

Клеточная селекция

Гетерогенность и генетическая изменчивость клеток в культуре *in vitro* как основа клеточной селекции.

Соматоклональная изменчивость.

- В работах Gautheret (1955), Nobecourt (1955) была отмечена цитологическая нестабильность клеток при их длительном культивировании *in vitro*. Позднее появились публикации, в которых были описаны растения-регенеранты с различными нарушениями хромосомного состава [Murashige, Nakano, 1966; Бутенко и др., 1967], а также обладающие новыми хозяйственно ценными признаками, способными сохраняться в течение длительного времени [Heinz and Mee, 1971].
- Явление изменчивости клеточных линий и растений-регенерантов получило название соматоклональная вариабельность (изменчивость) [Larkin and Scowcroft, 1981].

Соматоклональная изменчивость

Два основных источника возникновения соматоклональных вариантов:

- **генетическая гетерогенность клеток эксплантата;**
- **генетическая изменчивость, возникшая в процессе культивирования клеток in vitro**

Соматоклональная изменчивость

- У многих видов растений клетки коры и сердцевины стебля являются полиплоидными (полисоматия).
- Другой тип хромосомной вариабельности, характерной для соматических клеток растений, например, межвидовых гибридов, искусственно полученных автополиплоидов, – анеусоматия, то есть, присутствие анеуплоидных клеток
- Длительно размножаемые вегетативным способом растения могут накапливать точковые мутации соматических клеток, в результате чего они становятся химерными

Соматоклональная изменчивость

- Условия существования клеток в составе интактного растения и при культивировании на агаризованной питательной среде или в виде клеточной суспензии существенно различаются.
- Питание клеток и их гормональный статус в культуре *in vitro* существенно отличаются от такового у клеток интактного растения.
- Длительное пассирование культур способствует повышению генетического разнообразия клеток и растений-регенерантов.

Соматоклональная изменчивость

Возможные генетические механизмы возникновения соматоклональных вариантов (Karp and Bright, 1985):

- - грубые кариологические изменения (полиплоидия и анеуплоидия, крупные перестройки хромосом);
- - криптические, незаметные при цитологическом анализе, хромосомные перестройки (мелкие делеции, дупликации, транслокации, инверсии);
- - точковые мутации;
- - перемещения мобильных генетических элементов;
- - амплификация и редукция генов;
- - митотический кроссинговер.

Сомаклональная изменчивость

Сомаклональная вариация у томатов (Сидоров, 1990):

- у соматклонов различных сортов обнаружено несколько одиночных генных мутаций, наследуемых в соответствии с законами Менделя;
- идентифицированы доминантные, семидоминантные и рецессивные ядерные мутации;
- показано, что растения-регенеранты с одиночными генными мутациями могут возникать с высокой частотой: один мутант на 20-25 растений-регенерантов;
- среди соматклонов выявлены новые мутации, которые не встречались среди спонтанных мутантов, или полученных с помощью традиционных мутагенов;
- получены экспериментальные данные, доказывающие, что одной из причин соматклональной изменчивости может быть митотический кроссинговер;
- у соматклонов обнаружены мутации хлоропластной ДНК.

Сомаклональная изменчивость

Отбор среди растений-регенерантов мутантов с новыми признаками, имеющими важное хозяйственное значение:

- Heinz и Mee (1971) на Гавайях и их коллеги на Фиджи (Krishnamurthi, Taskal, 1974) выделили среди растений-регенерантов сахарного тростника соматклоны с повышенной продуктивностью, устойчивые к вирусам, гельминтоспориозу, ложной мучнистой росе
- Шепард с сотр. (Shepard et al. 1980; Secor, Shepard, 1981) выделили ряд ценных соматклональных вариантов среди растений-регенерантов, полученных в культуре протопластов картофеля сорта Russet Burbank: с повышенной продуктивностью, устойчивых к альтернариозу, фитофторозу. Имеется ряд сообщений по выделению соматклонов картофеля с измененной формой клубней и их окраской, с устойчивостью к парше, к вирусам PVY и PLRV, тлям-переносчикам вирусов.
- Эванс с сотр. (Evans and Sharp 1983; Evans et al., 1984; Evans and Bravo, 1986) выделили соматклональные варианты, отличающиеся от исходных сортов томатов по таким признакам, как цвет плодов, архитектура растений, пригодность к механической уборке, устойчивость к болезням.
- Cassells et al. (1983) показали возможность выделения перспективных соматклонов среди растений, регенерированных непосредственно из стеблевых эксплантатов

Использование мутагенов для целей клеточной селекции

Использование мутагенов позволяет существенно расширить спектр соматоклональной изменчивости и благодаря этому повысить эффективность клеточной селекции.

В качестве исходного материала для экспериментального мутагенеза используют:

- **каллюсные и суспензионные культуры и культуры протопластов (обработка мутагенами и отбор на селективных средах)**

Также нашли применение обработки мутагенами:

- **Семян с последующим получением из зародышей или проростков культуры клеток *in vitro***
- **пробирочных растений или эксплантатов, которые дают морфогенный каллус, или культуры, способные к эмбриогенезу.**

Использование мутагенов для целей клеточной селекции

Для целей клеточной селекции широкое распространение получили химические мутагены:

- **этил-метансульфонат (ЭМС),**
 - **N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (НГ),**
 - **N-этил-N-нитрозомочевина (НЭМ),**
 - **N-нитрозометилмочевина (НММ)**
- **Наряду с химическими мутагенами для целей клеточной селекции широко применяют физические мутагенные факторы – ионизирующее (рентгеновские и гамма-лучи) и ультрафиолетовое облучение**

Селекция мутантов in vitro

- Наиболее распространенный метод отбора мутантных клеточных вариантов – *прямая (позитивная) селекция*. Ее используют для выделения мутантов, устойчивых к различным антиметаболитам: гербицидам, антибиотикам, токсинам. Применяют две основные стратегии прямой селекции: одношаговую (single-step) и многошаговую, или ступенчатую.
- Для отбора условно летальных мутантов (ауксотрофных, чувствительных к стрессовым воздействиям) применяют *непрямую (негативную) селекцию*. Этот метод селекции основан на избирательной гибели под действием селективного фактора делящихся клеток дикого типа и выживании метаболически неактивных мутантных клеток.
- В некоторых случаях отбор клеточных вариантов можно проводить визуально по внешним признакам. Еще один метод – *тотальная селекция*, которая основана на индивидуальном тестировании отдельных клеточных клонов.

Экспрессия мутаций у растений-регенерантов

- Чтобы гарантировать получение растений с интересующей исследователя мутацией, культуры после проведения клеточной селекции переносят на регенерационные среды, содержащие селективный агент. Селективный агент может присутствовать и в питательных средах, применяемых для укоренения растений-регенерантов, их клонального размножения *in vitro*.
- Пробирочные растения предположительно мутантных клонов могут быть подвергнуты биохимическим, молекулярно-генетическим или другим анализам, необходимым для изучения природы мутационных изменений.
- Для подтверждения генетической детерминированности выявленной изменчивости у растений-регенерантов, изучения наследования выделенных мутаций проводят классический генетический анализ, основанный на определении характера расщепления в их половых поколениях (F1, F2) от скрещивания с исходными растениями.

Основные направления практического использования клеточной селекции

Толерантность к гербицидам:

- **мутация мишени (прежде всего, фермента на который действует гербицид);**
- **дезактивация/деструкция гербицида;**
- **сверхпродукция фермента-мишени за счет амплификации гена, его кодирующего, или изменения регуляции его активности.**

Толерантность к ALS-гербицидам (сульфонимочевине, имидозолинону, триазолопиримидину и пиримидил-окси-бензоату)

- Мишень - ацетолактатсинтаза (ALS), важный фермент в биосинтезе незаменимых разветвленных аминокислот валина, лейцина и изолейцина.
Мутантные ALS-гены:
 - ген арабидопсиса *csr 1-1* (замена серина на пролин в позиции 197)
 - ген арабидопсиса *csr 1-2* (замена серина на аспарагин в позиции 653)
 - ген табака *SuRB-Hra* (две замены аминокислот: пролина на аланин в позиции 196 и триптофана на лейцин в позиции 573)

Получение растений, устойчивых к стрессам

- Засоление: угнетение сельскохозяйственных культур начинается при содержании в профиле солей более 0,25% массы почвы. Вредное действие засоления обусловлено нарушением осмотического баланса клетки, сопровождающегося снижением тургора, а также прямым токсическим влиянием ионов на физиологические и биохимические процессы в клетке.
- Несмотря на сложный характер генетического контроля признака, на большом количестве культур выделены клеточные клоны, способные сохранять рост при высоких концентрациях соли в питательной среде (0,17-0,34 М NaCl; для сравнения: содержание NaCl в морской воде составляет 500 мМ)
- Изучение природы солеустойчивости у таких мутантов внесло значительный вклад в понимание механизмов защиты растений от подобных стрессовых воздействий.

Получение растений, устойчивых к стрессам

- Отбор засухоустойчивых клеточных клонов проводят на селективных средах, содержащий осмотически активные вещества, понижающие внешний водный потенциал, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ 6000, концентрация около 15-20 %), маннитол (100-900 мМ).
- Для отбора клеточных клонов, толерантных к ионным стрессам, в селективные среды добавляют в повышенных концентрациях соли токсичных металлов: алюминия, цинка, кадмия, ртути, меди.
- Для изучения механизмов устойчивости к радиационному стрессу получают с помощью клеточной селекции мутанты, устойчивые к ультрафиолетовому излучению и ионизирующей радиации.
- Клеточная селекция показала достаточно высокую эффективность и для выделения мутантов, устойчивых к повышенным и пониженным температурам.

Получение растений, устойчивых к болезням

- Лучшие результаты были получены в случае использования в качестве селективных агентов специфических токсинов фитопатогенов.
- Растения-регенеранты, полученные в культуре протопластов табака, обработанных мутагеном этилметансульфонатом и прошедших селекцию *in vitro* на устойчивость метилсульфоксимины (MSO), обладали повышенной устойчивостью к *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* [Carlson (1973)].
- Gengenbach et al. (1977) осуществили отбор мутантов кукурузы, устойчивых к токсину *Helminthosporium* (синоним *Drechslera*) *mayidis* расы Т с помощью ступенчатой селекции каллюса на питательных средах, содержащих токсин *H. mayidis*.
- Положительные результаты были получены в результате клеточной селекции на устойчивость к токсинам и других видов *Helminthosporium*, а также к другим хозяиноспецифичным токсинам

Получение растений с повышенным синтезом незаменимых аминокислот

- Регуляция биосинтеза аминокислот у растений осуществляется путем обратного ингибирования, при котором некоторые ключевые ферменты биосинтеза ингибируются конечным продуктом. Для того, чтобы значительно повысить содержание какой-либо аминокислоты в белке, необходимо вывести регуляцию ее биосинтеза из-под жесткого контроля конечным продуктом.
- Возможен отбор мутантов с нарушенной регуляцией биосинтеза определенных аминокислот на питательных средах, содержащих эти аминокислоты
- Эффективность селекции *in vitro* может быть повышена благодаря использованию в качестве селективных агентов не самих аминокислот, а их аналогов. Аналоги, подобно аминокислотам, могут ингибировать ключевые ферменты биосинтеза аминокислот, выступая в качестве обратного ингибитора. Вместе с тем многие из них обладают сильным токсическим действием на клетки. В качестве токсических аналогов аминокислоты триптофана могут использоваться 5-метилтриптофан, 4-метилтриптофан, 5-фтортриптофан, 6-ортотриптофан, в качестве аналога фенилаланина – *p*-фторфенилаланин, лизина – *S*-аминоэтилцистеин.

Получение растений с повышенным синтезом незаменимых аминокислот

- Hibberd, Green (1982) для отбора линий кукурузы с повышенным содержанием в зерне лейцина и треонина (LT) помещали каллюсную ткань, полученную из незрелых зародышей, первоначально на селективную среду, содержащую 1мМ LT. Затем те клеточные клоны, которые сохраняли высокую интенсивность роста, переносили на среды с более высокими концентрациями селективного агента. В результате такой ступенчатой селекции были отобраны клеточные клоны, способные расти на среде с 2-2,5 мМ LT. От одного из них (LT-19) удалось получить растения-регенеранты, у которых отмечено шестикратное, по сравнению с исходными растениями, превышение свободного треонина и 1,5-2-кратное – изолейцина.
- гетерозиготы по гену Ltr-19 показывали 33-кратное, а гомозиготы 77-кратное превышение уровня свободного треонина по сравнению с исходными растениями

Получение растений с повышенным синтезом незаменимых аминокислот

- Widholm (1972) первым выделил клеточные линии табака и моркови, устойчивые к 5-метилтриптофану, используя мутагенную обработку исходных культур этилметансульфонатом и ультрафиолетовым излучением. Для большинства клонов устойчивость была обусловлена уменьшением чувствительности к ингибированию триптофаном фермента анранилатсинтазы, что приводило к увеличению свободного триптофана у линий табака на 33%, а у линий моркови – на 27%.
- В аналогичном эксперименте, проведенном Ranch et al (1983) на дурмане *Datura innoxia*, были получены растения-регенеранты от отобранных с помощью ступенчатой селекции *in vitro* устойчивых к 5-метилтриптофану клеточных линий, которые характеризовались сверхпродукцией свободного триптофана (уровень триптофана был в 4-44 раз выше, чем у растений дикого типа).