

# **Лекция 6. Методы клонального микроразмножения**

- 1. Клональное микроразмножение растений**
- 2. Получение безвирусного посадочного материала**

**Клональное микроразмножение растений: Учебно-методическое пособие / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.**

# 1. Клональное микроразмножение растений

Клональное микроразмножение – это использование техники *in vitro* для быстрого получения неполовым путем растений, идентичных исходному.

По своей сути микрклональное размножение аналогично вегетативному типу 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.

Важным условие успеха являются условия асептики и соответствующие питательные добавки.

В настоящее время число видов растений, которые можно клонировать «в пробирке» уже составляет несколько тысяч. Хотя метод микроклонального размножения растений является довольно трудоемким и затратным, в ряде случаев на его основе уже стало возможным создавать экономически рентабельные технологии.





Этот метод имеет ряд преимуществ перед существующими традиционными способами размножения:

- высокий коэффициент размножения ( $10^5$ – $10^6$  – для травянистых, цветочных растений,  $10^4$ – $10^5$  – для кустарниковых древесных,  $10^4$  – для хвойных);
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала;
- 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

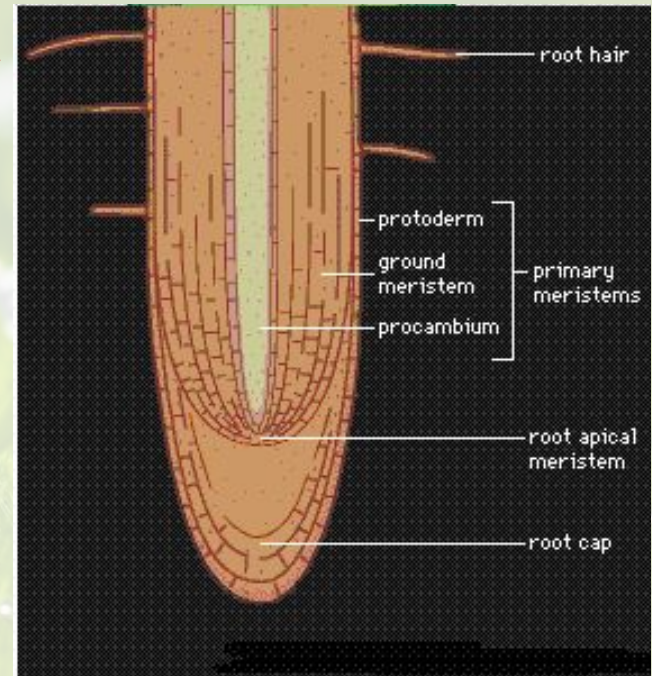
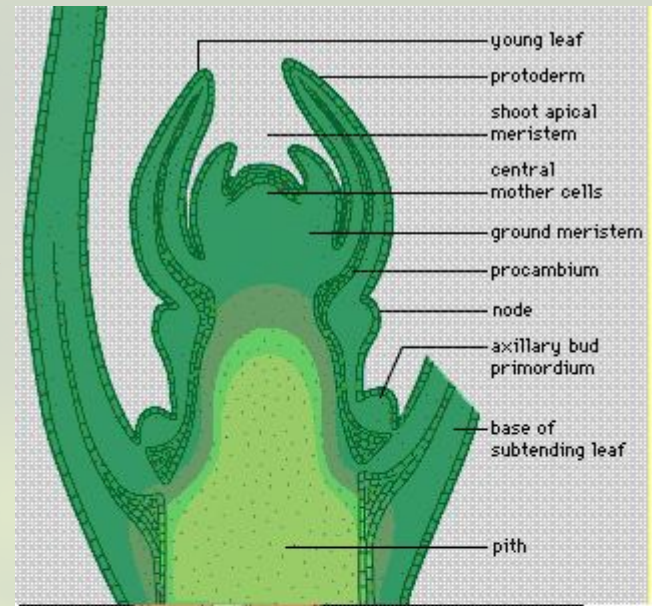
- в селекции для поддержания и размножения растений с уникальными генотипами;
- для быстрого размножения новых и уже существующих сортов;
- массового получения оздоровленного посадочного материала у растений, подверженных вирусным заболеваниям;
- для быстрого размножения некоторых гетерозиготных садовых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

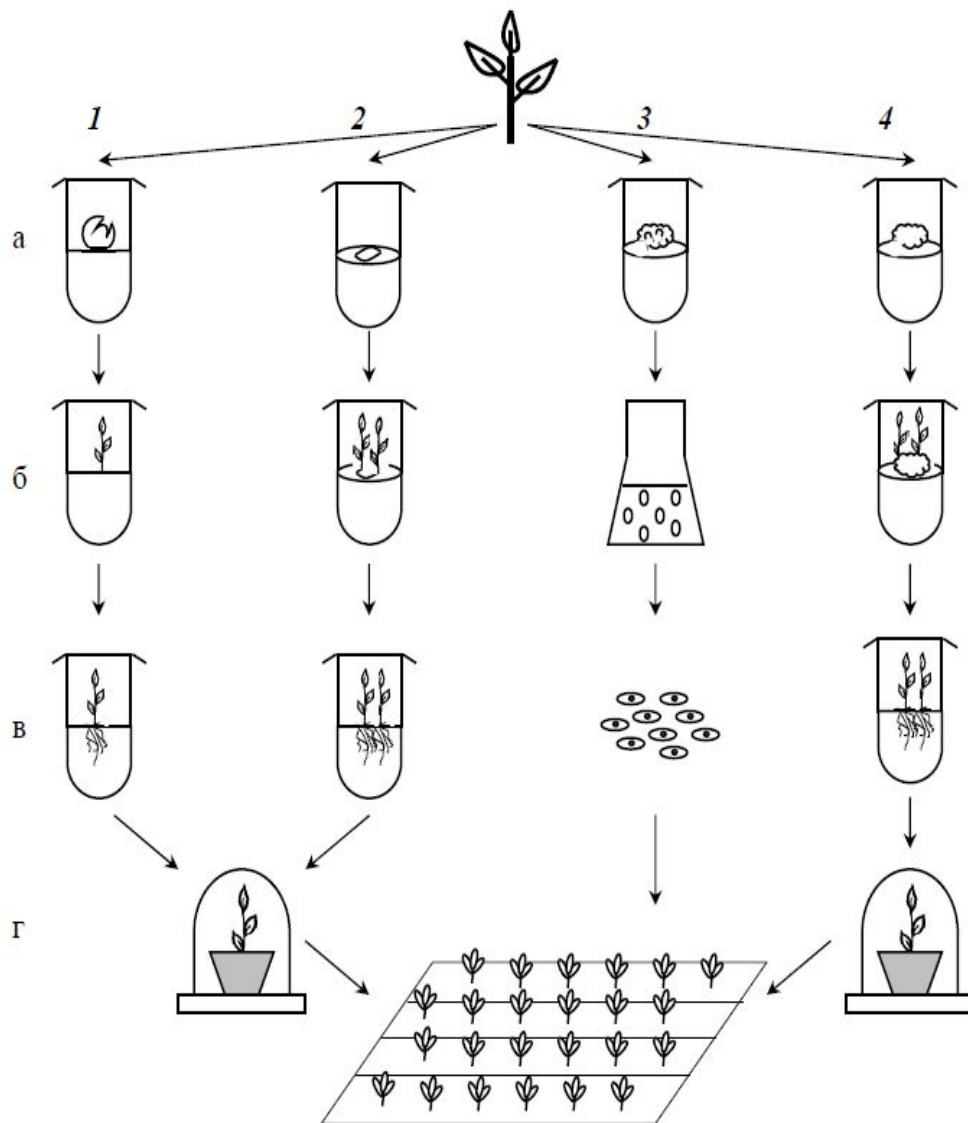




Методы клонального микроразмножения (*в зависимости от автора, могут по-разному интерпретироваться*).

- активация развития уже существующих в растении меристем (апекса стебля, пазушных и спящих почек, интеркалярных зон стебля);
- индукция адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;
- индукция соматического эмбриогенеза;
- дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной тканях.

# Схема клонального микроразмножения растений

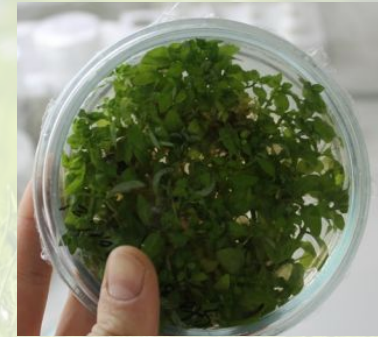


- 1 – активация развития меристемы;
  - 2 – образование адвентивных почек непосредственно на первичном экспланте;
  - 3 – индукция соматического эмбриогенеза в каллусе и суспензионной культуре;
  - 4 – образование адвентивных почек в каллусной ткани:
- а – получение стерильной культуры;
- б – формирование микрообегов и развитие соматических эмбриоидов;
- в – укоренение микрообегов и образование искусственных семян;
- г – перевод растений-регенерантов в тепличные условия с последующей высадкой в поле

1. Основным методом, используемым 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.



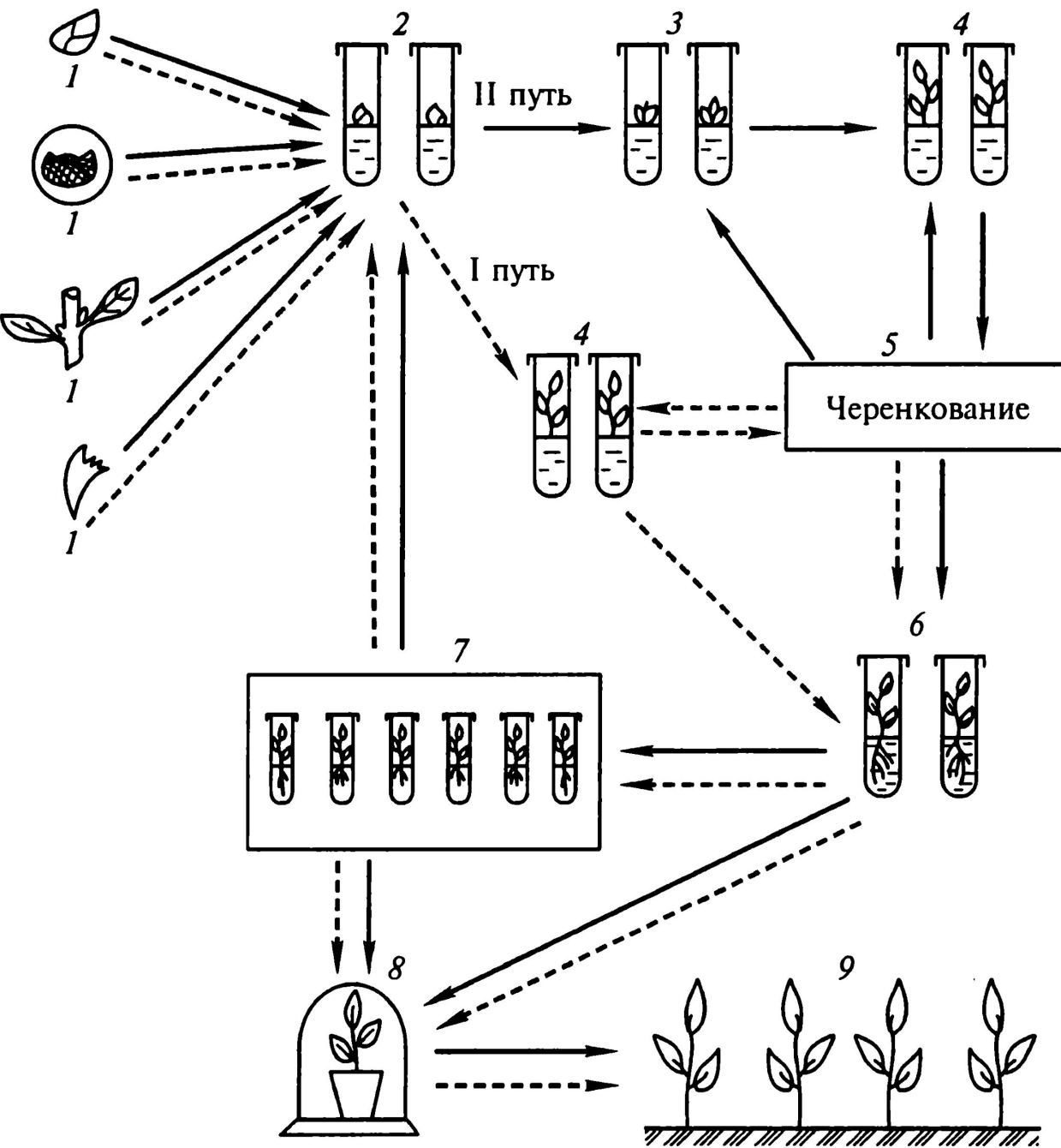
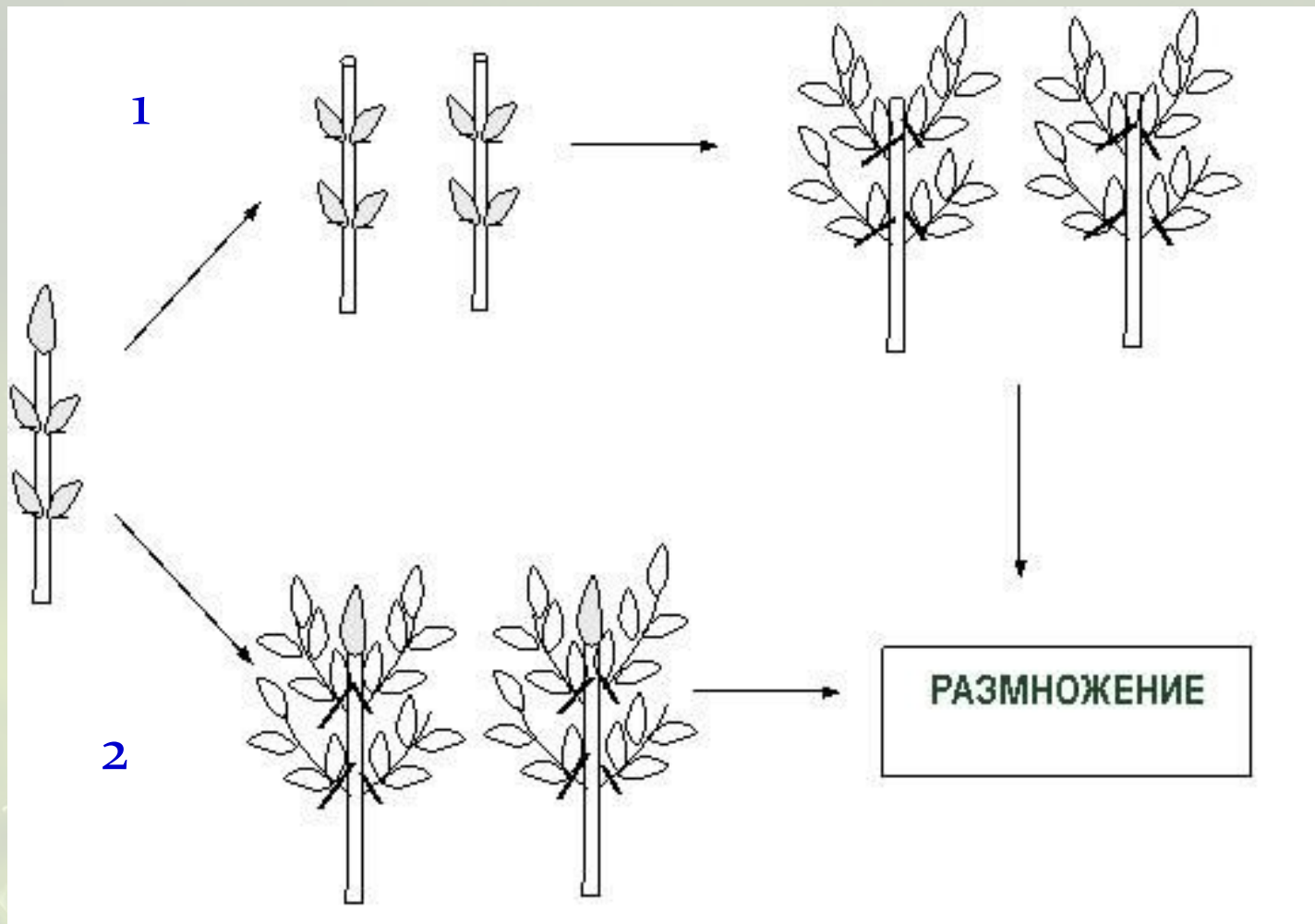


Схема клонального микроразмножения растений методом активации развития существующих меристем (I путь), индукции возникновения адвентивных почек на экспланте (II путь):

- 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.







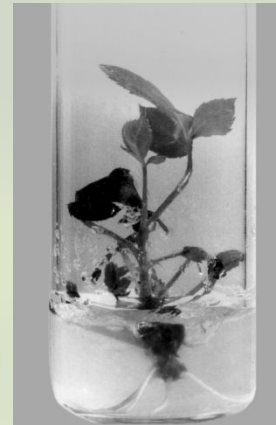
## Микроклональное размножение картофеля:

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).



- 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 или НУК.



Данным методом были размножены:

- Многие луковичные цветочные растения (*нарциссы, лилии, гиацинт, гладиолусы, тюльпаны*). Из луковичных вычленяются чешуи, сегменты базальной части донца луковиц, экспланты листьев.
- Овощные культуры: *лук, чеснок* – из верхушечной меристемы, ткани донца луковиц; *томаты* – из апикальных или пазушных меристем;
- Представители рода *Brassica* (*капуста цветная, кочанная, брюссельская, листовая, брокколи* ) из сегментов гипокотыля, семядолей, листьев);
- Цветочные культуры: *петуния*– из сегментов корней; *гloxиния, фиалки* – из сегментов листовых пластинок;
- Некоторые представители *древесных растений* – из изолированных зрелых и незрелых зародышей.



## 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).

# Соматический эмбриогенез

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



Проросток пшеницы из соматического эмбриоида

**Соматические зародыши  
проходят 3 стадии развития:  
глобулярную, сердцевидную,  
торпедовидную и в  
конечном итоге  
развиваются в проросток.**





## Недостатки метода

Соматический эмбриогенез является достаточно трудоемкой операцией, так как не всегда удается 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.

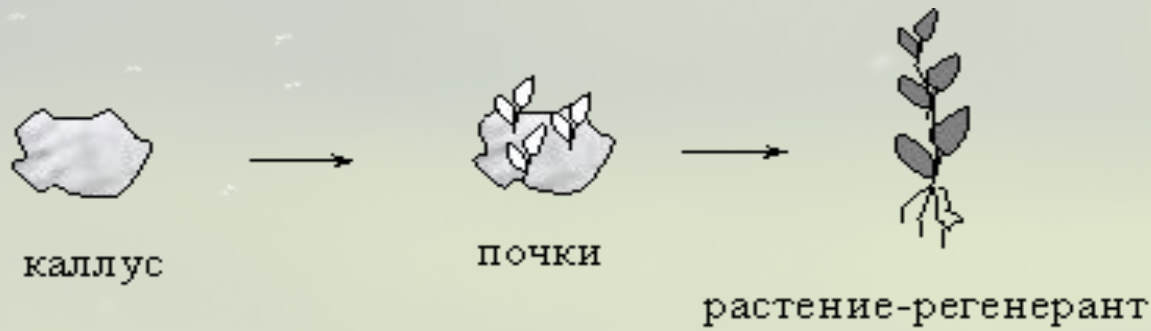
## 4 метод - дифференциация адвентивных почек в первичной и пересадочной каллусной ткани.

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.

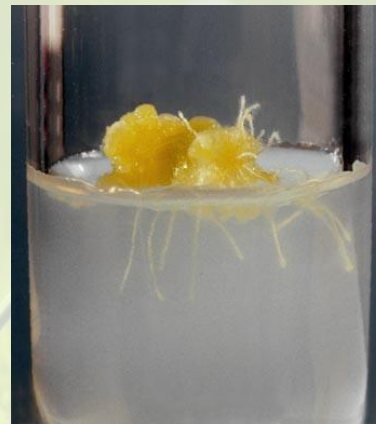
Данный метод целесообразно применять лишь к тем растениям, для которых показана генетическая стабильность каллусной ткани, а вариабельность между растениями-регенерантами не превышает уровня естественной изменчивости. *К таким растениям можно отнести амариллис, томаты, спаржу, некоторые древесные породы 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,  
осуществляем  
ое одним из  
четырех  
перечислен-  
ных 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.



## 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 макаеи сердцевидной перед высадкой в рулоны

Пробирочные растения макаеи сердцевидной высаженные в рулоны с торфом

Растения макаеи 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*



## Высокая регенерационная способность, морфогенетический потенциал

---

Двудольные: пасленовые, крестоцветные, сложноцветные.

Однодольные, хорошо размножающиеся вегетативно.

Зрелые зародыши, 20–30-дневные проростки или различные их части (ювенильный материал).

Ткани и органы, изолированные в момент вегетации растений.



## Низкая регенерационная способность, морфогенетический потенциал

---

Однодольные: злаковые.

Древесные: хвойные.

Ткани взрослых растений.

Ткани и органы, изолированные в период глубокого и вынужденного покоя.

На успех клонального микроразмножения влияют: возраст первичного экспланта, размер экспланта; гормональный баланс питательной среды; рН среды; интенсивность освещения, спектральный состав света, температурный режим и др.

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.

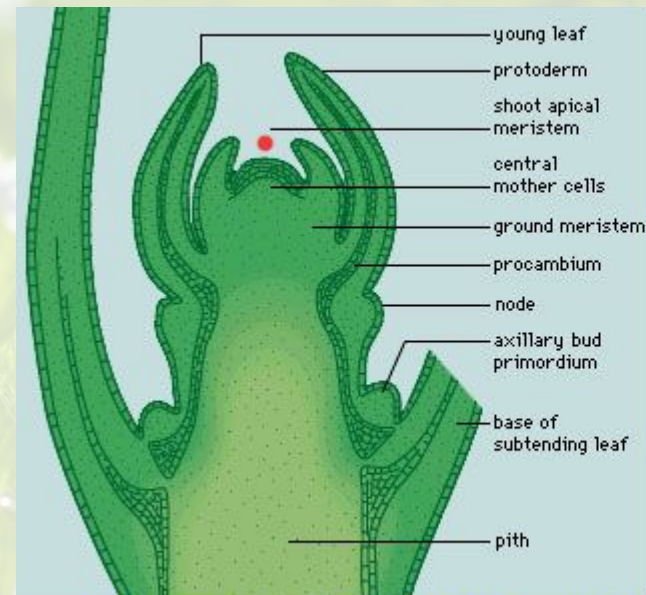
Установлено, что соя и некоторые другие важные бобовые растения передают вирусы потомству даже при семенном размножении, в результате чего сорта постепенно отягощаются грузом вирусных инфекций.

Наиболее эффективный для оздоровления от вирусов, вириодов 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.

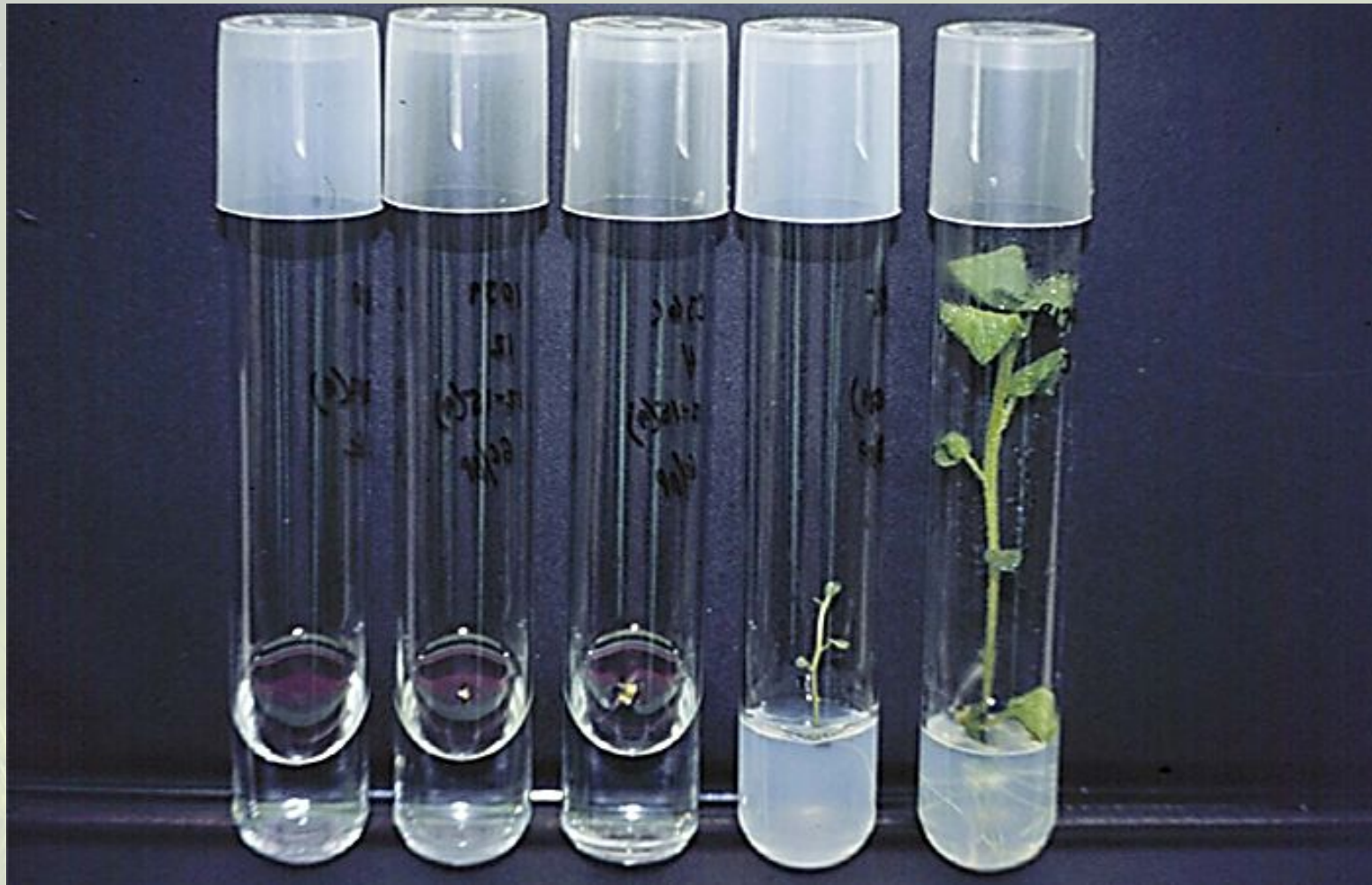


Оздоровленные применением меристемной культуры растения размножают далее обычными методами клонального микроразмножения.

Важное место в этой работе принадлежит диагностике зараженных растений. Наиболее часто применяются методы ИФА и ПЦР.



# Этапы получения пробирочных растений картофеля



Питательная среда

Посадка апикальной меристемы

Проросток из меристемы

Пробирочное растение из меристемы

Пробирочное растение из меристемы после черенкования



# Этапы получения безвирусного картофеля



Ростки картофеля перед вычлениением меристемы



Рост меристемы картофеля в пробирке



Растения картофеля in vitro



Растения картофеля в открытом грунте



Растения картофеля перед высадкой в открытый грунт



Черенкование побегов картофеля



