

Министерство образования и науки Украины
Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина
Биологический факультет
Кафедра молекулярной биологии и биотехнологии

Реферат по курсу: «Иммунобиотехнологии и получение клонов растений и животных»

По теме: «Микроклональное размножение деревянистых растений»

Выполнила:

Студентка 5 курса

Биологического факультета

Группы БМ-51

Потапова Валерия Игоревна

Харьков – 2018

Содержание

Оглавление

Введение	3
Микроклональное размножение растений	3
Преимущества микроклонального размножения	4
Области использования микроклонального размножения	4
Типы микроклонального размножения	6
Применение метода микроклонального размножения к древесным породам..	6
Значение метода микроклонального размножения для древесных пород.....	6
Первые работы по микроклональному культивированию древесных растений.....	7
Реювинилизация	8
Успехи в области микроклонального размножения, экономический эффект	12
Генетические отклонения.....	14
Выводы.....	15
Список использованной литературы:.....	16

Введение

Одно из существенных препятствий на пути внедрения нового сорта в практику – невозможность получения большого количества семян или посадочного материала для вегетативного размножения. Это препятствие устраняется с помощью биотехнологии, которая предлагает селекционерам эффективный и быстрый метод микроразмножения растений. Изучение процесса экспериментального морфогенеза *in vitro* на всех уровнях организации – от отдельной клетки до верхушки побега привело к созданию технологии клонального микроразмножения растений, которая в большинстве стран стала уже коммерческой. [1]

Микрклональное размножение растений

Микрклональное размножение – массовое бесполое размножение растений в культуре клеток и тканей, при котором возникшие формы растений генетически идентичны исходному экземпляру. Очень важно, что посадочный материал, получаемый этим методом, генетически идентичен давшему ему начало растению, он возникает из соматических клеток растений. При половом размножении потомство развивается из зиготы, образованной в результате слияния половых клеток двух разных особей. Эта зигота содержит гены как отцовского, так и материнского организма, поэтому потомство, возникающее в ходе полового размножения, не идентично одному какому-то родителю, а несет наследственные задатки обоих родителей. [1,2]

Преимущества микроклонального размножения

Преимущества микроклонального размножения в сравнении с традиционными методами:

- получение генетически однородного посадочного материала;
- оздоровление растений от грибных и бактериальных патогенов, вирусных, микоплазменных и нематодных инфекций;
- высокий коэффициент размножения: при клональном микроразмножении можно получить 100 000-1 000 000 клонов в год, тогда как при обычном – всего 5-100 за тот же срок;
- сокращение продолжительности селекционного процесса;
- размножение растений, трудно размножаемых традиционными способами;
- возможность проведения работ в течение года и экономия площадей, необходимых для выращивания посадочного материала.

В соответствии с количеством продукции технологии размножения *in vitro* можно разделить на мелкомасштабные и крупномасштабные. Это деление связано с целями и областями применения. [3,4]

Области использования микроклонального размножения

Микроклональное размножение используют:

- для быстрого получения больших количеств заведомо безвирусного материала (в основе этой технологии лежит метод, известный как

культура верхушечных меристематических тканей, это крупномасштабная технология);

- в селекции для поддержания и размножения небольшого числа отдельных генотипов (не требует больших масштабов);

- для быстрого размножения новых выведенных сортов (до нескольких тысяч растений в течение месяцев, тогда как при использовании традиционных методов уходит несколько лет);

- для размножения древесных растений, разведение и селекция которых осуществляется медленно вследствие длительности или отсутствия вегетативного размножения (многие из этих видов с большим трудом поддаются вегетативному размножению, а в некоторых случаях, например, для однодольных пальм и некоторых пород лесных деревьев, обычное вегетативное размножение вообще невозможно);

- для поддержания гетерозисных гибридов или других гетерозигот, расщепляющихся при скрещивании растений;

- для сохранения редких и исчезающих видов, например, женьшень, ареал которого находится на Дальнем Востоке (Китай, Корея, Россия), сохранился только в Китае на границе с Россией и в 3 районах России в количестве, достаточном для его спасения как вида.

Основоположником микроклонального размножения является французский ученый Жорж Морель. В 1960 г. он разработал этот метод для орхидей. В качестве экспланта Ж. Морель использовал верхушку цимбидиума (сем. орхидные), состоящую из конуса нарастания и двух-трех листовых зачатков, из которых при определенных условиях появлялись сферические образования – протокормы.[5-7]

Сформировавшиеся протокормы можно было делить и затем культивировать самостоятельно на вновь приготовленной питательной среде до образования листовых примордиев и корней. В результате им было обнаружено, что этот процесс бесконечен и можно получить в большом количестве высококачественный и генетически однородный, безвирусный посадочный материал.[7]

Типы микроклонального размножения

Микроклональное размножение можно производить разными способами.

Основные типы клонального микроразмножения:

- подавление апикального доминирования и развитие пазушных почек;
- микрочеренкование;
- образование микроклубней, микролуковиц;
- индукция возникновения адвентивных почек непосредственно тканями экспланта;
- получение каллусной ткани с последующей индукцией органогенеза или эмбриоидогенеза.[1,3]

Применение метода микроклонального размножения к древесным породам

Значение метода микроклонального размножения для древесных пород

Широкий круг древесных пород, произрастающих от тропиков до северных широт, имеет очень важное экономическое значение. Обычно процесс улучшения признаков этих культур происходит очень медленно. Это обусловлено длительностью жизненного цикла деревьев:

оборот сосновых лесов составляет 20-25 лет, промышленный оборот яблонь и других фруктовых деревьев – 20 лет и более, а плантаций масличной пальмы – еще больше. Взрослые деревья, отобранные по определенным признакам, размножают вегетативным путем. Часто это трудоемкий процесс, требующий много времени, а в некоторых случаях, например, для однодольных пальм, обычное вегетативное размножение вообще невозможно.[9-13]

Первые работы по микроклональному культивированию древесных растений

Первые работы по культуре тканей древесных растений были опубликованы в середине 20-х годов XX века и связаны с именем французского ученого Готре. В них сообщалось о способности камбиальных тканей некоторых видов вяза и сосны к каллусогенезу *in vitro*. В последующих работах 40-годов было выяснено о способности различных тканей вяза листового к образованию адвентивных почек. Однако дальнейший рост и формирование побегов авторами не были получены. Лишь к середине 60-х годов Матесу удалось получить первые растения - регенеранты осины, которые были доведены до почвенной культуры. Культивирование тканей хвойных пород *in vitro* долгое время являлось объектом исследования. Это было связано со специфическими трудностями культивирования ювенильных и тем более взрослых тканей, изолированных с растения. Известно, что древесные, и особенно хвойные, характеризуются медленным ростом, трудно укореняются, содержат большое количество вторичных соединений, которые в изолированных тканях окисляются различными фенолазами. В свою очередь, продукты окисления фенолов обычно

ингибируют деление и рост клеток, что ведет к гибели первичного экспланта или к уменьшению способности тканей древесных пород к регенерации адвентивных почек. Способность растения-донора к формированию адвентивных почек с возрастом постепенно исчезает полностью. Однако, не смотря на все трудности, ученые все чаще используют в качестве объектов исследований различные ткани и органы древесных растений. В настоящее время насчитывается более 200 видов древесных растений из 40 семейств, которые размножены *in vitro* (каштан, береза, клен, осина, сосна, ель, секвойя и др.).[13-17]

Методы размножения деревьев *in vitro* включают в себя культуру побегов с размножением пазушных или придаточных побегов, а также каллусную культуру с регенерацией побегов или эмбриоидов.[15]

Реювинилизация

Особое значение для вегетативного размножения древесных пород, как традиционными методами, так и в условиях *in vitro*, имеют ювенильные формы. Фаза роста растений после образования проростков называется ювенильной. Это фаза активного роста, часто характеризующаяся определенными морфологическими особенностями, такими как особая форма листьев, наличие шипов и неспособность к образованию цветков. В этой фазе вегетативное размножение обычно легко осуществимо. Ювенильное состояние продолжается несколько лет. В конце концов, дерево приобретает способность образовывать цветки, плоды и семена и вступает во взрослую фазу, характеризующуюся пониженной способностью к вегетативному размножению. Однако переход из ювенильной фазы, по-видимому,

обратим, и некоторые ткани взрослого дерева обладают определенными физиологическими свойствами, характерными для проростков, например, высокой способностью к образованию придаточных корней. Такие ткани описываются как реювенилизированные. [14, 18-20]

Для экспланта, полученного из взрослых деревьев, важное значение имеет физиологическое состояние исходной ткани. В Научно-исследовательском институте Ассоциации лес-целлюлоза во Франции показали, что экспланты взрослых лесных деревьев *in vitro* растут медленно или вообще не растут, если взяты из неомоложенных тканей. Реювенилизированные ткани могут возникать естественным путем, например, мощные побеги, обычно называемые «волчками», вырастающие прямо из корней или скопления придаточных почек. Реювенилизацию можно вызвать различными воздействиями:

прививкой побегов на проростки, обрезкой побегов, поддержанием высоких концентраций удобрений, вегетативным размножением или опрыскиванием цитокининами. [15,16]

В настоящее время реювенилизацию (омоложение) проводят несколькими способами:

- 1) многократная обработка растущего дерева или отдельных ветвей раствором цитокинина перед изоляцией экспланта;
- 2) повторное черенкование;
- 3) частая подрезка деревьев для индукции роста побегов непосредственно из ствола дерева или для стимуляции образования корневых отпрысков;
- 4) проведение повторных прививок;
- 5) путем серии субкультивирований *in vitro*;

б) создание густых насаждений, обеспечивающих боковое затенение, которое может стимулировать развитие спящих почек.[14]

Для омоложения тканей в сочетании с цитокининами можно использовать и другие регуляторы роста. Например, у некоторых видов отмечается повышенная реакция, когда с БАП применяют N-диметиламиноянтарную кислоту в небольшой концентрации. Обработывают *in vivo* все растущее дерево или его отдельные ветви. Срезанные ветви погружают в раствор цитокинина или цитокинин вводят непосредственно в сосудистую систему дерева, например, через конец срезанной ветки путем инъекции. Обработку проводят с интервалом 4-5 дней, так как более частые воздействия гормонами могут вызвать отравление растений. Регуляторы роста индуцируют образование почек или побегов, которые приобретают морфологию, сходную с морфологией молодых особей. Затем побеги или короткие отрезки стебля, содержащие почки, помещают на питательную среду *in vitro* для индукции роста почек и побегов. Впоследствии сформировавшиеся побеги переносят либо на среду для размножения, либо на среду для укоренения. На промежуточной стадии их помещают на среду, способствующую раскрытию вновь образовавшихся почек и развитию их в побеги.[14,17]

При культивировании экономически ценных деревьев, таких как фруктовые, также необходимо изолировать экспланты из реювинилизированных тканей. Так, для яблонь – наиболее часто культивируемых растений – размножение *in vitro* достигается легче, если начальные экспланты взяты из побегов молодых саженцев.

Для подвоя яблонь фенольные соединения улучшали образование и рост корней, а также существенно повышали выживаемость растений при пересадке в почву, причем в большей степени у культуры побегов, полученных из взрослых растений, чем из проростков. Культуры проростков, по-видимому, не нуждаются в фенольных соединениях. Очевидно, что влияние флороглюцина зависит от сорта и физиологического состояния тканей. Таким образом, действие флороглюцина можно рассматривать как фактор, ускоряющий процесс реювенилизации *in vitro*. [18]

При размножении деревьев через каллусную культуру используются те же подходы, что и при размножении травянистых растений. Крайне важно физиологическое состояние исходных эксплантов. Каллусы, полученные из семян и проростков, обладают наибольшей способностью к дифференцировке. Корни, побеги, эмбриониды и регенеранты образуются как раз из такого каллуса, хотя для довольно ограниченного числа голосеменных и покрытосеменных. Однако эти системы каллусов не так эффективны для быстрого размножения деревьев (особенно если каллусы получены из взрослых деревьев через реювенилизированную ткань), как соответствующие системы культуры побегов. Исключение составляют несколько видов кофейного дерева, которые размножаются с высокой частотой через эмбриониды, образуемые в каллусах из листовых эксплантов. Нуцеллярную ткань можно рассматривать как сильно омоложенную ткань взрослого дерева, и у цитрусовых образование эмбрионидов в каллусе, полученном из такой ткани, приводит к созданию настоящих клонов. [15-18]

Успехи в области микрклонального размножения, экономический эффект

Успехи, достигнутые в середине 70-х годов XX века в области вегетативного размножения масличной пальмы методом культуры тканей *in vitro* заслуживают особого внимания с точки зрения экономического значения. Мировое производство масла гвинейской масличной пальмы (которое экстрагируется из мякоти плодов и идет на приготовление пищевого масла и маргарина) и масла капустной пальмы (экстрагируемого из косточек плодов и используемого для производства мыла, детергентов и косметики) в 1980-1981 гг. достигло 4,9 млн. т, а в 2005 мировое производство пальмового масла составило около 47 млн.т. Масличная пальма вышла на второе место среди масличных культур, уступая только сое.[13,16,18]

Культура гвинейской масличной пальмы получила широкое распространение в 1960-1980 гг. В 1980 г. плантации данного вида занимали несколько миллионов гектаров во влажных тропиках Африки, Америки и Юго-Восточной Азии. Масличная пальма, живущая сто и более лет, становится малопродуктивной, как только дерево достигает высоты, при которой плоды нельзя достать с земли орудием, снабженным ручкой. В культуре масличные пальмы начинают плодоносить на пятый год жизни, в целом эксплуатационный период длится 20-25 лет после прорастания. Таким образом, плантации должны обновляться каждые 25-28 лет, что требует миллионов проростков.

С другой стороны, масличная пальма, имеющая на одном растении мужские и женские цветы, принадлежит к перекрестноопыляемым растениям, что обеспечивает высокую степень изменчивости при

образовании потомства. Скрещивание позволило отобрать формы с большим выходом масла. Были получены растения, которые давали 4 т масла с 1 га в год по сравнению с 1 т с га в год у обычных растений. Поскольку усовершенствование растений методом скрещивания сопряжено с большими затратами времени и требуют не менее 10 лет, усилия исследователей были направлены на вегетативное клонирование высокопродуктивных растений. Однако масличная пальма не образует побегов и боковых ростков в природных условиях, так что использование небольших ростков из ее стебля с целью размножения исключено. Ученым пришлось обратиться к культуре ткани *in vitro*. В опытах с масличной пальмой размножение микрочеренкованием оказалось невозможным, в результате от культивирования меристемы пришлось отказаться. Английские и французские исследователи решили получить каллусы из самых молодых листьев с верхушки дерева без повреждения меристемы верхушечной почки.[18]

В первой культуральной среде каллусы развивались в течение 90 дней. При 2-ой и 3-ей пересадке начинали возникать эмбриониды. В течение месяца число эмбрионидов увеличивалось в 3 раза так, что примерно из 10 эмбрионидов за год можно было получить потомство более 500 000 растений. Авторы сообщали, что эмбрионидогенез больше зависел от природы начального экспланта, чем от последующих условий культивирования. Пятая культуральная среда давала возможность эмбриоидам развиваться в проростки с листочками, 6-ая и 7-ая индуцировали рост корней. Развитие растений от стадии эмбриоида до стадии проростков высотой 12 см происходило за 3 месяца.

На опытной станции (республика Кот-д'Ивуар) метод клонирования для получения проростков стали применять в промышленном масштабе

с 1981 г. Более высокая стоимость клонированного материала обуславливает дополнительные капиталовложения, составляющие 7-12% от общей стоимости плантации, использующей семенную рассаду. Однако при таком способе размножения происходит увеличение производства масла на 20-30% в год, что позволяет значительно быстрее окупить вложенные средства. Проростки и взрослые финиковые пальмы также были размножены с помощью эмбриоидов, полученных из каллусов. Используемые методы были аналогичными тем, что применяли при размножении гвинейской масличной пальмы.[16,18]

Генетические отклонения

Информация о генетических отклонениях у деревьев, размноженных *in vitro*, ограничена, поскольку большинство таких деревьев остается на лабораторной стадии развития. Что касается организованных меристем побегов, они, по-видимому, генетически стабильны. Так, каллус из нуцеллуса цитрусовых состоял почти целиком из маленьких меристематических клеток, а растения-регенеранты были генетически однотипны. Более того, этот каллус адаптировался и не требовал присутствия высоких концентраций регуляторов роста в питательной среде, что также могло внести вклад в генетическую стабильность. Каллусы гвинейской пальмы тоже, по-видимому, были генетически стабильны, так как растения, регенерированные из эмбриоидов, были одинаковыми. Такая низкая изменчивость деревьев, размножаемых *in vitro*, показывает, что генетические отклонения не являются основной проблемой, по крайней мере, для некоторых видов.[15]

Клональное микроразмножение деревьев рассматривают как рентабельное лишь для быстрого размножения новых сортов и в тех случаях, когда количество исходного материнского материала ограничено. Однако в связи с успехами в этой области владельцев питомников все более интересует возможная финансовая выгода от использования методов *in vitro* для размножения деревьев.[17]

Выводы

Омоложение в процессе микроклонального размножения фруктовых деревьев не приводит к запаздыванию цветения, как можно было ожидать, если бы растения обладали всеми свойствами проростков. Полученные самоукореняющиеся деревья, могут быть использованы, как и традиционно размножаемые деревья, для прививки на подвои. Размножение *in vitro* необходимо главным образом для повышения продуктивности деревьев, завязывающих мало семян. Наиболее важной областью применения считают массовое производство элитных взрослых растений, что приводит к значительному повышению продуктивности лесов.

Список использованной литературы:

1. Клональное микроразмножение растений: Учебно-методическое пособие / О.А. Тимофеева, Ю.Ю. Невмержицкая. – Казань: Казанский университет, 2012. – 56 с.
2. Бабикова А.В., Горпенченко Т.Ю., Журавлев Ю.Н. Растение как объект биотехнологии // Комаровские чтения. – 2007. – Вып. LV. – С. 184-211.
3. Биология культивируемых клеток и биотехнология растений / Бутенко Р.Г.[и др.]; под ред. Р.Г.Бутенко. – М.: Наука, 1991. – 278 с.
4. Культура клеток растений и биотехнология / Бутенко Р.Г.[и др.]; под ред. Р.Г.Бутенко. – М.: Наука, 1986. – 286 с.
5. Дитченко Т.И., Спиридович Е. В., Желдакова Р. А. Культура клеток, тканей и органов растений: курс лекций. - Минск: БГУ, 2007. – 107 с.
6. Егорова, Т.А., Клунова С.М., Живухина Е.А. Основы биотехнологии. – М.: «Академия», 2003. – 208 с.
7. Загоскина И.В., Назаренко Л.В., Калашникова Е.А., Живухина Е.А. Биотехнология: теория и практика. Учеб.пособие. - М.: Изд. Оникс, 2009.- 496 с.
8. Калинин Ф.Л., Кушнир Г.П., Сарнацкая В.В. Технология микрклонального размножения растений. – Киев: Наукова думка, 1992. – 232 с.
9. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В.В., Полищук В.Е. Методы культуры ткани в физиологии и биохимии растений. – Киев: Наукова думка, 1980. – 488 с.
10. Картель Н.А., Кильчевский А.В. Биотехнология в растениеводстве. – Минск: Тэхналогія, 2005. – 310 с.

11. Катаева Н.В., Бутенко Р.Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 96 с.
12. Квеситадзе Г.И., Безбородов А.М. Введение в биотехнологию. – М.: Наука, 2002. – 283 с.
13. Лутова Л. А. Биотехнология высших растений. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2010. – 240 с.
14. Новикова Т.И., Набиева А.Ю., Полубоярова Т.В. Сохранение редких и полезных растений в коллекции *in vitro* Центрального сибирского Ботанического сада // Вестник ВОГиС. – 2008. – Том 12, № 4. – С. 564-572.
15. Першина Л.А. Культивирование изолированных клеток и тканей высших растений. – Новосибирск: НГУ, 2000. – 46 с.
16. Родин А.Р., Калашникова Е.А. Использование методов клеточной и генной инженерии для получения посадочного материала древесных пород. – М.: МГУЛ, 1993. – 90 с.
17. Филиппова И.П. Адвентивное почкообразование и каллусогенез у сибирских видов хвойных в культуре *in vitro*. Автореф. дис. ... к-та биол. наук. – Красноярск, 2010. – 23 с.
18. Черевченко Т.М., Лаврентьева А.Н., Иванников Р.В. Биотехнология тропических и субтропических растений *in vitro* – Киев: Наукова думка, 2008. – 559 с.