

Лекція 11-12. Мікроклональне розмноження в селекції рослин.

В природі існує два способи розмноження рослин: статевий (насіннєвий) і вегетативний. Обидва ці способи мають як свої переваги, так і недоліки.

До недоліків насіннєвого розмноження відносяться генетична різнобарвність посівного матеріалу і тривалість ювенільного періоду.

При вегетативному розмноженні генотип материнської рослини зберігається, а також скорочується тривалість ювенільного періоду. Однак більшість видів погано розмножуються вегетативним способом, до них відносять багато деревних порід. Наприклад, ефективність розмноження, навіть на ювенільній стадії, дубу, сосни, ялини, горіхоплідних не дуже висока. Крім того, за допомогою черенкування неможливо розмножувати більшість видів деревних рослин віком старше 10 – 15 років. Важко одержати стандартний посадковий матеріал, так як існує можливість накопичення та передачі інфекції. Операції по розмноженню за допомогою прищеп складні та трудомісткі.

Досягнення в галузі культури клітин і тканин призвели до створення принципово нового методу вегетативного розмноження – клонального мікророзмноження. Клональне мікророзмноження – одержання *in vitro*, нестатевим шляхом, генетично ідентичних вихідному екземпляру рослин. В основі методу лежить унікальна здатність рослинної клітини реалізовувати властиву їй тотипотентність. Термін «клон» був запропонований у 1903 році Уебстером (від грецького *klon* – черенок або пагін, придатний для розмноження рослин). У відповідності з науковою термінологією клонування передбачає одержання ідентичних організмів з поодиноких клітин. Цей метод має ряд переваг перед існуючими традиційними способами розмноження:

- одержання генетично однорідного посадкового матеріалу;
- звільнення рослин від вірусів за рахунок використання меристемної культури;
- високий коефіцієнт розмноження (10⁵ – 10⁶ – для трав'янистих, квіткових рослин, 10⁴ – 10⁵ – для кущових та деревних рослин і 10⁴ – для хвойних);
- скорочення тривалості селекційного процесу;
- пришвидшення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
- розмноження рослин, які важко розмножуються традиційними способами;
- можливість проведення робіт протягом всього року;
- можливість автоматизації процесу вирощування.

Піонером клонального мікророзмноження вважається французький вчений Жан Морель, який у 50-х роках двадцятого століття одержав перші рослини-регенеранти орхідей. В цей час техніка культивування апікальних меристем *in vitro* була вже добре розроблена. Як правило, дослідники в чкості первинного експлантат використовували верхівкові меристеми трав'янистих рослин: гвоздики, хризантеми, соняшника, гороху, кукурудзи і т.д. В СРСР роботи з клонального мікророзмноження були початі в 30-х роках в лабораторії культури тканин і морфогенезу ІФРА. Під керівництвом Р.Г. Бутенко були вивчені умови мікророзмноження картоплі, цукрового буряку, гвоздики, гербери та інших рослин і запропоновані промислові технології. В подальшому дослідження з клонального мікророзмноження охопили і деревні рослини.

Перші роботи з культури тканин деревних рослин були опубліковані в середині 20-х років ХХ століття і пов'язані з ім'ям Готре, який показав, що камбіальні тканини деяких рослин здатні до каллусогенезу *in vitro*. Але перші рослини-регенеранти

осики, доведені до ґрунтової культури, були одержані лише в середині 60-х років ХХ ст. Матесом.

Культивування тканин хвойних порід *in vitro* довгий час рідко використовувалось як об'єкт дослідження. Це було пов'язано зі специфічними складностями культивування тканин, ізольованих з рослини. Відомо, що деревні, і особливо хвойні рослини характеризуються повільним ростом, складно укорінюються, містять велику кількість вторинних сполук (феноли, терпени і т. д.), які в ізольованих тканинах активуються. Окислені феноли зазвичай інгібують поділ і ріст клітин, що призводить до загибелі первинного експланту або зменшення здатності тканин деревних рослин до регенерації адвентивних бруньок, яка з віком рослини-донору зникає практично повністю. В даний час, не дивлячись на перераховані складності, нараховується більше 200 видів деревних рослин із 40 родин, які були розмножені *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, сосна, ялина, секвоя та ін.)

Фактори, які впливають на процес клонального мікророзмноження

На ефективність мікроклонального розмноження впливає маса факторів різної природи. Це фізіологічні особливості рослини, що вводиться в культуру, фізичні та хімічні умови культивування. Найбільш важливим моментом являється вибір материнської рослини і експланта.

При виборі материнської рослини необхідно враховувати її фізіологічні, сортові та видові особливості. Вихідні рослини повинні бути здоровими, не вражені грибними, бактеріальними і вірусними хворобами. Крім того, вони повинні знаходитися в стані інтенсивного росту (вихід з фази спокою і перехід до активного росту). Цибулини, кореневища і бульби в стані спокою непридатні, перед введенням в культуру їх попередньо обробляють високими або низькими температурами. Здатність до розмноження також детермінована генетично. Наприклад, суниця розмножується всіма способами, обліпиха – ні одним, хоча в природі черенкується. Дводольні володіють більшою регенераційною здатністю, ніж однодольні і деревні.

При виборі експланту необхідно враховувати його вік, будову і походження. Для забезпечення максимальної стабільності матеріалу, що клонується, для запобігання появи аномальних рослин в якості експланта бажано використовувати молоді, слабо диференційовані тканини. Крім того, експланти від ювенільних рослин краще укорінюються, ніж від дозрівших, особливо це стосується деревних порід. Краще за все використовувати кінчики стебел, пазушні бруньки, молоді листки, черенки, суцвіття, луску цибулин, тобто експланти, які містять меристеми. Досліди з ембріонами кукурудзи, проведені Гріном і Філіпсом у 1975 році, показали, що при вилученні ембріонів зі зрілих насінин вони утворюють каллус і корені. Якщо ж ізольовати їх через 2 – 3 тижні після запилення, то утворюється і каллус і рослини. Варто зазначити, що не завжди молоді тканини є вдалим об'єктом для розмноження. В ехеверії на експлантат з молодих листків виникають лише корені, зі старих – лише пагони, із середніх за віком – і пагони, і корені. Чим менше розмір експланту, тим менша його регенераційна здатність. З іншого боку, в крупному експланті збільшується можливість появи в його клітинах вірусів та інших патогенів, що перешкоджає оздоровленню тканин.

Тривалість культивування також впливає на ефективність мікророзмноження. Фізіологічний стан експланта змінюється протягом пасажів, при

довготривалому культивуванню частота вкорінювання пагонів зростає. Можливо, що при цьому експлант набуває ознаки ювенільності, що призводить до підвищення його морфо генетичного потенціалу.

Успіх введення в культуру часто визначається ефективністю стерилізації. Вибір стерилізуючого агенту визначається особливостями експланту. Для ніжних тканин концентрація стерилізуючого агенту повинна бути знижена, щоб зберегти життєздатність експланту. Часто внутрішні зараження вихідних експлантів бувають трохи сильніші, ніж поверхневі, тому експланти попередньо обробляють фунгіцидами та антибіотиками проти грибною і бактеріальною інфекцією. Гарні результати дає обробка рослин бензоатом натрію.

У залежності від виду рослин необхідно випробовувати як тверді, так і рідкі поживні середовища. Іноді рідкі середовища мають переваги, так як забезпечують велику рухливість трофічних елементів. Наприклад, при розмноженні троянд більш успішним було культивування пагонів на двошаровому поживному середовищі: нижній шар – агаризований, верхній – рідкий. На ефективність розмноження можуть також впливати розташування експланту (горизонтальне чи вертикальне), тип пробок (ватні, пластмасові, скляні, металічні і т. д.), а також співвідношення об'єму експлантів і кількості поживного середовища для оптимального освітлення і газообміну експлантів.

Склад поживного середовища необхідно підбирати для кожного виду рослин. На клональне мікророзмноження впливають гормони, мінеральні солі, вітаміни і вуглеводи. При мікророзмноженні *in vitro* часто використовують середовища Мурасіге і Скуга, Лінсмейера і Скуга, Шенка і Хільдебрандта, Ніча, Гамборга, Хеллера та ін.. Зазвичай використовують середовище Мурасіге – Скуга, яка містить багато неорганічного азоту, що стимулює процеси органогенезу та соматичного ембріогенезу. В наших експериментах (Кузьміна Н.А., Внукова В.В., 1997) вихід морфогенних калусів твердої пшениці був вищий на середовищі Мурасіге – Скуга в порівнянні з середовищем Гамборга, яка містила окислені форми азоту. Середовище Мурасіге – Скуга також сприяла стабілізації хромосомного набору клітин твердої пшениці при високому вмісті ауксину в середовищі. Взагалі питання оптимального співвідношення $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ залишається відкритим, так як літературні дані досить протилежні і універсального рецепту для всіх видів рослин немає. В якості джерела вуглеводного живлення використовують різні вуглеводи типу сахарози, глюкози, фруктози, галактози. Різні культури потребують різної концентрації вуглеводів на різних етапах клонального мікророзмноження.

До фізичних факторів вирощування відносяться температура і умови освітлення. На перших двох етапах освітленість коливається від 1000 до 3000 Лк, фотоперіод 14 – 16 годин, але ці параметри залежать від культури. Висока інтенсивність світла може викликати хлорози і затримувати розвиток, але при переносі в ґрунт ці рослини почувають себе краще і ростуть енергійніше. Спектральний склад також відіграє важливу роль. Деякі дослідники (Катаєва Н.В., Аветисов В.А., 1981) вказують на синє світло як основний компонент морфогенезу. Червоне світло стимулює утворення бруньок у тютюну, у салату – утворення пагонів, у берези – вкорінення. В роботах Т.Н. Константинової із співавторами (1987) показано, що синє світло посилює закладку вегетативних бруньок у пагонів тютюну в умовах *in vitro*, а червоне стимулює розвиток квіткових бруньок. Однак при додаванні цитокінінів і ауксинів в різній концентрації співвідношення процесів

диференціації квіткових і вегетативних бруньок змінюється, в деяких випадках спостерігається навіть протилежний ефект. В дослідженнях Р.А. Карначук і Є.С. Гвоздевої (1998) найбільший вихід морфо генних каллусів пшениці, який формує рослини і пагони, відмічений на зеленому світлі. Важливе значення відіграє також поєднання спектрального складу світла і гормональних факторів середовища.

Температура культивування зазвичай варіює в інтервалі 22 – 26°C вдень і 18 – 22°C вночі. В деяких випадках пониження температури веде до підвищення ефективності розмноження. Для підвищення коефіцієнту розмноження необхідно кожному виду з урахуванням його природного ареалу зростання підбирати індивідуальні умови культивування. Відносна вологість повітря – 65 – 70 %.

Спостерігається тенденція збіднення генофонду найважливіших продовольчих культур. Посівні площі починають займати генетично гомогенні суперсорта, що призводить до звуження генофонду для селекції. У цій ситуації зростає значення методу віддаленій гібридизації, що вирішує проблему поповнення генофонду культурних видів. Однак, можливості віддаленої гібридизації обмежуються через програмної і постгамної генетичної несумісності, для подолання яких успішно застосовується метод культури ізольованих зародків і запліднення *in vitro*.

Ембріокультури. Рятує від загибелі нежиттєздатні зародки міжвидових і міжродових гібридів, поступово стає незамінним методом подолання постгамної несумісності. Цим методом отримані багато міжвидові і міжродові гібриди. Успішне культивування недорозвинених ізольованих зародків залежить від багатьох факторів і, перш за все, від стадії розвитку, ступеня диференціювання зародків в момент ізоляції. Труднощі вирощування ізольованих недиференційованих зародків обумовлена неможливістю відтворення *in vitro* гормональної функції ендосперму. Існування тісного функціонального зв'язку між зародком і ендоспермом, особливо в ранньому ембріогенезі було виявлено саме при культивуванні зародків. Порівняльне вивчення зародків різних видів в природних умовах і в культурі, виявило важливий етап в ході ембріогенезу - автономність розвитку зародка, починаючи з якої він стає незалежним від материнського організму і здатний пройти подальший ембріогенез і дати нормальний паросток. Визначення фази автономності для кожного виду рослин дуже важливо, тому що з цього часу зародок може розвиватися самостійно на живильному середовищі. Успішне культивування недорозвинених ізольованих зародків залежить від створення такої живильного середовища, яка дозволяє закінчити формування і перейти до проростання. Універсальної живильного середовища для культивування зародків немає, тому підбір і оптимізація живильного середовища є важливою процедурою в ембріокультурі. Ще одним способом отримання рослин із зародків, які перебувають на ранніх стадіях розвитку, є вирощування *in vitro* запліднених семяпочек і зав'язі. При цьому майже виключається небезпека механічного пошкодження розвиваються в них зародків при ізоляції і з'являється можливість культивувати об'єкти починаючи навіть з стадії зиготи. Ембріогенез в семяпочках *in vitro* протікає нормально, якщо в момент відділення семяпочки присутній мінімальне число ядер ендосперму. При ізолювання семяпочки з зав'язі ембріогенез протікає нормально навіть з семяпочки з зиготи, тому що *in vitro* утворюється ендосперм під впливом морфогенетичного фактора, що надходить з плаценти. Крім підвищення життєздатності зародка при віддаленій гібридизації ембріокультури може бути застосована для прискорення селекційного процесу шляхом переривання стану спокою насіння, скорочення циклу розмноження рослин, подолання самостерильності насіння. Завдяки розвитку методів культивування репродуктивних

органів стало можливим подолання також і прогамної несумісності шляхом спільної культури пилку і незапліднених семяпочек. За день до розкриття квіток бутони зрізають, стерилізують, виокремлює з них товкач або зав'язь, або семяпочку з плацентою і поміщають на поживне середовище, попередньо зробивши надріз в стінці зав'язі і оголивши семяпочку. Потім на агар близько семяпочки висівають простерилізованих пилок, яка проростаючи потрапляє через микропиле семяпочки в зародковий мішок. Розвиток зародка при заплідненні в пробірці може протікати нормально. Іноді спрощують цю процедуру, завдаючи пилок на семяпочку і культивуючи запилення семяпочку. Запилення *in vitro* добре вдається для рослин сімейства макових, гвоздикових, пасльонових, у яких в зав'язях є численні семяпочки. Подальша розробка методів культивування генеративних органів квітки в поєднанні з ембріокультури дозволить вести селекцію більш ефективно, бо зростають можливості для здійснення віддаленої гібридизації.
