



**Биотехнология
в селекции растений**
Часть 2.

Вспомогательные технологии
in vitro

Основные селекционные задачи:

- Создание нового исходного материала для селекции
- Ускорение селекционного процесса
- Повышение эффективности отбора ценных генотипов
- Снижение трудоемкости селекционных работ

Генетическая неоднородность клеток в культуре

Соматические мутации

Генетические мутации

Полипloidия и анеупloidия

Физические мутагены – рентгеновское, гамма- и УФ-излучение

Химические мутагены – этилметансульфонат, нитрозометилмочевина, нитрозоэтилмочевина

Соматическая гибридизация, слияние протопластов (этиленгликоль, высокая концентрация двухвалентных ионов, высокое значение pH, лазерное облучение)

Низкий выход регенерантов у злаков

Пыльцевая селекция (получение гаплоидов с последующей спонтанной или принудительной диплоидизацией)

Предбридинг

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ *IN VITRO* В СЕЛЕКЦИИ:

Преодоление прогамной несовместимости

Преодоление постгамной несовместимости

Клональное микроразмножение отдаленных гибридов

Получение гаплоидов *in vitro*

Криосохранение

Оздоровление растительного материала

Оплодотворение in vitro – преодоление прогамной несовместимости

Причины:

1. Физиологические (несоответствие во времени созревания)
2. Морфологические (короткая пыльцевая трубка, блокирование ее роста на разных этапах развития)

Способы:

1. Культивирование на искусственной среде завязи с нанесенной на нее готовой пыльцой
2. Культивирование на питательной среде кусочков плаценты с семязпочками, вблизи которых или непосредственно на которых культивируется готовая пыльца

Модификации метода опыления и оплодотворения in vitro

- **прививка столбика** с рыльцем совместимого гинцея в завязь несовместимого гинцея
- **нанесение пыльцы** на свежесрезанную поверхность столбика
- **удаление с рыльца** его собственного экссудата и нанесение на него экссудата с рыльца донорного растения
- **применение химических веществ**, например, колхицина

Петунья, маковые, пасленовые

Опыление ячменя пылью ржи и пшеницы

Межвидовые гибриды табака, табака и махорки

Кукуруза

Томаты

Преодоление постгамной несовместимости

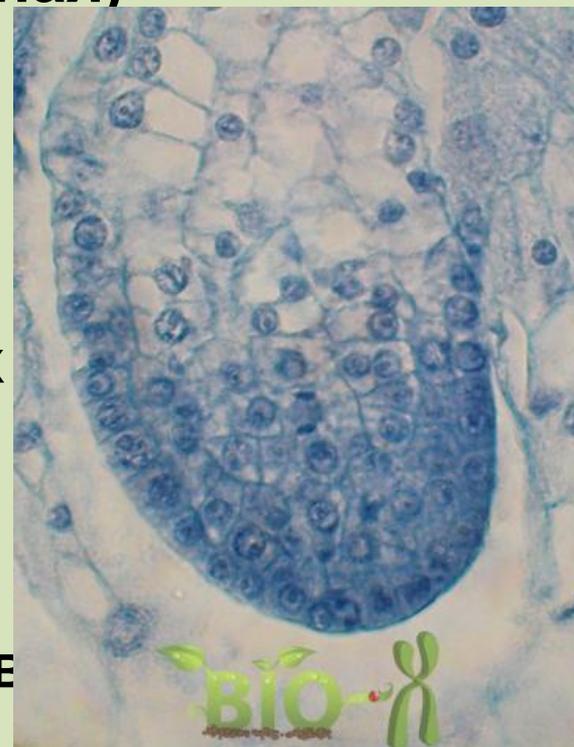
Отделенная гибридизация

Эмбриокультура (одно- или двухфазная)

Пшенично-ржаные гибриды
(доращивание незрелых зародышей)

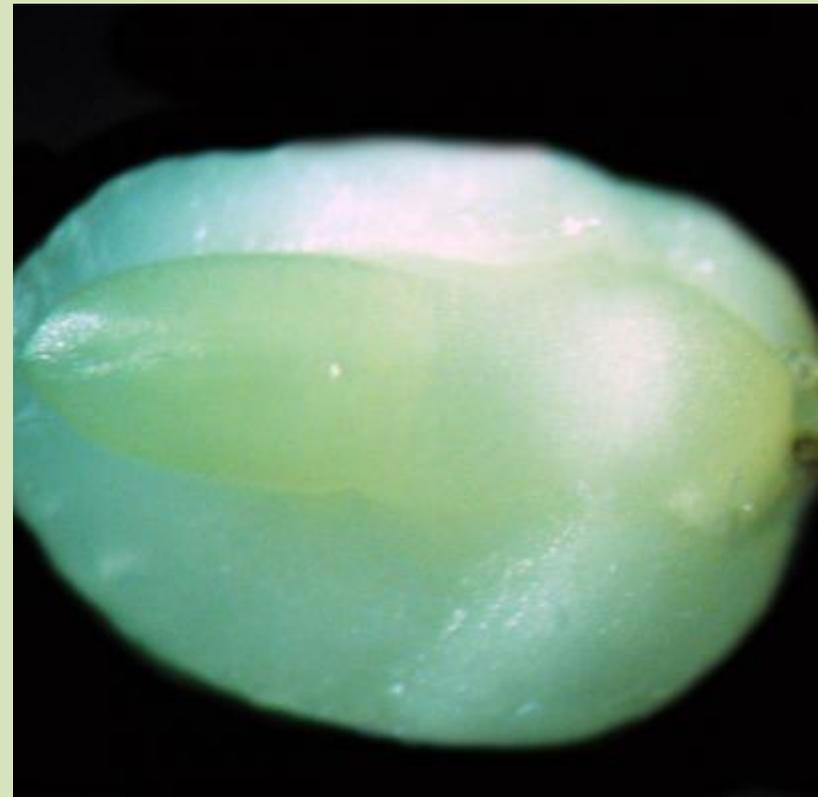
Межвидовая гибридизация овощных
(томаты и др.)

Микроразмножение ценных гибридов
(каллус, морфогенез, регенерация)



Исследования по культуре незрелых зародышей:

- оптимальный состав питательной среды
- жидкие и твердые питательные среды
- состав и концентрация макро- и микроэлементов
- условия углеродного питания
- действие БАВ, фитогормонов, витаминов, аминокислот, растительных экстрактов на дифференциацию



Показана возможность увеличения выхода пшенично-ржаных гибридов путем **доращивания незрелых зародышей, эмбриокультуры;**

Получены **триплоидные растения** ржи от скрещивания автотетраплоидов и диплоидов;

С использованием метода культуры **зиготических зародышей** получены селекционно-ценные формы черешни, персика и груши

Разрабатывается эмбриокультура для получения **отдаленных гибридов подсолнечника**, изучаются **факторы контроля роста и развития зародышей**, изолированных в разные сроки после опыления

Клональное микроразмножение отдаленных гибридов

**Активация развития меристемы пазушных
почек (черенкование стерильных побегов)**

Адвентивными почками

**Регенерация растений из каллусной ткани (в т.ч.
полученной при культивировании зародышей)**

Получение гаплоидов *in vitro*

Быстрый поиск комбинаций - Сокращение срока селекции

Сокращение объемов питомников

Расширение генетического разнообразия

Обнаружение рецессивных мутаций

Создание гомозиготных линий перекрестников

Получение линий-восстановителей ЦМС

Селекция на гетерозис

Мутагенез

Получение гаплоидов *in vitro*

- Стимуляция деления неоплодотворенной яйцеклетки опылением убитой пыльцой
- Задержка опыления

Способы получения:

- **Андрогенез** – из изолированных пыльников и микроспор (с 1964 г. *Datura innoxia*, 1969 *N. tabacum*, *N. sylvestris*, сейчас 240 видов, 85 родов, 38 семейств)
- **Гиногенез** – из изолированных семяпочек (ячмень, кукуруза, рис, табак и др.; вероятность регенерации 100 %; дольше сохраняется способность к новообразованиям: для риса и табака 1-2-4-ядерные зародышевые мешки, ячмень – зрелые зародышевые мешки; единственный метод для *Beta vulgaris*, *Allium cepa*, *Gerbera jamesonii*)

кинетин 1 мг/л – каллус,

дропп 1 мг/л и ИУК 0.5 мг/л – эмбриониды

Партеногенез – из гибридного зародыша,
потерявшего отцовские хромосомы, метод
гаплопродюссера

N. bulbosum для *N. vulgare*

Penisetum glaucum, *Zea mays* для *Triticum aestivum*

Универсальный гаплопродюссер для некоторых
зерновых – кукуруза

Сдерживающие факторы использования гаплоидных технологий:

1. **Эмпирический подход** к поиску генотипов, отзывчивых на условия культивирования пыльников
2. **Неоднозначность и трудная воспроизводимость** результатов из-за стремления к высокому выходу при недостаточной изученности механизмов морфогенеза *in vitro*
3. Эффективность андрогенеза зависит от определенного баланса эндогенных и экзогенных фитогормонов – **интегральный характер морфогенетических процессов** и их зависимость от многих внешних и внутренних факторов

Методы создания гаплоидных растений

- отдаленная гибридизация
- внутривидовая гибридизация
- температурные воздействия
- метод ионизирующей радиации
- метод близнецов
- химический метод
- культура мужского и женского гаметофитов

Отдаленная гибридизация

N. tabacum x *N. sylvestris*

Гаплоиды *Brassica nigra*, *Solanum tuberosum*

Внутривидовая гибридизация

Поиск генотипов с высокой частотой образования гаплоидов (например, кукуруза)

Температурные воздействия

Индукция гаплоидии у кукурузы путем обработки материнских растений через сутки после опыления температурой +43 °С

Метод ионизирующей радиации

Индукция гаплоидии у кукурузы облучением семян, растений и пыльцы рентгеновским излучением, мужские гаметы инактивировались: теряли способность к слиянию с яйцеклеткой, но стимулировали ее к делению с образованием гаплоидного зародыша

Метод близнецов

Близнецы – пары или группы самостоятельных растений, полученных из одного семени.

Закладка в одной семяпочке 2 или нескольких зародышевых мешков, один оплодотворяется нормально, а другой развивается без оплодотворения (*Oryza sativa*)

Формирование зародыша из синергид или антипод зародышевого мешка

Разделение на ранних этапах эмбриогенеза одного зародыша на несколько (картофель)

Химический метод

Обработка рылец кукурузы до опыления гидразидом малеиновой кислоты (50 мг/л) 1:4000 → 1:143

Химическая индукция добавочных зародышей у кукурузы

Повышение частоты возникновения гаплоидов при обработке рылец **ИУК** (до 1: 1550) и **НУК** (до 1:913) – за сутки для опыления, **новокаином** (до 1:242) – через сутки после опыления

ФАВ стимулируют яйцеклетку к делению без оплодотворения, а последующее опыление обеспечивает возможность формирования эндосперма и апомиктического развития зародыша **Новокаин** нарушает процесс двойного оплодотворения, оплодотворяется только центральное ядро

Обработка зерновок пыльцевого родителя **нитрозоэтилмочевинной** и **этиленимином**

Спонтанный эмбриогенез в культуре
изолированных репродуктивных органов имеет
низкий выход гаплоидов 1-4 %, результаты **плохо**
воспроизводимы

Эмбриогенез **зависит** от генетических,
физиологических причин, стадии развития бутона и
микроспор, от факторов внешней среды (состав
питательной среды, условия культивирования,
процентное содержание
микроспор на оптимальной стадии
развития в момент инокуляции пыльника)



Наблюдается **повышение эффективности**
пыльцевого эмбриогенеза при доле
микроспор перед сильной вакуолизацией

**Важно выявлять корреляцию между
морфологическими показателями генеративных
органов растения и стадией микроспоро- и
гаметогенеза**

Длина пыльника – лилия, табак, картофель, рапс,
вигна, капуста белокочанная

Размер бутона – соя, картофель, томат, рапс,
сурепица (сортоспецифично)

Равная длина лепестков и чашелистиков – перец
сладкий

Соотношение длины лепестка и длины пестика –
капуста

**Появление ФЛ на 1-3 см над предпоследним
листом, длина колоса** – ячмень

**Отношение расстояния от основания
предпоследнего листа до основания ФЛ к
расстоянию от основания ФЛ до кончика**

Частота образования гаплоидов зависит от генотипа исходного растения, видовой и сортовой принадлежности (у Пасленовых легче получить гаплоиды из пыльцы, чем у других семейств)

При повторном культивировании пыльников дигаплоидных форм растёт **частота андроклинии** по сравнению с исходными, хотя есть и противоположные данные

Влияние на **индукцию спорофитного развития** оказывает предобработка цветков и соцветий пониженными или повышенными температурами перед изолированием репродуктивных органов

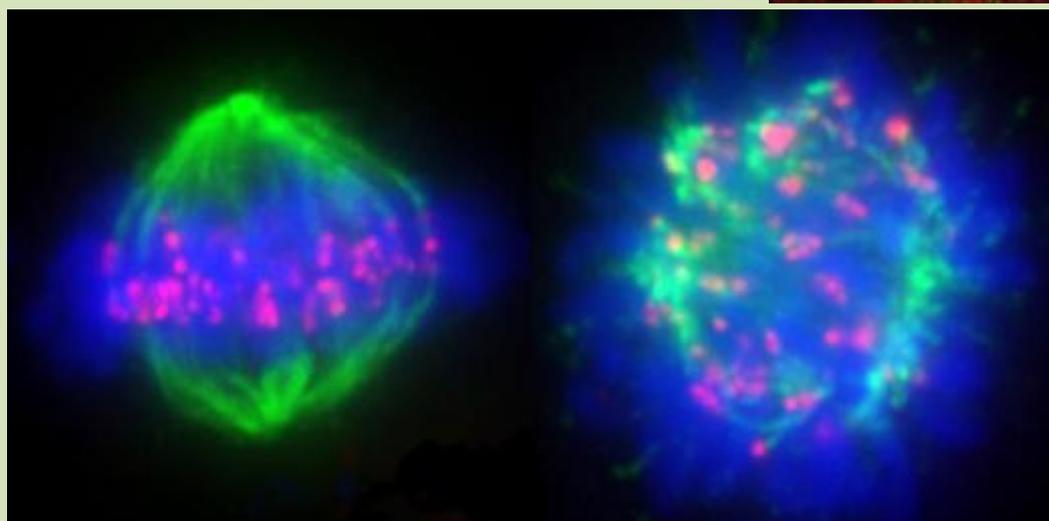
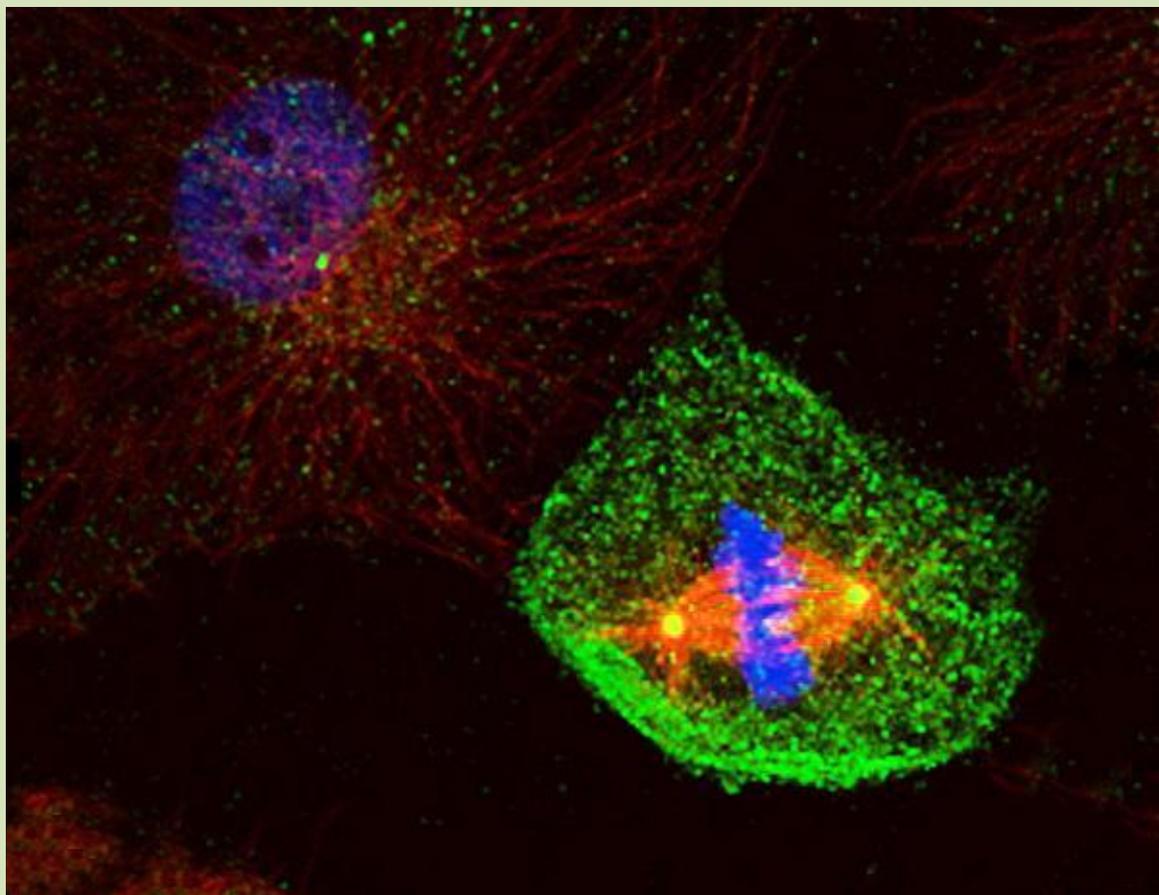
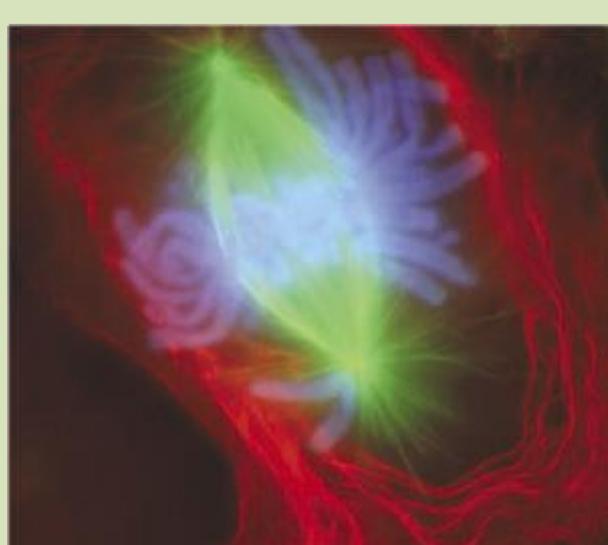
N. tabacum +3-5 °С во время первого митоза –
возникновение **двух одинаковых дочерних ядер**

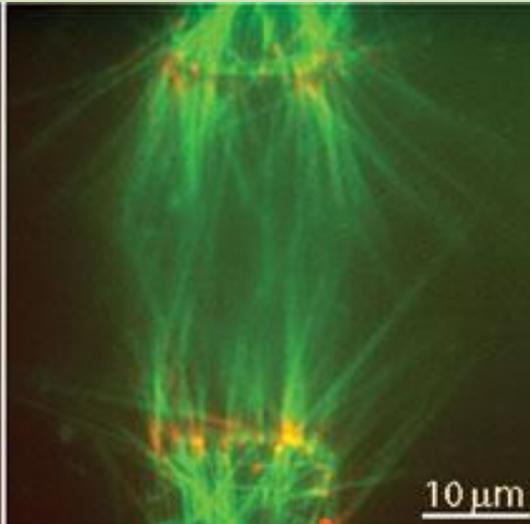
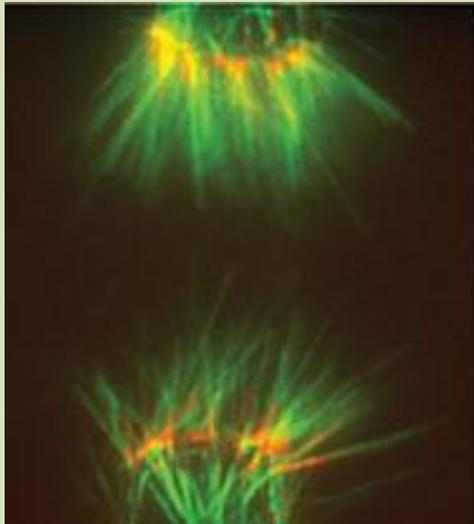
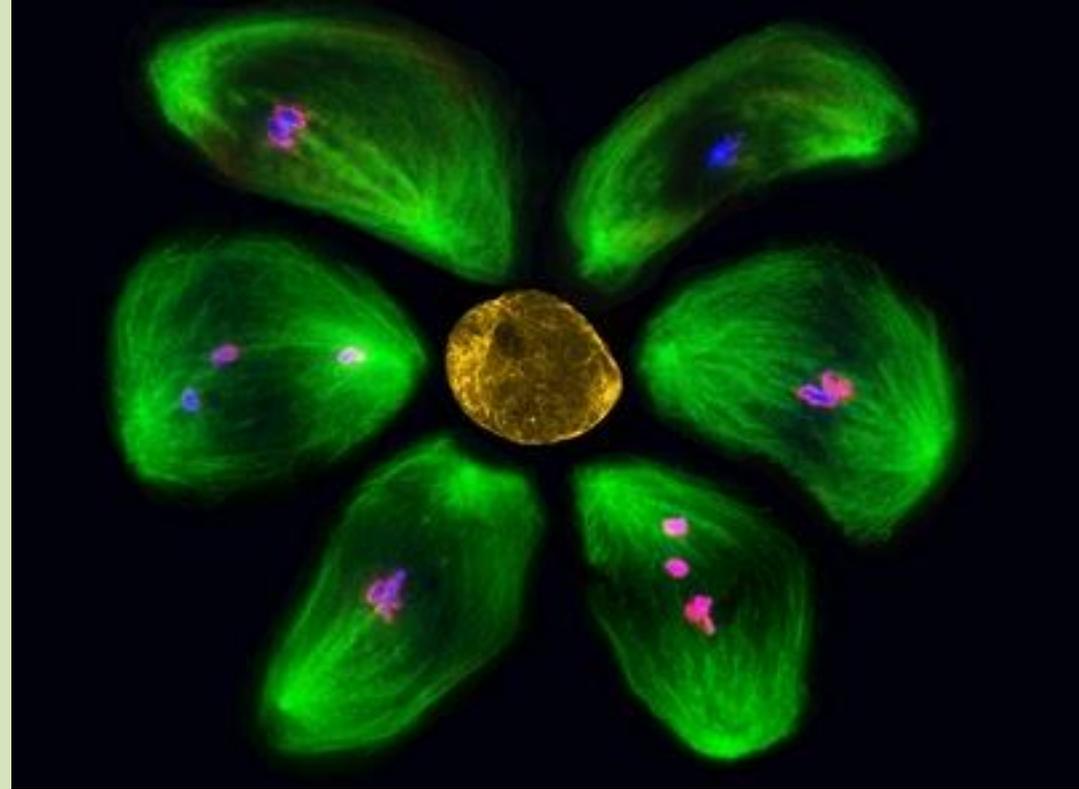
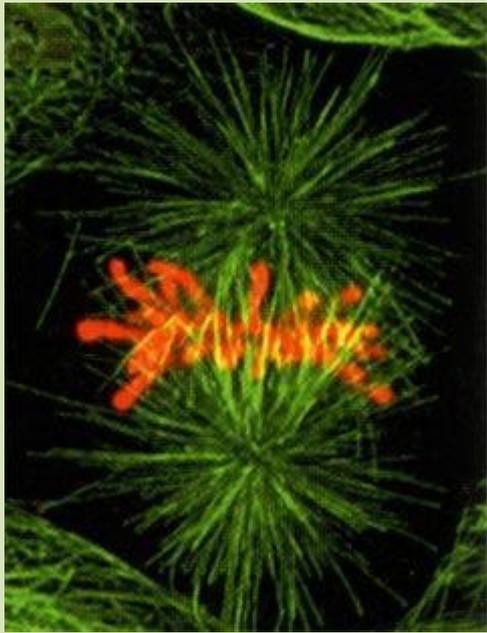
Температурный шок влияет на **ориентацию веретена деления**, что приводит к образованию эмбриоидов

Холодовая предобработка растений способствует **синхронизации деления микроспор** и **поддержания жизнеспособности эмбриогенных структур**.

Рис 8-10 °С 10-14 сут. положительно сказывается на регенерации

Тритикале 5 °С 10-15 сут. – оптимум для начала морфогенеза в культуре пыльников, стимулирующее влияние **монохроматического синего цвета** на дифференцировку меристематических зон в каллусных тканях с последующим ростом и





Nicotiana: предварительное инкубирование цветочных почек при 7 °С 7 сут.

Картофель: 4 °С в течение 48-72 ч.

Ячмень: выдержка колосьев при 2 °С 16-24 сут. или 5-7 °С 6-10 сут.

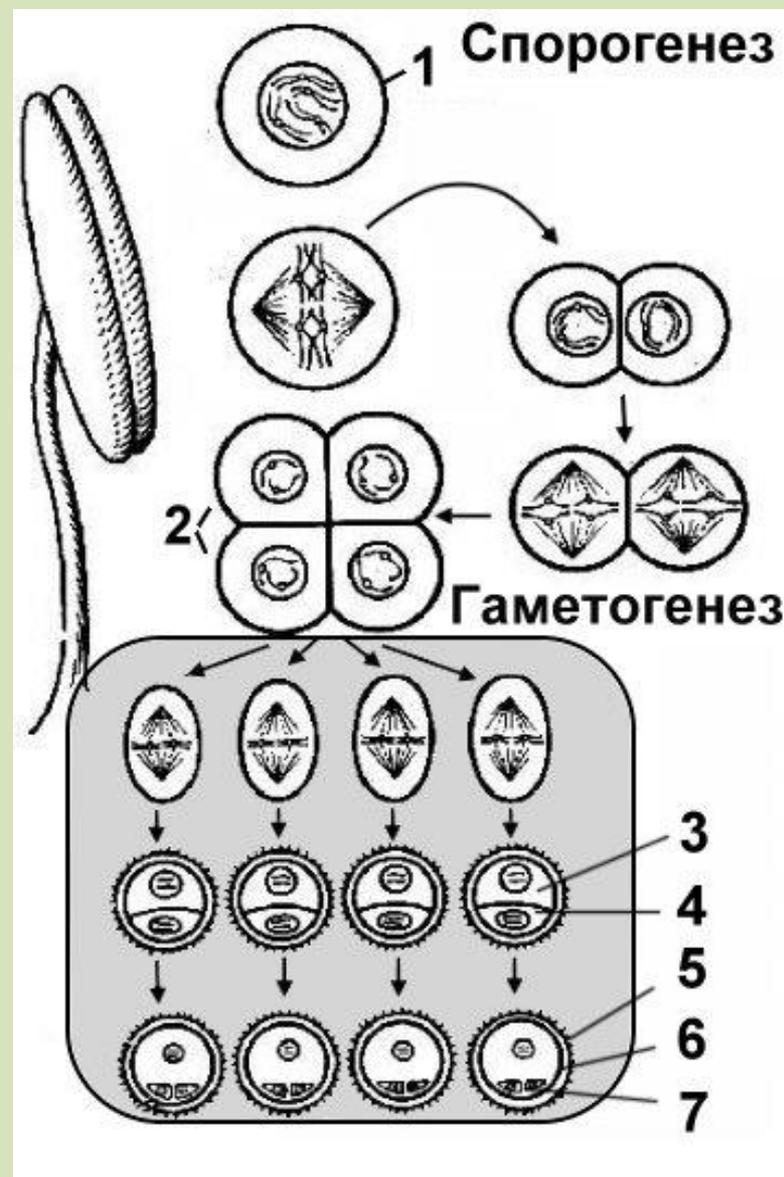
Пшеница: предобработка колосьев перед изолированием пыльников 3 °С 18-22 сут.

Холодовой шок изменяет **полярность первого пыльцевого митоза** и способствует равному делению микроспор

Обработка холодом усиливает **синтез микроспор**, встраивание жирных кислот, что приводит к разжижению и текучести **мембран**, вводит в состояние **морфогенной компетенции**, побуждает их к **делению**

Микроспоры продуцируют и выделяют в культуральную среду **кондиционирующие факторы**, индуцирующие спорофитный морфогенез в культуре микроспор

После изолирования и культивирования обработка **низкими положительными температурами** – высокий выход эмбриогенных структур, длительное поддержание жизнеспособности стенок пыльников и нормальных взаимосвязей с микроспорами



Воздействие повышенных температур на изолированные экспланты

Микроспоры рапса +32,5 °С 4 сут. - переход на эмбриогенный путь развития

Просо, горох – 32-33 °С 5 сут.

Брюссельская и цветная капуста 35 °С 16 ч.

При высоких температурах ингибируется синтез контрольного белка и повышается экспрессия БТШ, аллельные вариации

Сочетание высоких и низких температур:

рапс 35 °С 5 ч + 10 °С 7 сут.

Повышенные температуры вызывают распад микротрубочек, нарушение веретена деления, ненормальное деление ядер микроспор, образование эмбриоидов и/или каллусов

Холодовая обработка – изменения в ультраструктуре хлоропластов, формирование одинаковых ядер, повышает жизнеспособность эмбриогенных микроспор, задерживает процесс их дегенерации.

Частота андрогенеза для различных генотипов от 1 до 8 %, что может быть связано с выделением этилена, быстрое старение клеток, снижение морфогенетической способности

Синтез этилена блокирует **нитрат серебра** (рис, капуста, пшеница и др.)

Обработка колосьев яровой пшеницы **кинетином, 2,4-Д, ИУК** увеличивает частоту выхода эмбриоидов, процесс зависит от концентрации и продолжительности воздействия.

Предобработка срезанных растений **аконитовой кислотой** – 100 %-ный морфогенный потенциал

При индукции пыльцевого эмбриогенеза запуск спорофитного пути зависит от содержания **эндогенной и экзогенной ИУК**

Высокий уровень **эндогенных ИУК и АБК** регулирует морфогенетические процессы при отсутствии экзогенных гормонов, при низком ИУК не происходит переключение

Влияние компонентов питательной среды:

- поддерживающие жизнедеятельность: макро- и микроэлементы, витамины, углеродное и азотное питание, агар

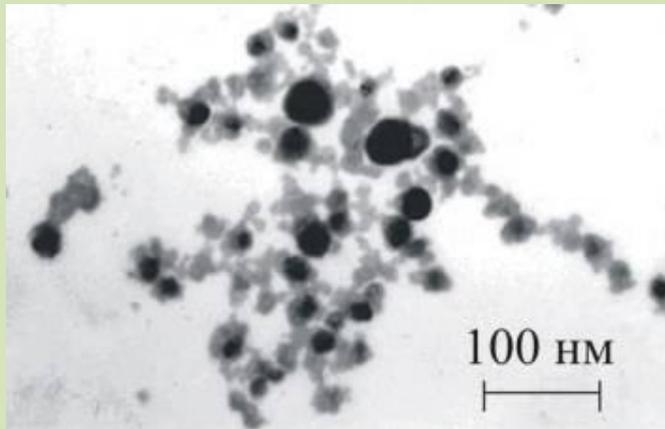
- индуцирующие смены программы морфогенеза – фитогормоны и регуляторы роста и развития

Для культивирования изолированных пыльников используются среды Уайта, Мурасиге и Скуга, Миллера, Линсмайера и Скуга, Блейдса, Нич, Гамборга и др.

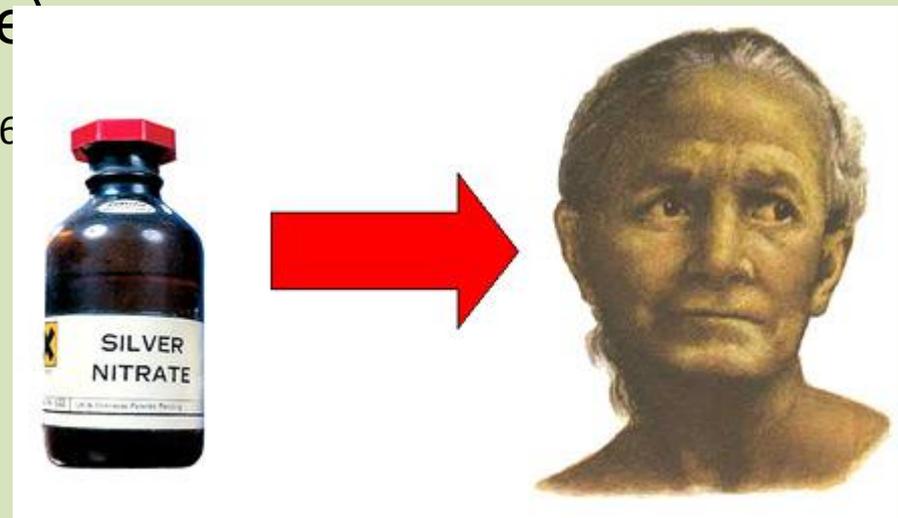
Среды для различных таксономических групп
различны

Видоспецифичность: соотношение
азотсодержащих солей, аминокислот и гормонов

Соотношение нитратного (повышение) и
аммонийного (понижение)



з (N₆)



Тиосульфат серебра подавляет развитие каллусов,
нитрат серебра способствует регенерации растений.

Жидкие питательные среды имеют преимущества для культивирования пыльников

Агар целесообразно заменять **агарозой**

Для уплотнения среды можно использовать **крахмал**

Для инициации соматического эмбриогенеза в пыльниках ячменя используют **жидкую среду ВАС 1** (barley anther culture medium)

Частота регенерации после жидких питательных сред может быть пониженной, что связано с формированием **вакуолизированных, оводненных клеток**

Можно использовать плавающие на жидкой среде **мембраны** (ячмень)

Благоприятно добавление **активированного угля**, адсорбирующего гормоны, витамины, железо и фенольные соединения, продуцируемые стареющими тканями

Гормононезависимые растения – гормоны поступают из стенки пыльника или из самой пыльцы –
Пасленовые

Гормонозависимые растения – требуют добавления экзогенных гормонов (2,4-Д, ИУК, НУК, кинетин, БАП)

2,4-Д выше 0,1 мг/л ингибирует прямой эмбриогенез, активирует **каллусогенез**, ниже 0,1 мг/л способствует **прямому органогенезу** и регенерации растений

Замена **2,4-Д** на **ИУК** или **НУК** повышает регенерационный потенциал, процент нормальной морфологии

ИУК может ускорять созревание пыльцы или усиливать ее стерилизацию

Ячмень:

2,4-Д 1,5 мг/л + кинетин 0,5 мг/л,
ИУК 1,0 мг/л + 6-БАП – 1,0 мг/л

Культивирование пыльников **риса**, находящихся на стадии первого деления микроспор, на среде с $\frac{1}{2}$ МС + 2 мг/л НУК + 1 мг/л БАП – образование каллуса и последующая регенерация; формирование эмбриоидов и гаплоидов – на безгормональной среде

Необходимо добиваться **прямой регенерации** – дропп (тидиазурон) – цитокининовая активность, АБК-стимулирующая активность, препятствие образованию корней, ингибирование каллусообразования

Капуста белокочанная

дропп 0,2 мг/л + НУК 0,05 мг/л – эмбриоиды 8,2 %

Источник углеродного питания

сахароза, глюкоза, мальтоза

Сахароза: пшеница 9 %, рис 6 %, кукуруза и ячмень 12 %, томаты 10-15 %.

Замена сахарозы на **мальтозу** или **глюкозу** положительно влияет на индукцию каллусов и эмбриоидов, на последующую регенерацию

Из пыльников **полевых растений** доля зеленых регенерантов выше, чем из **тепличных**

Фотопериод и **интенсивность освещения** влияют на получение гаплоидных растений

Для понимания закономерностей андрогенеза *in vitro* важно изучение путей развития микроспор, формирования андрогенных структур и регенерации растений.

3 пути развития микроспор в культуре *in vitro* (Сандерленд):

А. неравное первое деление ядра микроспоры, образуется генеративное (не развивается, дегенерирует) и вегетативное ядро.

В. после первого раннего деления образуется два одинаковых ядра

С. неравное первое деление ядра микроспоры, образуется генеративное и вегетативное ядро, независимое деление ядер обоих типов, продолжающих развитие и участвующих в образовании каллуса или эмбриоидов

А и В ведут к образованию **гаплоидных** каллусов и эмбриоидов, С – формированию **диплоидных** и **полиплоидных** каллусов и эмбриоидов

Ячмень: из 25 зеленых андрогенных растений –
3 гаплоидных,
1 частично гаплоидное,
17 диплоидных,
4 преимущественно тетраплоидных

Длительное культивирование андрогенного каллуса используется для получения **спонтанно возникающих диплоидизированных гаплоидов** и растений других уровней ploidy, **прямой эмбриогенез** обеспечивает большую цитогенетическую стабильность андрогенного потомства.

При культивировании пыльников необходимо учитывать особенности **всех тканей**. В образовании эмбриоидов могут принимать участие и **соматические клетки** пыльников.

Наиболее оптимальная стадия развития микроспор – сильно **вакуолизованная стадия**

Пыльники рапса – 25 сут. на среде B_5 – образование из микроспор сильно вакуолизованных и активно делящихся клеток. Затем многократные симметричные митотические деления – формирование 2-клеточных, а потом многоклеточных структур.

Формирование эмбриоидов происходит при попадании структур **на поверхность** питательной среды, а **внутри** идет формирование вытянутых клеток, с чем связан низкий выход эмбриоидов

Доказательства гаплоидной природы:

- Подсчет числа хлоропластов в замыкающих клетках устьиц
- подсчет числа хромосом в меристеме корня

Удвоение числа хромосом:

Колхицин 0,5%-ная концентрация в сочетании с 4 %-ным раствором ДМСО. Перспективно нанесение раствора на пазушные и верхушечные почки в течение 7-10 сут.

Разработка новых элементов гаплоидных технологий остается актуальной проблемой клеточной биотехнологии.

Отбор из первого гибридного поколения дигаплоидов невозможен, растения **депрессированы** колхицинированием.

У дигаплоидов может проявляться «**инбредная**» **депрессия**

DeKalb Agricultural Association Inc.

DeKlab 640 – четырехлинейный гибрид кукурузы, 3 из 4 родительских линий были созданы методом матроклинной гаплоидии, лидер по устойчивости к высокой густоте стояния

Краснодарский НИИСХ

Удвоенная гаплоидная линия Кр716 кукурузы вошла в состав родительских линий 4 допущенных гибридов

Wu (1986)

Использование при отдаленной гибридизации форм с **разным уровнем ploидности** (например, культурный картофель × дикий картофель)

Использование в **мутационной селекции**

Аналитическая селекция (Хохлов и др., 1976)

1. Получение гаплоидов
2. Селекция на гаплоидном уровне (отбор, гибридизация, мутагенез)
3. Ресинтез диплоидов или полиплоидов, отбор, гибридизация для получения гетерозиса

Chase (1963)

аналитическая селекция картофеля, отбор ценных генотипов на уровне дигаплоидов

Foroughi-Wehr and Wenzel (1990)

рекуррентная селекция ячменя с отбором ценных генотипов на уровне удвоенных гаплоидов

Скрещивание – получение гаплоидов из F_1 – удвоение – полевая оценка – размножение – испытание устойчивость к вирусу желтой мозаики

Чередующиеся гаплоидные этапы и беккросы устойчивость к болезням листа, вирусу желтой мозаики, увеличение массы 1000 зерен

Chalyk and Rotarencu (1999)

рекуррентный отбор у кукурузы:

1. Получение гаплоидов из синтетических популяций
2. Выращивание гаплоидов, опыление их пыльцой с диплоидных растений той же синтетической популяции, отбор

Получение гаплоидов in vitro

Культура пыльников (пшеница, ячмень, кукуруза, озимая рожь, картофель):

- эмбриогенез в пыльцевых зернах,
- образование каллуса из клеток пыльника с последующим морфогенезом



Ячмень Исток, Одесский 115 – получены за 6 лет вместо 10-12

Ячмень Биос 1, Эльф, Дворан

Япония – **табак**, устойчивый к вилту и с высоким качеством сырья

Высокопродуктивные сорта **риса, пшеницы, табака**, устойчивые к мучнистой росе и желтой ржавчине

Пшеница Florin превысила стандарт по урожайности, устойчива к полеганию и болезням

Дигаплоидные линии **пшеницы** во Франции, США, Индии, Италии, Японии, Англии, Венгрии и Канаде



Россия - линии **табака**, устойчивые к черной корневой гнили, мучнистой росе, полиспорозу

НИИСХ Юго-Востока – высокоурожайный сорт **пшеницы** Саратовская 64

Хозяйственно-ценные формы **тритикале** с использованием дигаплоидных линий в культуре репродуктивных органов

Криосохранение растений

Жидкий азот, -196 °С



Сохранение генофонда и обеспечение селекционера генотипами:

- Пыльца для проведение гибридизации
- Уникальные и единичные семена
- Трансформированные, мутантные, гибридные клетки
- Зиготические и соматические зародыши

ИФР имени К.А. Тимирязева РАН
Институт проблем криобиологии и криомедицины (г. Харьков)



Криосохранение растений

Обработка клеток перед замораживанием (маннит, сорбит, пролин, γ -аминомасляная кислота)

Применение криопротекторов (ДМСО, глицерин, ПВП, декстран, ПЭГ 6000)

Определенный режим замораживания ($0,5-1^\circ$ С/мин.) и оттаивания (быстрое, на водяной бане $40-60^\circ$ С)

Проверка жизнеспособности (окрашивание витальным красителем – $0,1\%$ -ный феносафранин, $0,25\%$ -й раствор сини Эванса)

Оздоровление посадочного материала от вирусов

Чунг (1938), Уайт (1943)

Меристематические ткани
(~ 200 мкм) свободны от вирусов
Полной гарантии нет

Термотерапия

от 25 до 37 градусов, по 2 градуса в сутки
70 % хмель, 90 % земляника, 25 % смородина, 50 %
малина, более 80 % картофель

Хемиотерапия

1 β -Д-рибофуранозил-1,2,4-триазол-3-карбоксимид
(вирозол) 20-50 мг/л, доля безвирусных меристем 80-100
%

