Автономное образовательное учреждение

высшего профессионального образования

Ленинградский Государственный Университет

имени А.С. Пушкина

***Методы и условия культивирования изолированных клеток и тканей растений***

Санкт-Петербург

2009

**Содержание**

Введение

1.Вспомогательное использование методов in vitro в селекции растений

2. Клеточная селекция растений

3. Гибридизация соматических клеток

Литература

**Введение**

Одно из направлений клеточных технологий – это использование их в селекции, которое облегчает и ускоряет традиционный селекционный процесс в создании новых форм и сортов растений. Существующие методы культивирования изолированных клеток и тканей in vitro условно можно разделить на две группы.

Первая группа – это вспомогательные технологии, которые не подменяют обычную селекцию, а служат ей. К ним можно отнести: оплодотворение in vitro (преодоление программной несовместимости), культивирование семяпочек и незрелых гибридных зародышей (преодоление постгамной несовместимости), получение гаплоидов путем культивирования пыльников и микроспор, криосохранение изолированных клеток, тканей и органов, клональное микроразмножение отдаленных гибридов.

Вторая группа методов ведет к самостоятельному, независимому от традиционных методов селекции, получению новых форм и сортов растений: клеточная селекция с использованием каллусной ткани, соматическая гибридизация (слияние изолированных протопластов и получение неполовых гибридов), применение методов генной инженерии.

**1.** **Вспомогательное использование методов in vitro в селекции растений**

В отдаленной гибридизации находят применение такие методы культуры изолированных тканей, как оплодотворение in vitro, эмбриокультура (выращивание изолированных зародышей на искусственных питательных средах), клональное микроразмножение ценных гибридов, а также получение гаплоидов in vitro и криосохранение.

**Оплодотворение in vitro (преодоление прогамной несовместимости)** проводится в том случае, когда невозможно осуществить оплодотворение между выбранными парами в естественных условиях. Это вызвано несколькими причинами: 1) физиологические (несоответствие во времени созревания пыльцы и т.д.); 2) морфологические (короткая пыльцевая трубка или блокирование роста ее на разных этапах развития и т.д.). Оплодотворение in vitro можно осуществить двумя способами: а) культивирование на искусственной агаризованной питательной среде завязи с нанесенной на нее готовой пыльцой; б) завязь вскрывается и на питательную среду переносятся кусочки плаценты с семяпочками, вблизи которых или непосредственно на ткани плаценты культивируется готовая пыльца. Визуально определить, прошло оплодотворение in vitro или нет, можно по быстроувеличивающимся в размерах семяпочкам. Сформировавшийся зародыш, как правило, не переходит в состояние покоя, а сразу прорастает и дает начало гибридному поколению. Плацентарное оплодотворение in vitro позволило преодолеть несовместимость в скрещивании сортов культурного табака N. tabacum с дикими видами N. rosulata и N. debneyi и сделало возможным получение межвидовых гибридов табака в опытах М.Ф. Терновского и др. (1976), Шинкаревой (1986).

**Преодоление постгамной несовместимости**. Постгамная несовместимость при отдаленной гибридизации возникает после оплодотворения. Часто при этом образуются щуплые невсхожие семена. Причиной может быть расхождение во времени развития зародыша и эндосперма. Из-за слабого развития эндосперма зародыш бывает неспособен к нормальному прорастанию. В таких случаях из зрелой щуплой зерновки изолируют зародыш и выращивают его в питательной среде.

Выращивание зародышей в искусственной питательной среде называется эмбриокультурой. Среда для выращивания зрелого зародыша может быть простой, без добавок физиологичеки активных веществ (например, среда Уайта) или любая другая, содержащая минеральные соли и сахарозу. При более отдаленных скрещиваниях нарушения в развитии зародыша могут наблюдаться уже на ранних этапах, что выражается в отсутствии дифференцировки, замедленном росте. В этом случае культура зародыша состоит из двух этапов – эмбрионального роста зародыша, во время которого продолжается его дифференцировка, и прорастания подросшего зародыша. Для первого этапа требуется более сложная по составу среда с повышенным содержанием сахарозы, с добавками различных аминокислот, витаминов и гормонов.

Применение эмбриокультуры в селекции приобретает в последнее время большое значение для получения отдаленных гибридов зерновых, злаковых и других сельскохозяйственных культур. Показана возможность увеличения выхода пшенично-ржаных гибридов путем доращивания незрелых зародышей, а также использования эмбриокультуры для преодоления постгамной несовместимости при гибридизации пшеницы с колосняком.

Метод эмбриокультуры находит все более широкое применение в межвидовой гибридизации овощных растений. Для лука разработаны приемы выращивания in vitro абортивных зародышей от гибридных семян с разных этапов эмбриогенеза, выращивание зародышей от частично фертильных межвидовых гибридов. Культура изолированных зародышей используется в селекции томатов и других овощных растений.

Исследована гормональная регуляция роста и развития зародышей томата in vitro. Обсуждается возможность применения эмбриокультуры для получения отдаленных гибридов подсолнечника, изучаются факторы, контролирующие рост и развитие in vitro зародышей подсолнечника, выделенных в разные сроки после опыления.

Культура изолированных зародышей как вспомогательный метод при отдаленной гибридизации применяется не только для преодоления постгамной несовместимости, но также с целью микроразмножения ценных гибридов. В этом случае микроразмножение идет путем каллусогенеза, индукции морфогенеза и получения растений-регенерантов из каллусной ткани. Техника клонирования незрелых зародышей позволяет размножать ценные генотипы растений на ранних стадиях жизненного цикла. Еще одна возможность применения культуры зародышей–использование ее в клеточной селекции.

**Клональное микроразмножение отдаленных гибридов.** Эмбриокультура дает возможность вырастить гибридные растения из неполноценных зародышей. Однако выход гибридных растений мал, и гибриды часто бывают стерильны. Иногда, например, при селекции гречихи, трудно воспроизвести в потомстве уникальные генотипы из-за перекрестного опыления культуры. Поэтому перед исследователями часто встает задача – размножить и сохранить полученные растения. В этом помогает метод клонального микроразмножения. Размножают гибриды путем активации развития меристемы пазушных почек (черенкованием стерильных побегов), адвентивными почками или регенерацией растений из каллусной ткани, в частности полученной при культивировании зародышей.

**Получение гаплоидов in vitro и использование их в селекции.** Роль гаплоидных растений в селекции очень велика. Применение их позволяет быстрее найти нужную комбинацию, сокращает время для создания сорта. Гаплоиды используются для получения стабильных гомозиготных линий. Для мутагенеза также удобнее использовать гаплоиды, поскольку на гаплоидном уровне облегчается отбор рецессивных мутаций.

В диплоидных растениях мутации редко затрагивают оба аллельных гена в гомологичных хромосомах. Особь обычно гетерозиготна (два гена различаются), при этом проявляется действие только доминантного (но не рецессивного) гена. Поскольку мутации чаще рецессивны, чем доминантны, их довольно сложно выявить. В гаплоидных же растениях, которые содержат только одну из каждой пары гомологичных хромосом, мутации проявляются немедленно. Селекция на гаплоидном уровне позволяет вести прямой отбор не только доминантных, но и рецессивных признаков.

Гаплоидные особи стерильны, но можно искусственно удвоить набор их хромосом с помощью колхицина и получить диплоидные гомозиготные растения.

Гаплоиды могут возникать спонтанно, но частота их спонтанного возникновения очень мала. Искусственным путем с Использованием методов in vitro удается получить большие количества гаплоидных растений. Существует три способа получения гаплоидов с использованием метода культуры изолированных тканей:

андрогенез – получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных пыльников и микроспор.

гиногенез – получение гаплоидных растений на искусственной питательной среде из изолированных семяпочек;

партеногенез – получение гаплоидов из гибридного зародыша, у которого из-за несовместимости хромосом родителей потеряны отцовские хромосомы.

Образовавшиеся в результате элиминации хромосом отцовского генома гаплоидные эмбриоиды культивируют на искусственных питательных средах и получают гаплоидные растения. Сорта ячменя Исток и Одесская-15 были получены комбинацией партеногенетического метода с культурой изолированных зародышей за четыре года вместо обычных 10–12 лет. Методом культуры пыльников из сортов и гибридов мягкой и твердой пшеницы в НПО «Элита Поволжья» за четыре года получено более 2,5 тыс. дигаплоидных линий, которые характеризуются гомогенностью и стабильностью.

Продолжается разработка технологии получения гаплоидов посредством культуры пыльников пшеницы, ячменя, кукурузы, озимой ржи, картофеля. В культуре пыльников возможны два пути образования гаплоидных растений. Первый – образование растений путем эмбриогенеза в пыльцевых зернах. При этом внутри пыльников из отдельных пыльцевых зерен возникают эмбриоиды. Они прорастают и дают гаплоидные растения. Второй – образование каллуса из клеток пыльника. В дальнейшем в результате морфогенеза из каллусных клеток регенерируют растения. В этом случае образовавшиеся растения не всегда бывают гаплоидными и часто отличаются по плоидности. До конца не выяснено, образуются ли они от полиплоидизированных гаплоидных клеток или от слившихся клеток.

Гаплоиды, полученные in vitro, могут применяться не только в практической селекции, но и в работах по генетической инженерии, а также по клеточной селекции. Пыльцевые зерна являются в некоторых случаях более удобными, чем протопласты, объектами для опытов по генетической трансформации.

**Криосохранение растений.** Криосохранение соматических клеток растений в жидком азоте (температура – 196° С) – новое направление в биотехнологии, которое широко стало развиваться с начала 70-х годов XX столетия. Цель данной технологии заключается в сохранении в культуре in vitro генофонда, а также в обеспечении селекционеров в любое время генотипом, имеющим искомые признаки: необходимая пыльца для проведения гибридизации; уникальные и единичные семена, в том числе не выносящие обезвоживания; трансформированные, мутантные, гибридные клетки разных видов растений, способных к морфогенезу in vitro; зиготические и соматические зародыши и т.д. В настоящее время разработаны условия криосохранения для культивируемых клеток более 30 видов, каллусных культур (около 10 видов), изолированных протопластов (8 видов), сохранения меристем (25 видов) и кончиков стебля (13 видов). Приоритет в этом направлении принадлежит Институту физиологии растений РАН и, в частности, отделу культуры тканей и морфогенеза, возглавляемому проф. Р.Г. Бутенко.

При проведении работ по криосохранению необходимо, прежде всего, учитывать специфику растительных клеток: отбирать мелкие клетки, с маленькой вакуолью и пониженным содержанием воды; разрабатывать в каждом отдельном случае подходы замораживания и последующего оттаивания растительных клеток. При криосохранении встречается ряд трудностей, одна из которых связана с защитой замораживаемых клеток и тканей от осмотического стресса и механического разрушения структур в результате образования и роста кристаллов льда внутри клетки. Одновременно с этим необходимо правильно подбирать условия, обеспечивающие высокую выживаемость клеток при оттаивании и рекультивации.

Несмотря на многообразие работ в этом направлении, в них все же наметились общие приемы, лежащие в основе криосохранения: обработка клеток перед замораживанием, применение криопротекторов, соблюдение определенного режима замораживания в интервале от 0 до –40° С (в редких случаях до -70° С), а также специальные предосторожности при оттаивании объектов.

Процесс криоконсервации, как правило, начинается с подготовки культуры клеток к замораживанию. Это может быть достигнуто несколькими способами, предусматривающими культивирование клеток на питательных средах, содержащих различные осмотически активные вещества: маннит или сорбит в концентрации 2–6%, аминокислоты и среди них, в первую очередь, пролин, чье значение для связывания воды в клетках растений широко известно, а также у-аминомасляная кислота.

Подбор криопротекторов, веществ, уменьшающих повреждение клеток от осмотического и механического стресса, проводят эмпирически по принципу наименьшей токсичности и оптимального эффекта. Среди всех известных криопротекторов выделяются такие легко проникающие в клетки вещества, как диметилсульфоксид (ДМСО, 5–10%), глицерин (10–20%), а также непроникающие высокомолекулярные–поливинилпиролидон (ПВП), декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой 6000.

Большое значение при криосохранении имеет правильно подобранный режим замораживания от 0 до –40° С. Как правило, для всех объектов устанавливается скорость замораживания 0,5–1 °С в минуту и всю эту работу проводят на специальном оборудовании, обеспечивающем программное замораживание. Такие приборы выпускает специальное конструкторское технологическое бюро с опытным производством при Институте проблем криобиологии и криомедицины (г. Харьков).

Таким образом, медленное замораживание и использование криопротекторов позволяет освободить клетку от свободной воды, и при –40° С клетки становятся полностью обезвоженными, что дает возможность проводить дальнейшее замораживание, а именно погружать ампулы с растительным материалом в жидкий азот.

Хранение материала в жидком азоте практически не лимитировано. Например, в криобанке Института физиологии растений РАН хранятся клетки моркови, которые находятся в жидком азоте около 20 лет, меристемы картофеля – более 10 лет и др.

Оттаивание и проверка жизнеспособности клеток после хранения в жидком азоте является последним этапом технологии криосохранения. Если замораживание осуществляют медленно, постепенно, то оттаивание должно быть проведено как можно быстрее. Для этого ампулы помещают в водяную баню с температурой 40°, а иногда и 60° С и выдерживают до полного исчезновения последнего кристаллика льда.

Для определения жизнеспособности клеток после оттаивания применяют наиболее простой, быстрый и вполне удовлетворительный способ – окраска витальным красителем (0,1%-ным феносафранином или 0,25%-ным раствором сини Эванса), в результате которой мертвые клетки окрашиваются, а живые нет. Окончательным критерием, безусловно, служит четкое возобновление роста и деления клеток при рекультивации на искусственных питательных средах после оттаивания.

Экспериментально было показано, что клетки после хранения в жидком азоте не теряют способности к делению, регенерации растений, не уменьшается продуктивность синтеза вторичных метаболитов (клетки продуценты) и т.д. Так, Институтом физиологии растений РАН совместно с НПО по картофелеводству разработаны методы криосохранения меристем четырех сортов картофеля и показана возможность из 20% хранящихся меристем регенерировать целые растения, которые при высадке в поле не отличались по всем признакам, включая темпы роста и продуктивность, от обычных пробирочных растений (С. Манжулин и др., 1982). Более подробно о технике криосохранения можно узнать из обзорных работ А.С. Попова.

Таким образом, технология, связанная с криосохранением растительных объектов, развивается и постоянно совершенствуется. Несомненно, эта технология имеет свое будущее, так как уже сегодня криобанки могут значительно облегчить работу селекционеров, предоставив им возможность широко использовать пул генов сортов, в том числе старой селекции и диких видов, а также исчезающих видов растений.

**2. Клеточная селекция растений**

**Сомаклональная вариабельность**. Метод культуры изолированных клеток, тканей и органов растений in vitro, широко используемый для решения многих фундаментальных вопросов клеточной биологии, физиологии и генетики растений, в настоящее время находит все большее применение и при создании новых биотехнологий. Начиная с первых работ по культивированию растительных клеток, тканей и органов особый интерес у исследователей вызвал вопрос о том, какие клеточные изменения могут происходить в изолированных клетках, растущих на искусственных питательных средах, и причины, их вызывающие. С разработкой техники получения растений-регенерантов из каллусной ткани появилась возможность получать новые формы растений, отличающиеся как по фенотипическим, так и по генетическим признакам от исходных растений. Такое разнообразие среди клеточных линий и растений-регенерантов получило название «сомаклоны», хотя еще в 70–80-е годы нашего столетия было принято называть растения, регенерировавшие из каллусной ткани, «калликлонами», а из протопластов – «протоклонами».

Генетическая природа и механизм возникновения сомаклональной изменчивости пока мало изучены. Однако четко можно выделить зависимость возникновения сомаклональных вариантов, прежде всего, от генетической гетерогенности соматических клеток исходного экспланта, генетической и эпигенетической изменчивости, индуцируемой условиями культивирования in vitro, а также от генотипа и исходного экспланта.

Дифференцированные клетки в нормальном растении могут иметь разную степень плоидности, но для отдельных видов характерно наличие только диплоидных клеток. Однако в процессе онтогенеза могут возникать клетки с разной плоидностью. Например, экспериментально доказано, что в меристемных тканях, наряду с фактором видового постоянства числа хромосом, почти у 80% покрытосеменных растений в процессе дифференцировки в соматических клетках может происходить эндоредупликация хромосом и формирование тканей различного уровня плоидности. Для вегетативно размножаемых и апомиктичных растений характерно образование с высокой частотой анеуплоидных клеток. Усиление хромосомных перестроек, приводящих к появлению химерности и миксоплоидии у растений, наблюдается при изменении условий произрастания, особенно при их резком ухудшении: засоление почв, повышенные или пониженные температуры, применение гербицидов или пестицидов, минеральных удобрений в повышенных дозах и др. Эти и другие часто встречающиеся в практике факторы могут приводить к физиологическим нарушениям, связанным, в первую очередь, с появлением аномальных митозов и формированием клеток с числом хромосом, отличающимся от такового в материнской ткани.

Цитологические исследования показали, что вариабельность, индуцируемая условиями культивирования in vitro, связана с генетическими изменениями. Прежде всего одним из основных источников появления фенотипических вариантов являются различные кариологические изменения и перестройки. Однако выявить, какие из них будут иметь фенотипический эффект и наследоваться как стабильная мутация генов, часто сложно. Как грубые, так и тонкие хромосомные изменения – мелкие деления, дупликации, транслокации, инверсии – могут вызвать существенные фенотипические изменения как в растениях-регенерантах, так и в последующем потомстве. Хромосомные изменения часто наблюдаются при мейозе. Анализ мейоза клетки в регенерантах показал такие интенсивные перестройки хромосом, как транслокация, инверсия, субхроматидный обмен, частичная утрата хромосом. Это является доказательством того, что большая часть фенотипических изменений обусловлена генетическими механизмами.

Сомаклональную изменчивость можно проследить на молекулярном уровне, оценивая тонкие перестройки ядерной ДНК.

Кроме сомаклональной вариабельности, связанной с наследуемыми перестройками генома, отмечены фенотипические изменения («эпигенетические»), которые могут стабильно передаваться дочерним клеткам, но не проявляться в растениях-регенерантах или их половом потомстве (Приложение 1).

Высокая степень разнообразия сомаклонов зависит от исходного генотипа, природы и стадии развития экспланта. Например, у различных злаков степень изменчивости среди сомаклонов может значительно различаться: у пшеницы (2n=6х=42) из 192 исследованных растений-регенерантов 29% были анеуплоидами, у гексаплоидного овса (2n=6х=42) выявлены цитоге-нетические изменения с такой же частотой, а для кукурузы частота возникновения анеуплоидных растений не превышала 2–3%. Образование полиплоидных и анеуплоидных растений может наблюдаться и у других видов, например, на картофеле. Причем частота появления новых вариантов у диких видов значительно ниже, чем у дигаплоидных линий культивируемого картофеля.

Тип исходного экспланта также влияет на появление сомаклональных вариантов, отличающихся количественными и качественными признаками. Для картофеля, например, аномальные растения получены в 12% случаев при использовании в качестве первичного экспланта мезофильных тканей листа, а в случае использования лепестков или оси соцветий частота формирования растений с фенотипическими отклонениями от нормы составила 50%.

Условия культивирования и, в частности, нарушение гормонального баланса питательной среды – одна из причин возникновения генетического разнообразия культивируемых клеток вследствие нарушения клеточного цикла, в частности митоза. От соотношения фитогормонов, входящих в состав питательных сред, во многом зависит цитогенетическая структура клеточных популяций. Однако морфологическая и цитогенетическая разнокачественность клеточных популяций может возникнуть и вследствие влияния отдельных компонентов питательной среды: некоторых минеральных солей, сахарозы или другого источника углеродного питания, витаминов, растительных экстрактов, а также от режима выращивания. Длительное культивирование клеток in vitro также способствует повышению генетического разнообразия сомаклонов. Причем для некоторых видов показано, что, несмотря на присутствие в культуре клеток разной плоидности, регенерировавшие растения были преимущественно диплоидными. Это явление было объяснено тем, что в процессе культивгирования отбирались растения-регенеранты с более или менее нормальной морфологией, которые регенерировали, как правило, в первую очередь.

Различные типы морфогенеза – соматический эмбриогенез или органогенез–также могут по-разному сказываться на генетических изменениях и, соответственно, на фенотипе растений. Экспериментально установлено, что при соматическом эмбриогенезе время прохождения цикла клетка – растение значительно короче, чем при органогенезе, поэтому степень сходства получаемого материала и исходного родительского генотипа может быть значительно выше.

Сомаклональные варианты имеют, несомненно, практическое применение в сельскохозяйственной практике, в силу появления форм, отличающихся от родительских по различным биохимическим, качественным и количественным признакам, а также цитогенетическим характеристикам. Например, получены сомаклоны картофеля сорта Зарево, отличающиеся высокой урожайностью, повышенной устойчивостью к заболеваниям, более высоким содержанием в клубнях протеина и крахмала. Причем наследование важных признаков при размножении клубнями сохранялось в течение трех лет полевых испытаний (В.В. Сидоров и др., 1984, 1985). Для растений табака получены через каллусную культуру сомаклоны, устойчивые к вирусу табачной мозаики, а для сахарного тростника» получен новый сорт, характеризующийся высокой урожайностью и повышенной устойчивостью к заболеваниям, в частности к болезни Fiji. В настоящее время метод культуры тканей начал широко использоваться в селекции не только кормовых и технических культур, но и декоративных и лекарственных растений. Примером тому может служить новый сорт пеларгонии Velvet Rose, полученный через каллусную культуру.

Таким образом, полученные положительные результаты свидетельствуют о необходимости более эффективного внедрения различных приемов получения сомаклональных вариантов в практику селекционной работы, и наиболее реальным является применение сомаклональной изменчивости для улучшения или «доработки» уже существующих сортов или линий по отдельным недостающим признакам.

**Селекция растений на клеточном уровне.** Значительный интерес представляет вопрос об использовании клеточной селекции в комплексе с получением сомаклонов. Одна из наиболее сильных сторон культуры in vitro в создании технологий для сельского хозяйства – возможность на основе сомаклональных вариаций или индуцированных мутаций отбирать в жестких селективных условиях клетки, характеризующиеся искомыми признаками.

Для проведения клеточной селекции используют следующие приемы:

* прямая (позитивная) селекция, при которой выживает лишь определенный искомый мутантный тип клеток;
* непрямая (негативная) селекция, основанная на избирательной гибели делящихся клеток дикого типа и выживания метаболически неактивных клеток, но требующая дополнительной идентификации у них мутационных изменений;
* тотальная селекция, при которой индивидуально тестируются все клеточные клоны;
* визуальная селекция и неселективный отбор, когда вариантная линия может быть идентифицирована среди всей популяции клеток визуально или при использовании биохимических методов (тонкослойная или жидкостная хроматография, радиоиммунный анализ, микроспектрофотометрия и др.).

Из перечисленных выше приемов клеточной селекции прямая селекция является наиболее распространенным методом и используется главным образом для выделения растений-регенерантов, устойчивых, например, к гербицидам, антибиотикам, токсинам, тяжелым металлам, солям и другим антиметаболитам.

Для проведения работ по клеточной селекции растений в условиях in vitro в качестве объекта исследования могут быть использованы каллусные, суспензионные культуры или изолированные протопласты. Выбор объекта зависит от наличия разработанных технологий применительно к различным видам растений, а также от конечных целей исследования.

Каллусная ткань представляет собой легко доступный материал, который наиболее часто используют для клеточной селекции. Как правило, работу проводят на первичной или пересадочной каллусной ткани, которая не утрачивает способности к регенерации на протяжении ряда субкультивирований. Однако при работе с каллусными культурами многие исследователи отмечают существенные недостатки данного объекта, медленный рост ткани, неравноценное для всех клеток действие токсических веществ, которые применяются в качестве селективного фактора, а также потеря регенерационной способности в процессе культивирования каллусных клеток. Несомненно, проводить селекцию целесообразно на уровне одиночных клеток (суспензионная культура, протопласты). Однако для многих видов растений не разработаны эффективные технологии и способы культивирования одиночных клеток. Поэтому, несмотря на перечисленные выше недостатки использования каллусных культур, этот способ селекции остается для некоторых видов растений пока единственным.

Получение стабильно устойчивых линий – процесс длительный. Как правило, селекция начинается с получения достаточного количества каллусной массы из изолированных растительных эксплантов, использующейся в дальнейшем для определения концентрации селективного фактора (построение дозовой кривой), при которой наблюдается одновременно рост каллусной ткани, и в то же время часть каллусных колоний погибает. Выбранная концентрация селективного фактора признается оптимальной и используется в дальнейших экспериментах. Так как первично полученные на средах с селективными факторами колонии клеток могли возникнуть вследствие физиологической адаптации или определенного состояния дифференцировки клеток и не быть генетически устойчивыми, то в течение последующих 4–6 субкультивирований на селективной среде проверяется стабильность устойчивости полученных клонов. Затем их переносят на среду без селективного фактора и субкультивируют еще 2–3 пассажа. И только после повторного возвращения в селективные условия отбирают стабильные клоны, из которых пытаются получить растения-регенеранты. Однако работы, проведенные с получением растений, устойчивых к повышенным солям, а также к токсинам, выделенным из грибов–возбудителей болезней, показали, что устойчивость клетки и растения к исследуемому селективному фактору может совпадать и не совпадать. Прямая корреляция между устойчивостью растений и клеток in vitro отмечена лишь для низких температур, устойчивостью к гербицидам, высоким концентрациям алюминия и другим факторам.

Большое число работ по культивированию каллуса, с целью получения нового селекционного материала, проведено на пшенице, ячмене, рисе, сорго, а также на картофеле, томатах, люцерне и, крайне редко, на древесных. Уже достигнуты первые положительные результаты по получению растений пшеницы, риса, картофеля, устойчивых к NaCl или Na2S04. Получены клетки, а из них растения моркови, которые синтезируют в 20 раз больше метионина, в 30 раз – триптофана, в 5 раз – лизина путем добавления в питательную среду токсичных аналогов аминокислот. Для картофеля получены растения, устойчивые к кольцевой гнили. Что касается древесных, то для них работы в этом направлении крайне редки и часто имеют поисковый характер. Таким образом, использование каллусной культуры в селекционных целях открывает огромные возможности в создании новых форм растений, несущих ценные признаки, необходимые для человечества.

Наряду с перечисленными выше объектами (каллусная, суспензионная культура, изолированные протопласты), в качестве исходного материала для селекции могут быть использованы культуры соматических или андрогенных эмбриоидов, такие органогенные экспланты, как сегменты листьев или различные меристематические и стеблевые части растений, а также культура изолированных зародышей. Например, путем культивирования и селекции in vitro зародышей из семян получены растения ячменя, устойчивые к аналогам аминокислот, с улучшенным содержанием белка. Для картофеля разработан эффективный метод обработки побегов и черенков мутагеном, приводивший к получению химерных мутантов хлорофиллдефектности и антибиотикоустойчивости. При культивировании пыльников яровой пшеницы сорта Саратовская-29 и Москов-ская-35 на питательных средах с повышенным содержанием солей хлорида натрия получены соматические эмбриоиды, а в дальнейшем растения-регенеранты, проявившие повышенную солеустойчивость (Беккужина, 1993).

Таким образом, проведение селекции на клеточном уровне позволяет создавать новые формы растений в 2–4 раза быстрее по сравнению с традиционными способами селекции.

**3. Гибридизация соматических клеток**

Следующий метод клеточной селекции–создание неполовых гибридов путем слияния изолированных протопластов, полученных из соматических клеток. Этот метод позволяет скрещивать филогенетически отдаленные виды растений, которые невозможно скрестить обычным половым путем, вызывать слияние трех и более родительских клеток, получать асимметричные гибриды, несущие весь генный набор одного из родителей наряду с несколькими хромосомами или генами, или только органеллами и цитоплазмой другого. Гибридизация соматических клеток дает возможность не только соединить в одном ядре гены далеких видов растений, но и сочетать в гибридной клетке цитоплазматические гены партнеров.

**Выделение, культивирование и слияние изолированных протопластов.** Для применения методов соматической гибридизации необходима разработка соответствующих технологий получения протопластов, способных делиться и регенерировать растения. Выделение протопластов растительных клеток путем их плазмолизирования и механического разрушения клеточной стенки было осуществлено еще в конце прошлого века. Однако метод изолированных протопластов получил развитие лишь после того, как в 1960 г. И.К. Коккинг впервые осуществил ферментативное разрушение клеточной стенки и выделил голые протопласты.

В настоящее время продолжается разработка и совершенствование методов выделения и культивирования протопластов на искусственных питательных средах (рис. 1.15). Для культивирования протопластов применяют те же питательные среды, что и для культуры изолированных клеток и тканей. Отличительной чертой сред для протопластов является повышенное осмотическое давление на начальных этапах культивирования, которое обеспечивается высокой концентрацией маннита или СаС12.

В процессе культивирования изолированные протопласты регенерируют новую клеточную стенку и превращаются в клетки, способные делиться и давать начало образованию каллусной ткани. На формирование колоний протопластами влияет состав питательной среды. Дальнейшая задача – получение из каллусной ткани растений-реге-нерантов. Пока не удалось получить регенеранты из протопластов многих злаковых (пшеницы, ячменя). Однако успешно осуществляется регенерация из протопластов пасленовых (табак, картофель, томаты) и других культур.

Протопласты выделяют из каллусных, суспензионных клеток или из клеток листьев, меристем, стеблей. При выделении протопластов из листьев сначала удаляют эпидермис, лист нарезают на сегменты и затем подвергают энзиматической обработке пектиназой и целлюлозой (Приложение 2).

Слияние изолированных протопластов может происходить спонтанно, но довольно редко. Индуцированное слияние изолированных протопластов впервые было получено в лаборатории Коккинга в 1970 г. его сотрудниками Пауэром и др. В качестве индуктора они использовали нитрат натрия. Но этот метод оказался малоэффективным, и сейчас найдены другие фьюзогены (индукторы слияния). Наиболее эффективными из них оказались растворы с высоким рН (9–11) и высокой концентрацией ионов кальция (100–300 мМ). Протопласты предварительно агглютинируют с помощью концентрированных растворов полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1500–6000. У. Циммерман с сотрудниками. разработали физический метод слияния протопластов животных клеток, липосом, в котором в качестве индуктора использовались импульсы электрического тока.

Слияние протопластов приводит к образованию либо гибрида, либо цибрида (рис. 1.17). Цибридная клетка содержит цитоплазму обоих партнеров, а ядро – одного. Это возможно в том случае, если после слияния протопластов не происходит соединения ядер, и одно ядро дегенерирует. Образование цибрида возможно и в том случае, если один из протопластов лишен ядра или оно инактивировано путем облучения.

Цибридизация позволяет ввести цитоплазматические гены, несущие признаки ЦМС (цитоплазматической мужской стерильности), устойчивости к некоторым гербицидам и патогенам.

Первый неполовой межвидовой гибрид высших растений получен в 1972 г. путем слияния изолированных протопластов двух видов табака: Nicotiana glauca и N. Langsdorfii.

В настоящее время методом парасексуальной гибридизации получено большое число межвидовых, межсемейственных и межтрибных гибридов. Однако во многих случаях гибридные растения, полученные таким путем, в той или иной степени ненормальны. Примером может служить соматический гибрид между арабидопсисом и турнепсом, который является растением-монстром. Возникающие аномалии являются результатом хромосомной несбалансированности (Ю.Ю. Глеба, 1982).

Особый интерес представляют межцарственные клеточные гибриды, полученные от слияния протопластов растительных и животных клеток. Описаны гибриды между протопластами эритроцитов крысы и протопластами дрожжевых клеток, между протопластами моркови и человека, табака и человека и др.

При соматической гибридизации эксперимент строится аналогично опытам по генетике микроорганизмов. Иными словами, используются большие популяции клеток обоих родителей. При обработке смешанной суспензии протопластов фьюзогенами часть из них сливается друг с другом, но в суспензии остаются и неслившиеся протопласты. Все они, включая гибридные, вдальнейшем регенерируют клеточные стенки и переходят к делениям. Возникает задача – выделить из общей массы гибридные экземпляры. Селекция гибридов может применяться либо на клеточном уровне, либо на стадии регенерации и осуществляется несколькими методами.

Для идентификации гибридов могут служить пластиды. Например, при слиянии протопластов табака и моркови в качестве селективных маркеров использовались зеленые хлоропласты табака и красно-оранжевые хромопласты моркови.

Другим методом, позволяющим производить отбор гибридов, является генетическая комплементация. Этот метод был применен для обнаружения гибридов табака, при этом использовались хлорофиллдефектные мутации у родителей с последующей комплементацией в гибридных продуктах. Сочетание двух ядерных рецессивных мутаций у табака вызывает светоза-висимую хлорофилльную недостаточность. Растения, гомозиготные по любому из этих генов, выращиваемые при интенсивном освещении, обесцвечиваются и гибнут. После слияния и регенерации клеточные колонии пересаживают на среду, индуцирующую стеблевой органогенез, и культивируют на свету.

Под методом физиологической комплементации, который также используется для обнаружения соматических гибридов, подразумевают способность гибридных клеток жить и размножаться либо переходить к морфогенезу в условиях культуры, при которых родительские клетки этого делать не в состоянии, причем неспособность родительских клеток не связана с какой-нибудь определенной мутацией, а является нормальной физиологической реакцией клетки на физиологические условия. Например, половые гибриды между N. glauca и N. Langsdorfii имеют склонность к опухолеобразованию, а клетки гибридов в условиях in vitro способны расти и размножаться на питательных средах без гормонов. Гормононезависимость клеток гибрида и была положена в основу метода селекции. После индуцированного слияния протопластов из мезофилла листьев обоих видов табака клетки через некоторое время пересаживали на питательную среду, не содержащую фитогормонов, и отбирали колонии, способные расти в этих условиях. Существуют также другие методы селекции соматических гибридов: смешанная физиологогенетическая комплементация, физическое обогащение (метод основан на разделении протопластов при центрифугировании в связи с их различной плотностью), механическая изоляция.

Использование изолированных протопластов в селекции растений не ограничивается возможностью их индуцированного слияния и получения соматических гибридов. Изолированные протопласты способны поглощать из окружающей среды макромолекулы и органеллы, следовательно, в них можно вводить чужеродную информацию, не пересаживая ДНК или органеллы других клеток. Уже проведена успешная трансплантация изолированных ядер в протопласты петунии и табака. Вместе с тем поглощение протопластами чужеродных ядер не всегда ведет к образованию гибридов. Кроме ядер в изолированные протопласты удалось трансплантировать чужеродные хлоропласты. Из этих протопластов Карлсон получил растения-регенеранты, содержащие хлоропласты другого организма.

Однако работы по переносу чужеродных органелл и ДНК только начинают развиваться. В целом использование изолированных протопластов в генетической реконструкции клетки, как мы видим, открывает богатые перспективы перед клеточной селекцией.

**Литература**

1. Бутенко Р.Г. Культура клеток растений и биотехнология. – М.: Наука, 1986.
2. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений – М Наука, 1983.
3. Шевелуха B.C. Рост растений и его регуляция в онтогенезе. – М.: Колос, 1992.
4. Шевелуха В.С., Калашникова С.В., Дегтярев С.В. и др. Сельскохозяйственная биотехнология – М.: Высшая школа, 1998.