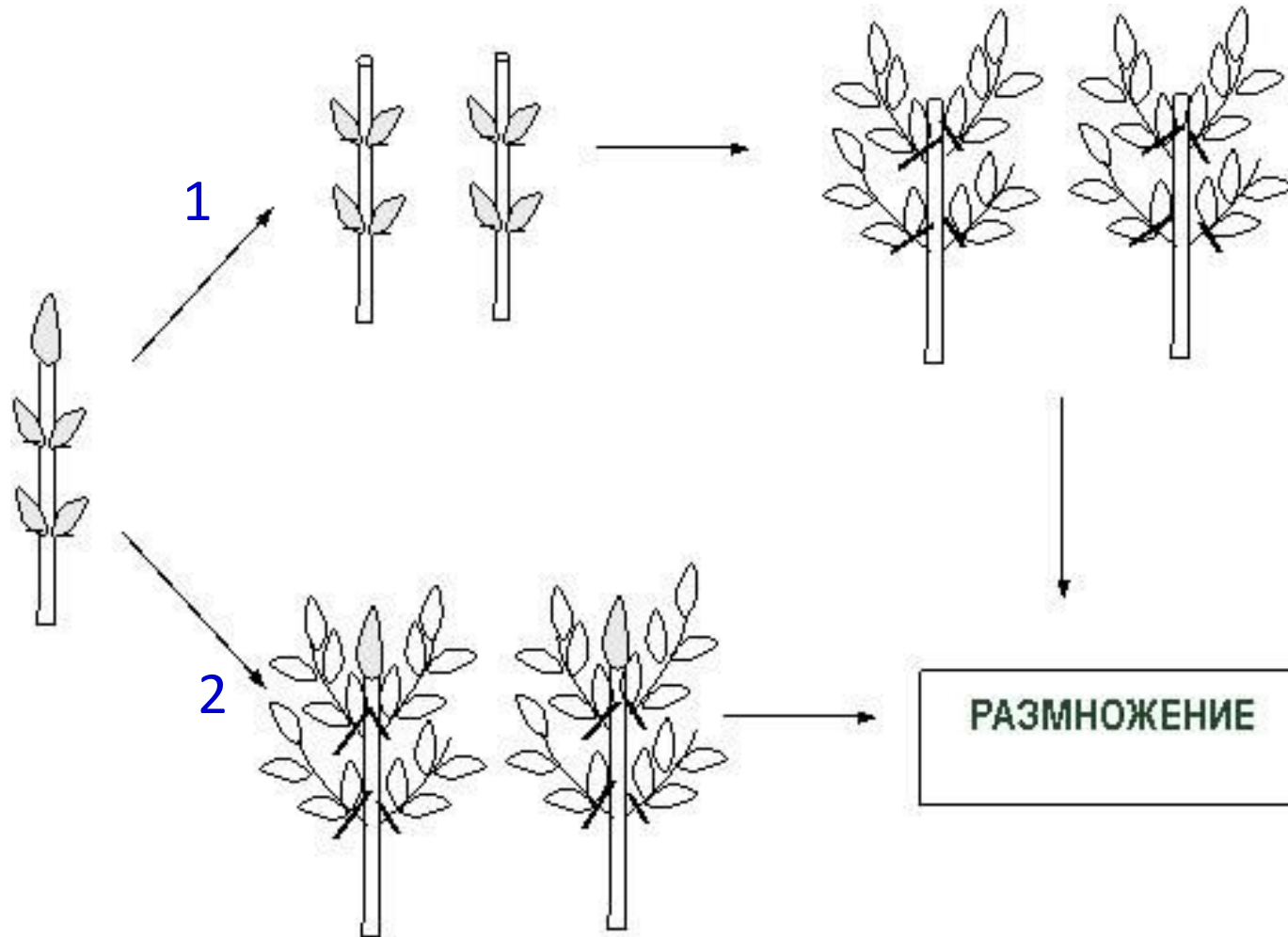
**СХЕМА КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ АКТИВАЦИИ РАЗВИТИЯ СУЩЕСТВУЮЩИХ МЕРИСТЕМ (I ПУТЬ), ИНДУКЦИИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ АДВЕНТИВНЫХ ПОЧЕК НА ЭКСПЛАНТЕ (II ПУТЬ):**



- 1 – выбор исходного экспланта;
- 2 – получение стерильной культуры;
- 3 – образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте;
- 4 – рост почек и формирование микропобегов;
- 5-6 – размножение микропобегов (черенкование);
- 7 – депонирование растений-регенерантов при пониженной температуре;
- 8 – перевод растений в тепличные условия;
- 9 – высадка растений-регенерантов в почву.

# СХЕМА РАЗМНОЖЕНИЯ РАСТЕНИЙ МЕТОДОМ АКТИВАЦИИ ПАЗУШНЫХ МЕРИСТЕМ:

- 1 – ПУТЕМ УДАЛЕНИЯ ВЕРХУШЕЧНОЙ МЕРИСТЕМЫ:
- 2 – ДОБАВЛЕНИЕМ ГОРМОНОВ В СРЕДУ.



В настоящее время метод активации развития существующих в растении меристем широко используется в производстве безвирусного посадочного материала

-**ТЕХНИЧЕСКИХ** (*сахарная свекла, хмель, табак, топинамбур, стахис*) и **ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР** (*томаты, картофель, огурец, перец, тыква, спаржа и др.*), а также для размножения культур промышленного цветоводства (*гвоздика, хризантема, роза, гербера*), **ТРОПИЧЕСКИХ И СУБТРОПИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ** (*рододендрон, азалия, камелия, чай и др.*), **ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР** (*яблоня, слива, вишня, груша, виноград, малина, смородина, крыжовник и др.*) и **ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ** (*тополь, ива, ольха, береза, рябина, секвойя, туя, можжевельник и др.*).



Для картофеля технология клонального микроразмножения поставлена на промышленную основу. Применение метода активации развития существующих в растении меристем позволяет получать из одной меристемы картофеля более **105** растений в год, причем технология предусматривает получение в пробирках микроклубней – ценного безвирусного семенного материала.



*а*



*б*



*в*



2

3

**1** **Микроклональное размножение картофеля:**

*1 - микрорастение картофеля; 2 – размножение картофеля in vitro; 3 – микроклубни безвирусного картофеля.*

## 2 метод – индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта.

- Он основан на способности изолированных частей растения при благоприятных условиях питательной среды восстанавливать недостающие органы и, таким образом, регенерировать целые растения.
- Образования адвентивных почек можно добиться почти из любых органов и тканей растения (изолированного зародыша, листа, стебля, семядолей, чешуек и донца луковицы, сегментов корней и зачатков соцветий).

Данным методом были размножены:

- Многие луковичные цветочные растения (*нарциссы, лилии, гиацинт, гладиолусы, тюльпаны*).
- Овощные культуры: *лук, чеснок, томаты*;
- Представители рода *Brassica* (*капуста цветная, кочанная, брюссельская, листовая, брокколи*);
- Цветочные культуры: *петунья, гloxиния, фиалки*;
- Некоторые представители *древесных растений*.



- Этот процесс, как правило, происходит на питательных средах, содержащих только цитокинины или цитокинины в сочетании с ауксинами в соотношении 10 : 1 или 100 : 1.
- В качестве ауксина наиболее часто используют ИУК



### 3 метод - индукция соматического эмбриогенеза

Основывается на дифференциации зародышеподобных структур из соматических клеток, которые по своему внешнему виду напоминают зиготические зародыши.

В настоящее время данное явление используется для размножения большинства растений из семейств *орхидных* и *рутовых*, некоторых представителей злаковых (пшеница, ячмень), люцерны, редиса, винограда, а также некоторых видов древесных пород (осина, эвкалипт, дуб, ель обыкновенная).

- Это единственный возможный способ размножения гвинейской масличной пальмы (*Elaeis guineensis*), масло которой широко используется при производстве маргарина и пищевого масла.
- Так же можно размножать и пшеницу





## **Недостатки метода**

Соматический эмбриогенез является достаточно трудоемкой операцией, так как не всегда удастся реализовать свойственную клеткам **тотипотентность** (*способность клетки путем деления дать начало любому клеточному типу организма*).

## **Преимущества метода**

Сокращение последнего этапа клонального микроразмножения, требующего подбора специальных условий укоренения и адаптации пробирочных растений, т.к. соматические зародыши представляют собой полностью сформировавшиеся растеньица.

При использовании соответствующей техники капсулирования из этих эмбриоидов можно получить искусственные семена.



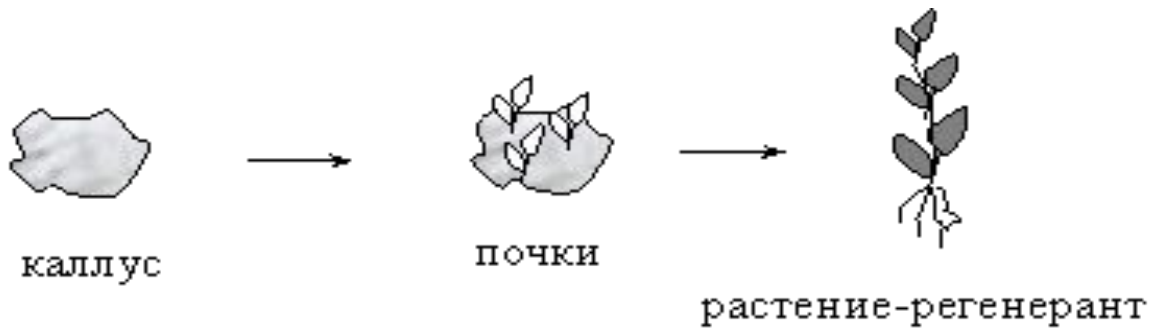
## 4 метод - дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадоочной каллусной ткани.

Редко используется для получения посадочного материала *in vitro*. Это связано с тем, что при периодическом пересаживании каллусной ткани на питательную среду наблюдаются явления, нежелательные при микроразмножении:

- изменение ploидности клеток,
- структурные перестройки хромосом и накопление генных мутаций,
- потеря морфогенетического потенциала культивируемыми клетками.

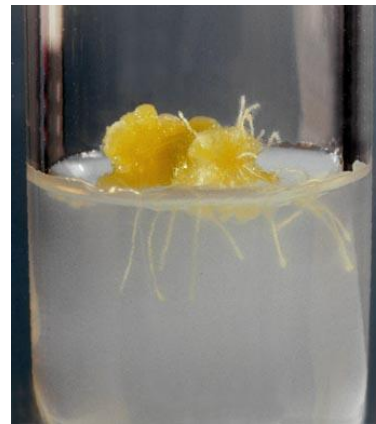
Данный метод целесообразно применять лишь к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, а вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. *К таким растениям можно отнести амариллис, томаты, спаржу, некоторые древесные породы и другие культуры.*

# Дифференциация адвентивных почек в каллусной ткани



Образование побегов из каллусной ткани на питательной среде.

*Каллус - особая ткань, состоящая из недифференцированных клеток*



Каллус на питательной среде



Растение-регенерант твердой пшеницы

# Процесс клонального микроразмножения можно разделить на несколько этапов:

1-й этап

**Выбор растения донора, изолирование и стерилизация экспланта, создание условий для его роста на питательной среде *in vitro***

2-й этап

**Собственно размножение, осуществляемое одним из четырех перечисленных ранее способов**

3-й этап

**Укоренение размноженных побегов**

4-й этап

**Высадка растений-регенерантов в почву.**

## 1–й этап

**Выбор растения донора, изолирование и стерилизация экспланта, создание условий для его роста на питательной среде *in vitro***

### Требования

Получения хорошо растущей стерильной культуры. Используют среду МС, с различными биологически активными веществами и стимуляторы роста (ауксины, цитокинины) в различных сочетаниях в зависимости от объекта. Продолжительность первого этапа – от 1 до 2 месяцев.

## 2-й этап

**Собственно размножение, осуществляемое одним из четырех перечисленных ранее способов.**

### **Требования**

Используют питательную среду МС с оптимальным соотношением и концентраций цитокининов (БАП - 1 - 10 мг/л) и ауксинов (ИУК и НУК - до 0,5 мг/л). Не допускается культивирование растительных тканей в питательных средах с повышенным содержанием цитокининов (10 мг/л), т.к. происходит постепенное накопление их в тканях выше необходимого физиологического уровня, что приводит к формированию растений с измененной морфологией.

## 3–й этап

### **Укоренение размножен- ных побегов**

### **Требования**

Замена основного состава среды. Уменьшение в 2-4 раза концентрации минеральных солей в среде МС, снижение концентрации сахара до 0,5–1 % и полное исключение цитокининов (оставляют лишь ауксины). В качестве стимулятора корнеобразования используют ИМК, ИУК или НУК.

### **Укоренение микропобегов проводят двумя способами:**

- выдерживание микропобегов в течение 2–24 ч в стерильном концентрированном растворе ауксина (20–50 мг/л) с последующим их культивированием на агаризованной среде без гормонов или непосредственно в подходящем почвенном субстрате (импульсная обработка);
- культивирование микропобегов в течение 3–4 недель непосредственно на питательной среде, содержащей ауксин в невысоких концентрациях (1–5 мг/л).



- В последнее время предложены методы укоренения пробирочных растений в условиях гидропоники и аэропоники. Эти методы позволяют значительно упростить этап укоренения и одновременно получать растения, адаптированные к естественным условиям.



[www.aeroponica.su](http://www.aeroponica.su) ; [www.aerogidroponica.ru](http://www.aerogidroponica.ru) ;  
[http://www.vniisb.ru/ru/groups/aeroponic\\_technology/](http://www.vniisb.ru/ru/groups/aeroponic_technology/)

## 4–й этап

**Высадка  
растений–  
регенерантов  
в почву.**

### Требования

Время для пересадки пробирочных растений – весна или начало лета. Растения с двумя–тремя листьями и хорошо развитой корневой системой вынимают из колб или пробирок пинцетом.

Корни отмывают от остатков агара и высаживают в почвенный субстрат, предварительно простерилизованный при 85–90 °С в течение 1–2 ч. 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 или горшочки с растениями накрывают стеклянными банками или полиэтиленовыми пакетами.

Процесс адаптации пробирочных растений к почвенным условиям является наиболее дорогостоящей и трудоемкой операцией. Нередко после пересадки растений в почву наблюдается остановка в росте, опадение листьев и их гибель. Это связано:

- 1. С нарушением деятельности устьичного аппарата, вследствие чего происходит потеря большого количества воды.**
- 2. У некоторых растений в условиях *in vitro* не происходит образования корневых волосков, что приводит, в свою очередь, к нарушению поглощения воды и минеральных солей из почвы.**

# Возможные варианты адаптации растений-регенерантов



Пробирочные растения маклеи сердцевидной перед высадкой в рулоны



Пробирочные растения маклеи сердцевидной высаженные в рулоны с торфом



Растения маклеи сердцевидной высаженные в вегетационные сосуды

Целесообразно на третьем и четвертом этапах клонального микроразмножения применять искусственную микоризацию растений (для микотрофных).

*При разработке методов клонального микроразмножения растений необходимо учитывать влияние генетических, физиологических, гормональных и физических факторов.*

- ! *Методика, разработанная для определенного клона одного вида не всегда может быть применена для размножения других представителей этого вида и тем более растений другого вида.*



Клональное микроразмножение рассматривается как перспективный метод вегетативного размножения растений.

Во многих странах мира биоиндустрия микрклонального размножения поставлена на промышленную основу и представлена десятками активно функционирующих предприятий.

*Например, во Франции 94 % всей продукции цветочных культур получают методом культуры изолированных тканей. В США около 100 коммерческих предприятий получают посадочный материал декоративных, овощных, полевых, плодовых и лесных культур методом клонального микроразмножения. Ведущим производителем оздоровленного посадочного материала цветочных растений является Голландия, а подвоев яблони, сливы и персика — Италия.*



## 2. Получение безвирусного посадочного материала

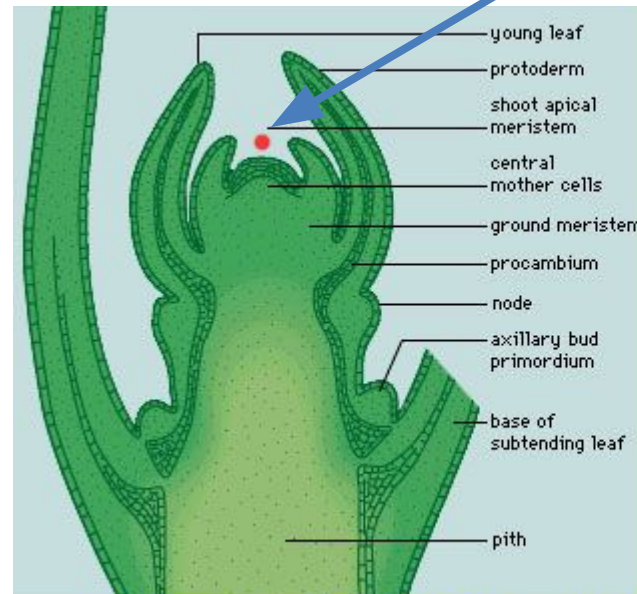
Вирусные болезни – причина потери от 10 до 50 % урожая сельскохозяйственных культур, размножающихся вегетативно.

Установлено, что соя и некоторые другие важные бобовые растения передают вирусы потомству даже при семенном размножении, в результате чего сорта постепенно отягощаются грузом вирусных инфекций.

Наиболее эффективный для оздоровления от вирусов, виридов и микроплазм способ – культивирование меристем стебля или органов стеблевого происхождения.

В основе используемого на практике явления лежит специфика строения точки роста растений.

Дистальная ее часть, представленная апикальной меристемой, у разных растений имеет средний диаметр до 200 мкм и высоту от 20 до 150 мкм.



Размеры меристемных эксплантов, используемых для получения безвирусных растений, могут значительно различаться. Предпочтительно использовать предельно малый размер экспланта (0,075–0,1 мм) и разработать оптимальные условия для получения жизнеспособных пробирочных растений.

Если это невозможно, то рекомендуется дополнять культуру меристем **термо- и хемотерапией**. В этом случае предварительная обработка исходных растений сухим горячим воздухом или химическими агентами позволяет добиться оздоровления от вирусов при использовании меристемных эксплантов размером 0,3–0,8 мм.

- Растения, подвергающиеся термотерапии, помещают в специальные термокамеры, где в течение первой недели повышают температуру до 37 °С путем ежедневного ее увеличения на 2 °С. Продолжительность термотерапии всецело зависит от особенностей вирусов и их термочувствительности. *Если, например, для получения безвирусной гвоздики достаточно 12-недельного воздействия теплом, то для освобождения хризантемы от Б-вируса этот период более продолжителен.*
- Помимо эффекта термотерапии, выявлено положительное воздействие высоких температур на точку роста и процессы морфогенеза некоторых цветочных культур (*гвоздики, хризантемы, фрезии*) в условиях *in vitro*. Термотерапия позволяет увеличить коэффициент их размножения на 50-60%, повысить адаптацию пробирочных высокий процент безвирусных маточных растений.

# Этапы получения пробирочных растений картофеля



Питательные  
среды

Пробирочное  
растение из  
меристемы  
после  
черенкования

Посадка апикальной  
меристемы

Пробирочное растение из  
меристемы



# Этапы получения безвирусного картофеля

38 °



Ростки картофеля  
перед вычленением  
меристемы



Рост меристемы  
картофеля в пробирке



Растения картофеля *in vitro*



Черенкование побегов  
картофеля



Растения картофеля перед  
высадкой в открытый грунт



Растения картофеля в  
открытом грунте