

# Калусна культура *in vitro*

- ▶ Визначення
- ▶ Етапи отримання калусної культури
- ▶ ФГ регуляція, роль ауксинів в індукції первинного калусогенезу
- ▶ Морфологічна характеристика калусних культур
- ▶ Гетерогенність калусної культури



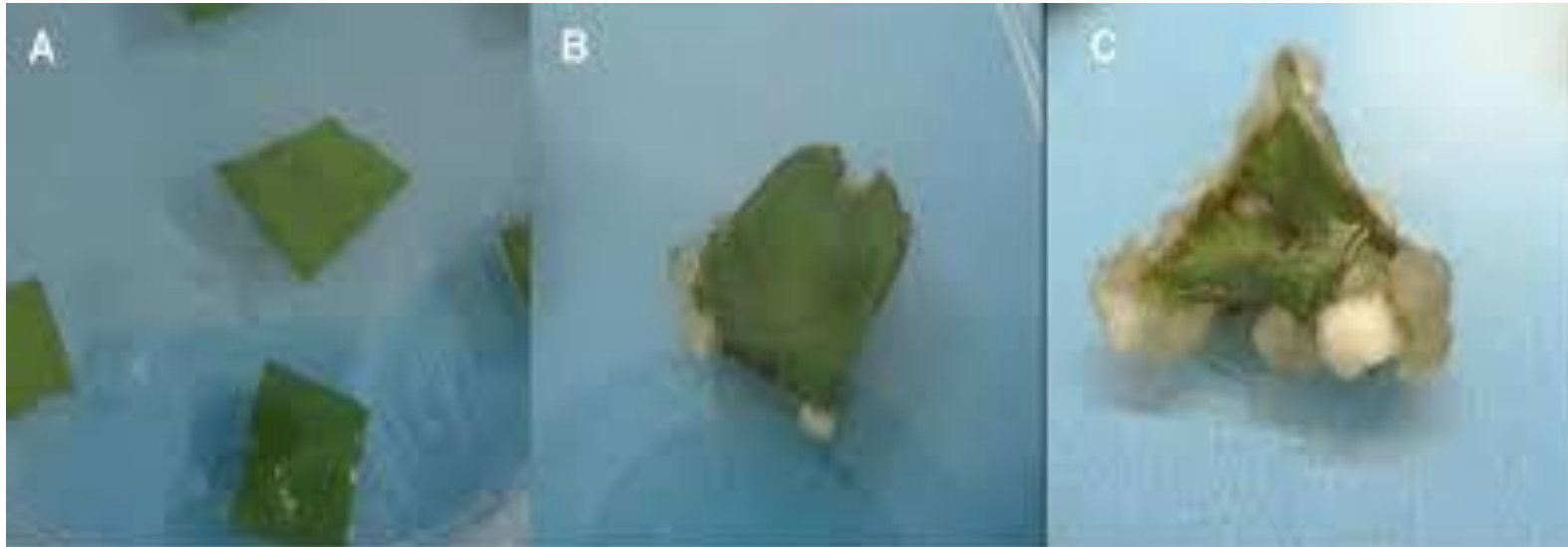
# Калус - *in vivo* та *in vitro*

- ▶ *in vivo* - група клітин, що виникає при травмах і захищає місце поранення
- ▶ *in vitro* - тканина, що складається з дедифференційованих клітин, що характеризується постійним неорганізованим ростом і проліферацією

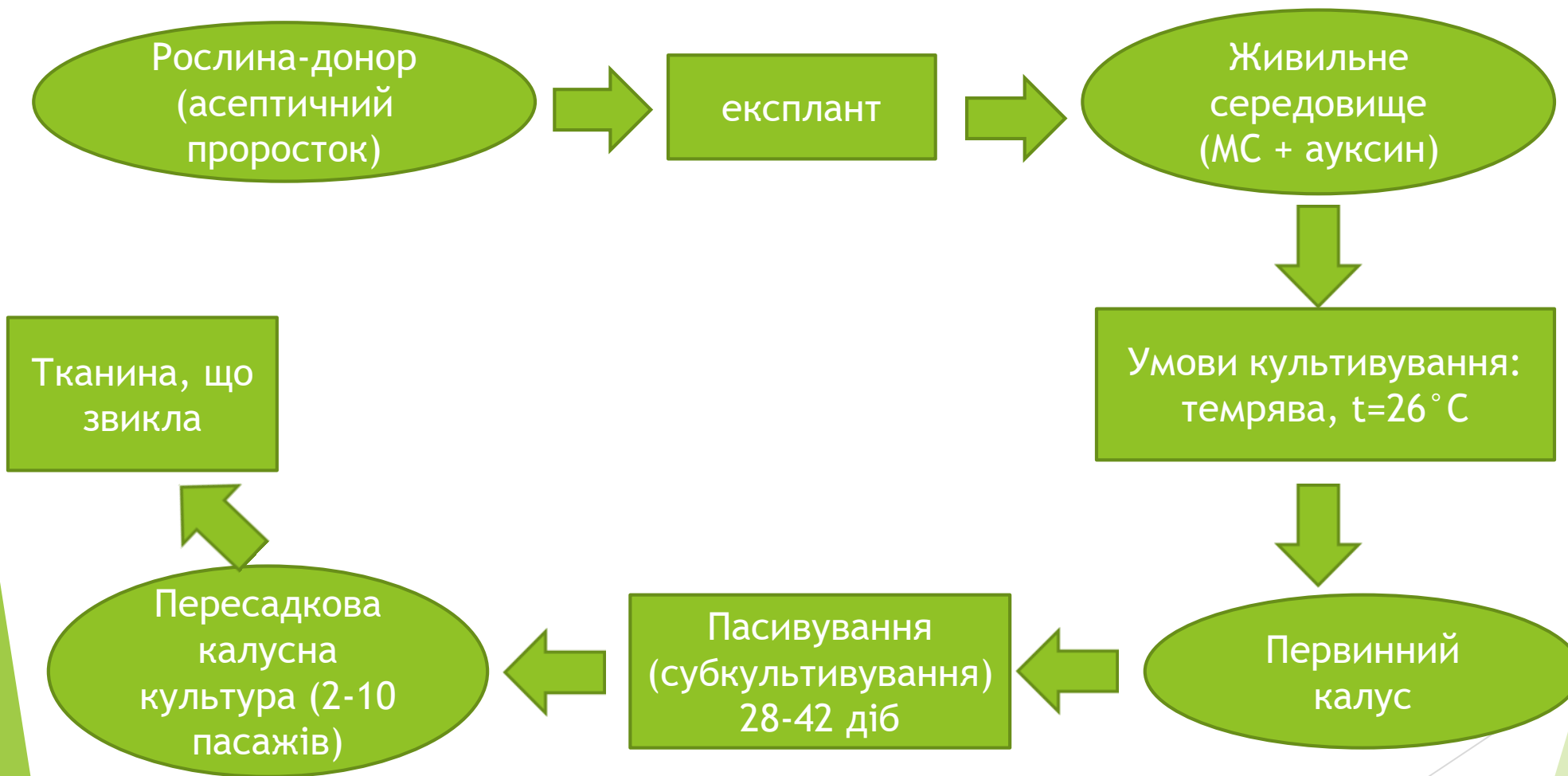


# Індукція калусогенезу

- ▶ Експлант - будь-який орган рослини  
(Тип тканини, розмір, фізіологічна полярність і т.д.)
- ▶ Живильне середовище культивування - високий вміст ауксинів  
(природних або синтетичних)
- ▶ Культивування - поверхневе на агаризованому середовищі  
(періодичне пасивування 28-36 діб)

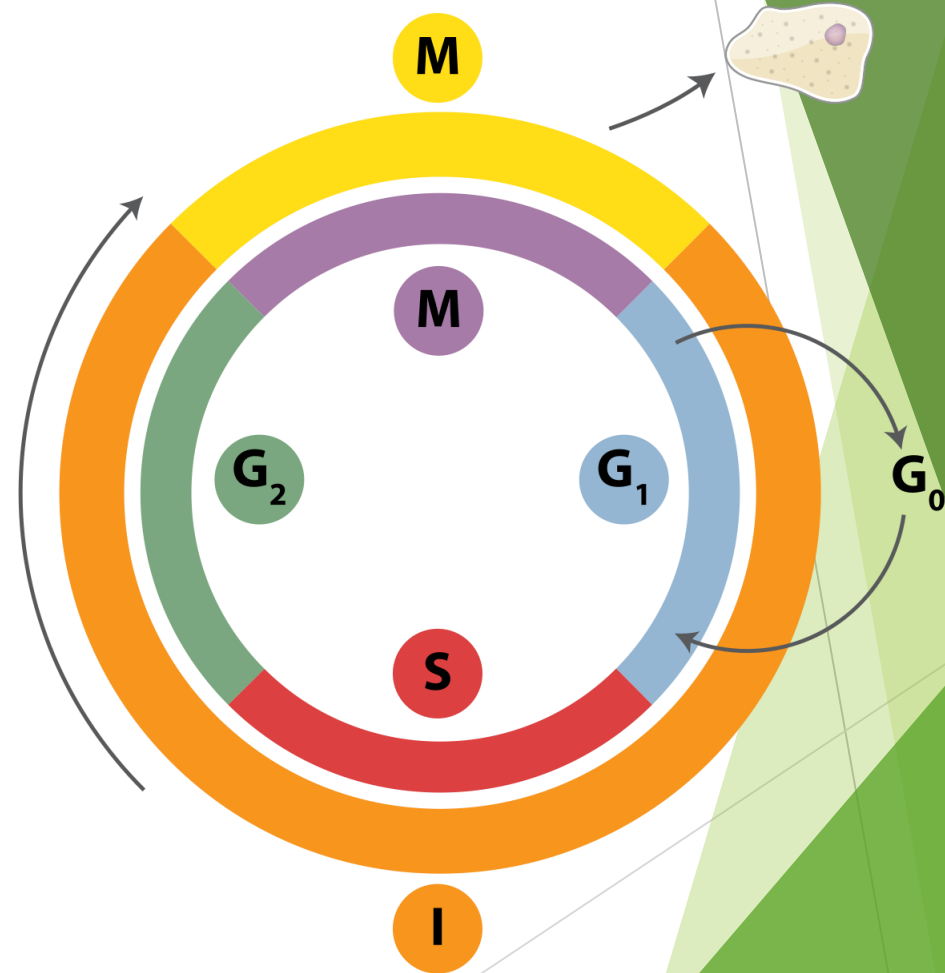


# Загальна схема утворення калусної культури *in vitro*



# Роль фітогормонів в індукції калусогенезу

- ▶ Індукція калусогенезу - активація клітинних поділів під дією фітогормонів
- ▶ У рослинних клітин існує подвійний гормональний контроль поділу: ауксин готує клітину до поділу, який потім запускається цитокініном
- ▶ Ауксини необхідні для переходу спеціалізованої клітини з фази G1 в S-фазу клітинного циклу, цитокініни - для проходження наступних фаз: G2, M і цитокінеза



# Роль ауксинів в індукції калусогенезу -

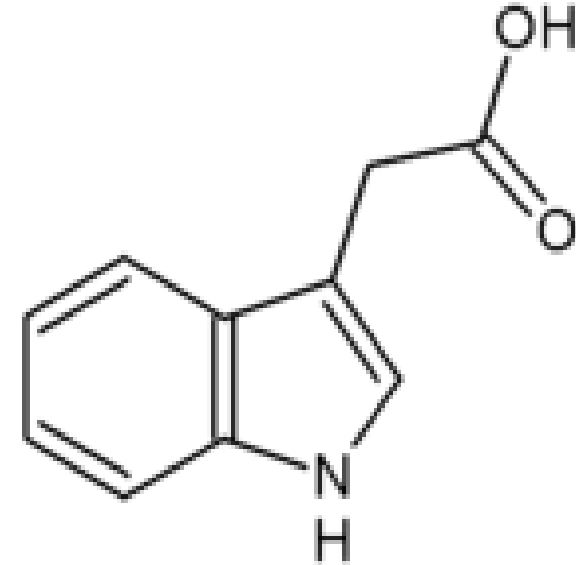
ІОК активує процеси поділу рослинних клітин та ріст «розтягненням»

## Поділ клітин

- ▶ ІОК скорочує тривалість періодів МЦ: S- періода, G1- періода
- ▶ ІОК стимулює синтез та накопичення РНК (р-РНК та і-РНК)
- ▶ ІОК стимулює синтез загальних білків та синтез білків *de novo*
- ▶ ІОК стимулює окислювальну та фосфорильовальну активність мітохондрій, що підсилює енергетичне та субстратне забезпечення процесів синтезу РНК, білків, реплікації ДНК та мітозів загалом

## Ріст «розтягненням»

- ▶ ІОК зв'язується з специфічними рецепторами мембран
- ▶ ІОК активую роботу H<sup>+</sup> помпи плазмалеми
- ▶ ІОК активую кислі гідролази
- ▶ ІОК стимулює синтез полісахаридів клітинної оболонки



індол-3-оцтова кислота  
(гетероауксин)

# Ауксини

▶ Природний (нативний) ауксин

Гетероауксин - ІОК

В-індолілоцтова кислота

Синтетичні ауксини:

2,4 Д -

2,4- дихлорфеноксиоцтова кислота

НОК -  $\alpha$ - нафтилоцтова кислота

ІМК - індоліл-3-масляна кислота

- ▶ Функції ауксинів в культурі *in vitro*:
- ▶ індукція каллусогенезу, поділу і розтягування клітин калусних і суспензійних культур;
- ▶ індукції ембріогенезу (2,4-Д);
- ▶ стимуляція утворення коренів (ризогенез);
- ▶ в поєднанні з іншими фітогормонами формування у протопластів клітинних стінок;
- ▶ культивування пиляків (злакові)



# Морфологічна характеристика калусних тканин

- ▶ Калусні культури класифікують за багатьма критеріями:
- ▶ Щільністю
- ▶ Забарвленням
- ▶ Інтенсивністю (швидкістю) зростання
- ▶ Ступенем гетерогенності клітинної популяції
- ▶ морфологією
- ▶ Біосинтетичними властивостями
- ▶ Морфогенетичним потенціалом





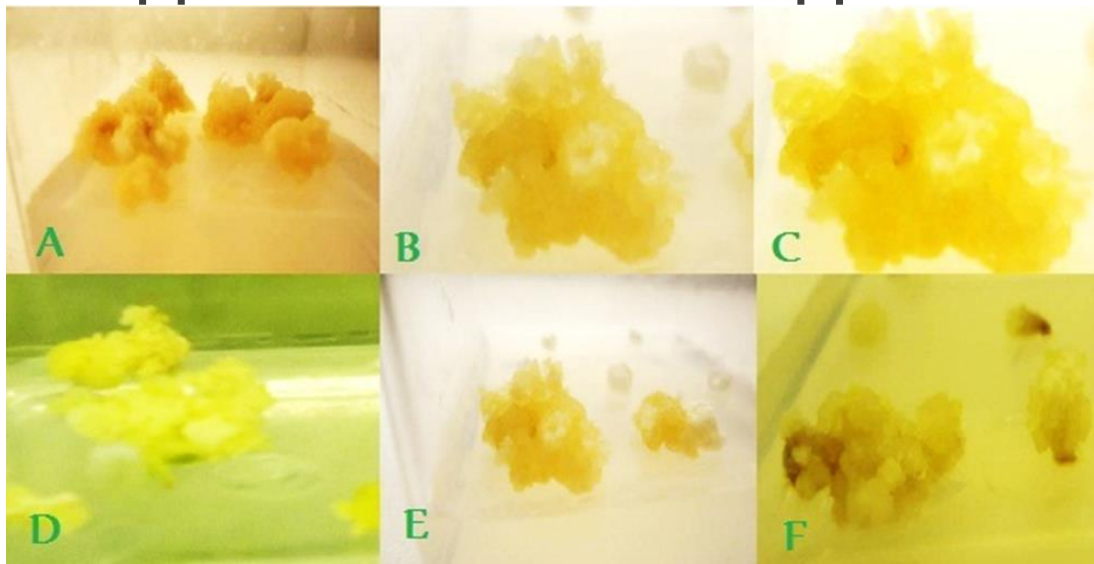
# Типи калусів за щільністю

- ▶ Пухкі, сильно оводнені, легко розпадаються на окремі клітини
- ▶ Середньої щільності, з добре вираженими меристематичними зонами
- ▶ Щільні, з зонами камбію та провідними елементами (трахеїдами)



# Аналіз росту калусних тканин

- ▶ Збільшення сирої / сухої маси
- ▶ Збільшення площі калуса
- ▶ Підрахунок числа клітин на одиницю маси (метод Брауна)
- ▶ Вміст легкокорозчинного білка
- ▶ Середня маса однієї клітини і т.д.



# Особливості калусних клітин

Зберігають фізіологічні риси, властиві вихідним клітинам :

- ❑ синтез вторинних метаболітів;
- ❑ фотоперіодична реакція
- ❑ стійкість до дії стресора і т.д.

З'являються нові властивості :

- ▶ генетична гетерогенність
- ▶ фізіологічна асинхронність
- ▶ не здатність до фотосинтезу
- ▶ синтез нових білків



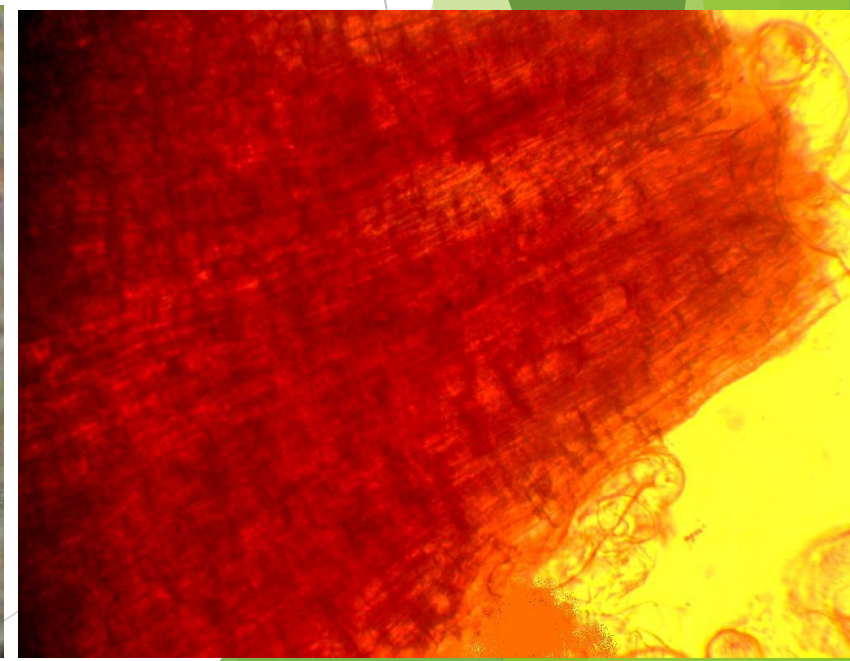
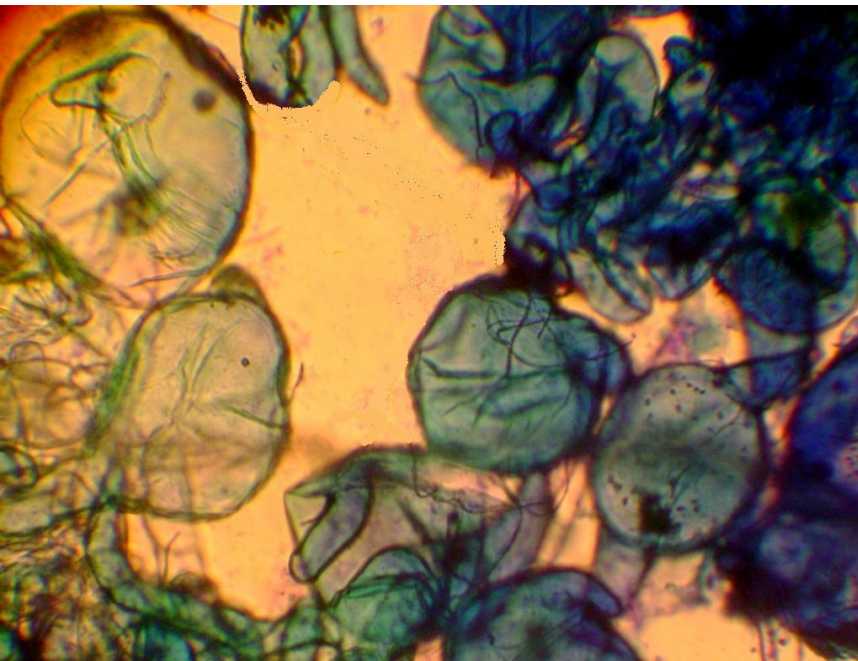
# Клітини каллюсної тканини пшениці





# Типи клітин каллусної тканини

- ▶ Дрібні - формують меристематичні осередки (зони)
- ▶ Типові - великі, сильно вакуолізовані з тонкою оболонкою
- ▶ Диференційовані елементи провідної системи - трахеї (судини)



# Гетерогенність калусної культури

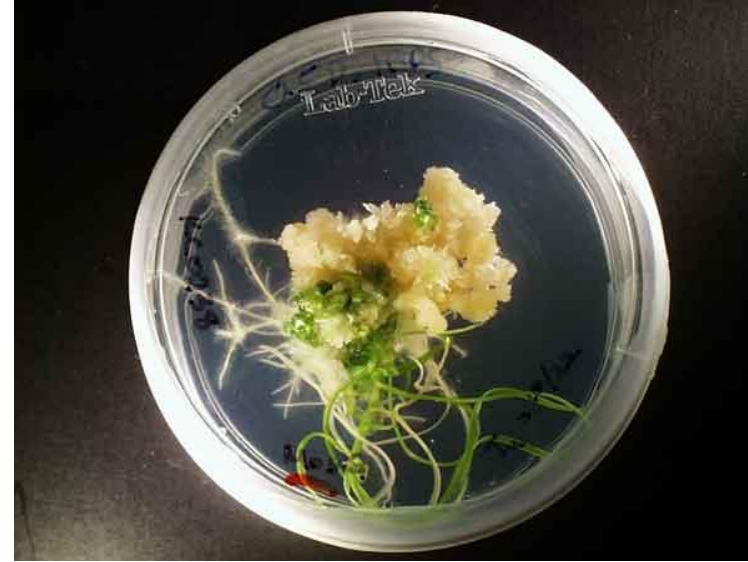
- ▶ Генетична гетерогенність (гаплоїдія, поліплоїдія, анеуплоїдія)
- ▶ Фізіологічна гетерогенність (вік, форма, функція)
- ▶ Мітотична асінхронність
- ▶ Головні причина - гетерогенність клітин експланту та умови культивування





# Морфогенетичний потенціал

- ▶ Калуси з високим морфогенним потенціалом - матові, компактні, структуровані, мають хлорофілвмісні ділянки
- ▶ Каллюс з низьким морфогенним потенціалом - пухкі, не мають глобулярного характеру





Морфогенний калюс пшениці







Ризогенний калус пшениці



**Диференціація** - комплекс процесів, які призводять до відмінностей між клітинами

**Компетенція** - здатність клітини сприймати індукуючий вплив сигналу та специфічно реагувати зміною програми розвитку

**Детермінація** - це процес визначення подальшого шляху розвитку клітин

**Дедиференціровка** - втрата спеціалізації, перехід спеціалізованих клітин до проліферації та неорганізованого росту калусу

**Вторинна диференціація (редиференціація)** - здатність клітини, яка втратила специфічні властивості знову їх формувати



# Суспензійна культура



# Суспензійна культура

- ▶ План лекції:
- ▶ Визначення, термінологія
- ▶ Переваги
- ▶ Отримання
- ▶ Типи суспензій
- ▶ Крива росту
- ▶ Параметри
- ▶ Характеристика
- ▶ Культивування
- ▶ Використання





# Культура клітинних суспензій

- ▶ Суспензійна культура - це поодинокі клітини, дрібні, середні або великі агрегати (групи клітин), що культивуються у завислому стані в рідкому живильному середовищі при постійній аерації за асептичних умов



# Переваги суспензійної культури

- ▶ Суспензійні культури мають переваги в порівнянні з *калусною* тканиною, яку вирощують на агаризованій поверхні:
- ▶ ширші можливості для вивчення впливу екзогенних факторів на метаболізм і ріст клітинних популяцій, оскільки клітини в однаковій мірі стають доступними для зовнішнього впливу;
- ▶ надійне тривале підтримання лінії внаслідок простоти процесів субкультивування;
- ▶ зручність для проведення біохімічних і молекулярно-біологічних досліджень, а також швидкої регенерації рослин;
- ▶ можливість необмеженого набору біомаси для отримання БАР

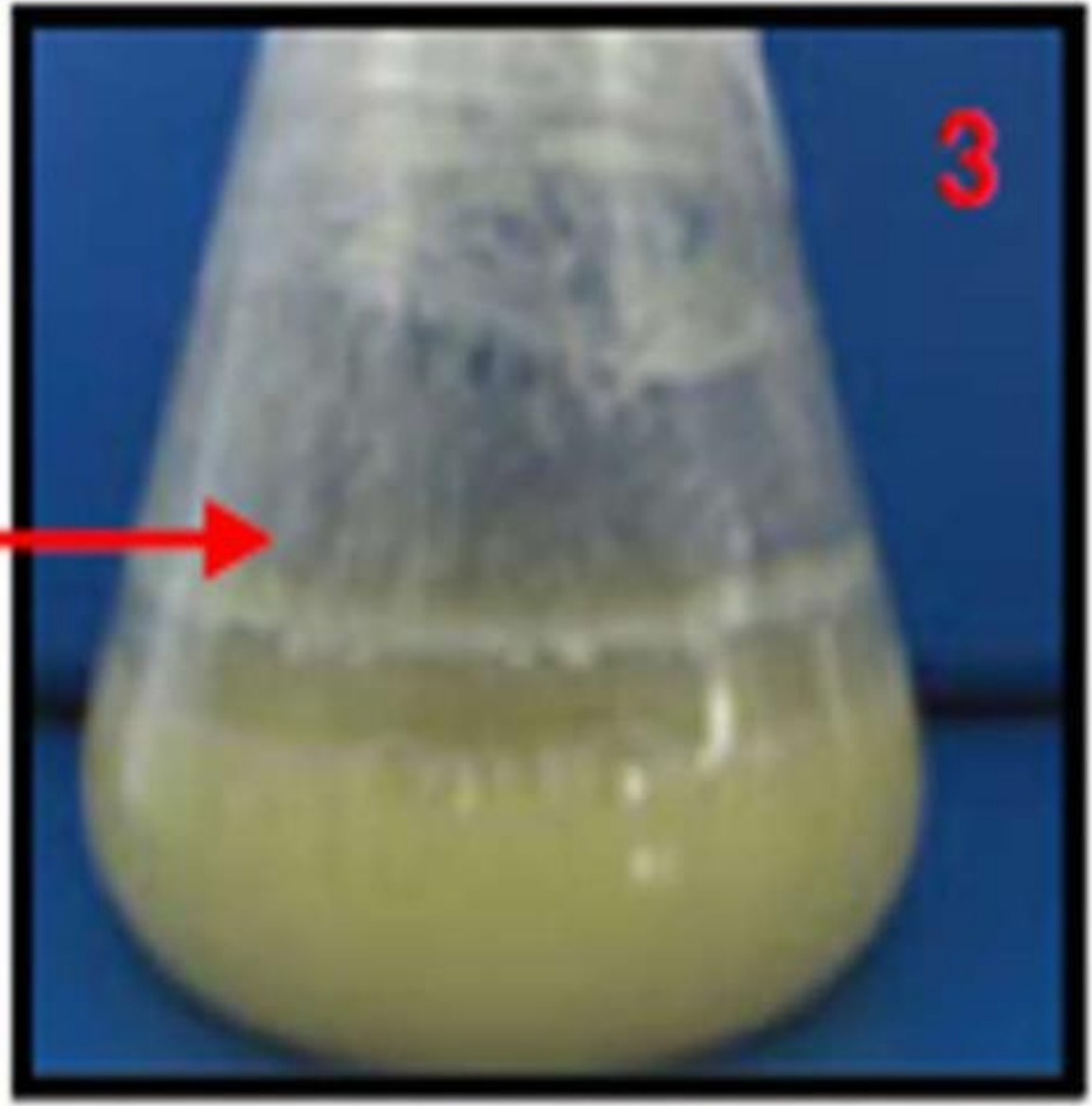
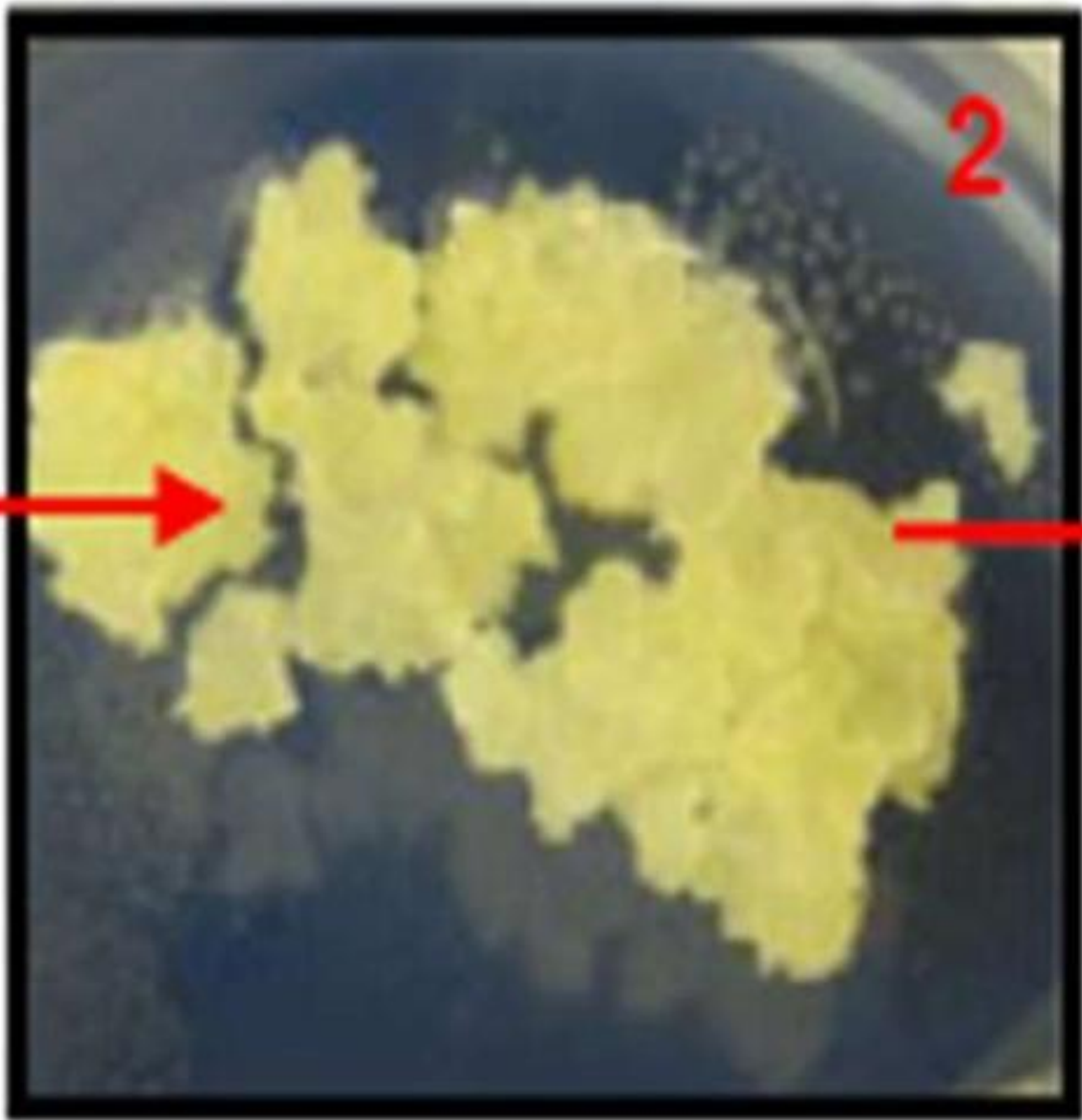
# Отримання суспензійної культури

- ▶ Джерело - пухка калусна тканина  
2-3 г калюса 60-100 мл рідкого живильного середовища (того ж складу; збільшення ауксинів)
- ▶ З тканини експлантів інтактної рослини (рідко) + фермент пектиназа
- ▶ Необхідна умова культивування - постійне перемішування  
(100-120 об/хв)



# Отримання первинної суспензійної культури

- ▶ Утворення первинної суспензії рослинних клітин можна вважати результатом трьох процесів:
- ▶ 1) розпад калусних тканин на клітини і невеликі клітинні агрегати в момент внесення в рідке живильне середовище;
- ▶ 2) відділення клітин і клітинних агрегатів з поверхні шматочків тканини протягом перших субкультивувань;
- ▶ 3) поділ і ріст клітин, що утворилися за першими двома способами, і розпаду клітинних агрегатів на більш дрібні агрегати і клітини.
- ▶ Останній процес є типовим для зростання стабілізованої субкультивованої культури клітин вищих рослин





# Суспензійні культури пшениці (*Triticum aestivum* L.) і сої (*Glycine max* (L.) Merr.



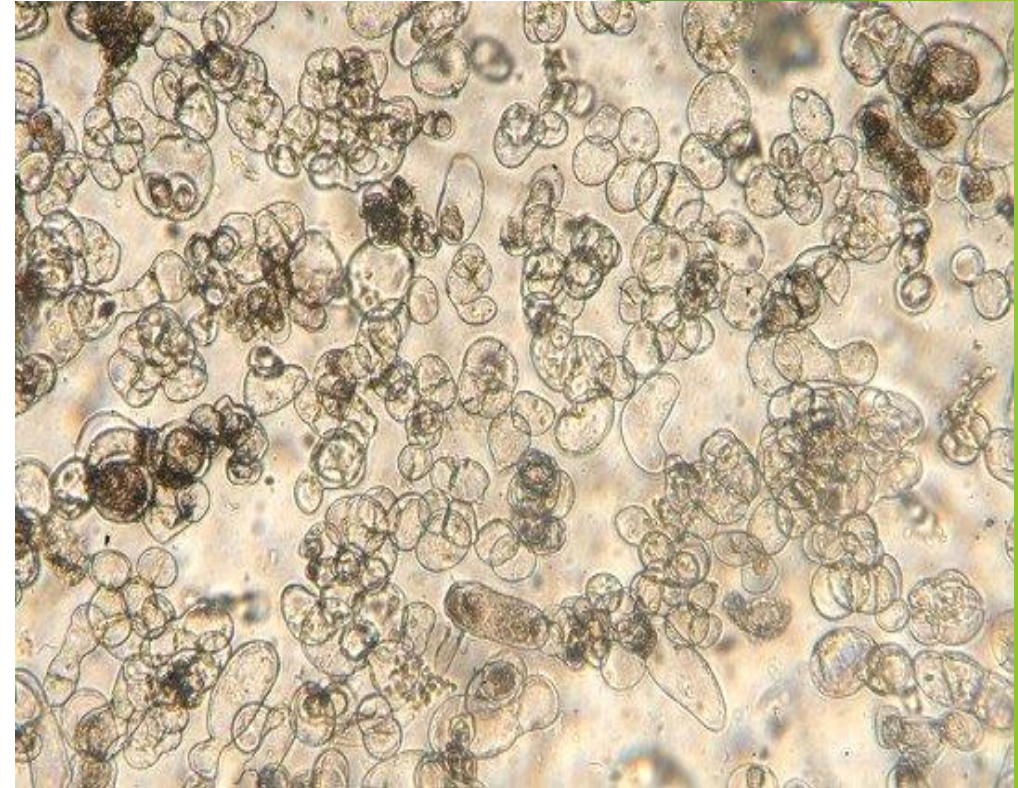


# Характеристика суспензійної культури

- ▶ Типові калюсні клітини
- ▶ Висока швидкість розмноження
- ▶ Високий ступінь дезагрегації
- ▶ Морфологічна однорідність клітин (невеликі розміри, сферична або овальна форма, щільна цитоплазма)
- ▶ Відсутність трахеїдоподібних елементів

# Типи суспензійних культур

- ▶ Слабко агреговані:  
(Складаються з поодиноких клітин (40%) і дрібних агрегатів (60%), агрегати не повинні містити більше 10-12 клітин)
- ▶ Середньо агреговані:  
(Складаються з поодиноких клітин (40%), дрібних агрегатів (40%) і великих агрегатів (20%))
- ▶ Високо агреговані:  
(Складаються з дрібних (40%) і великих агрегатів (60%))



# Крива росту клітинної суспензії

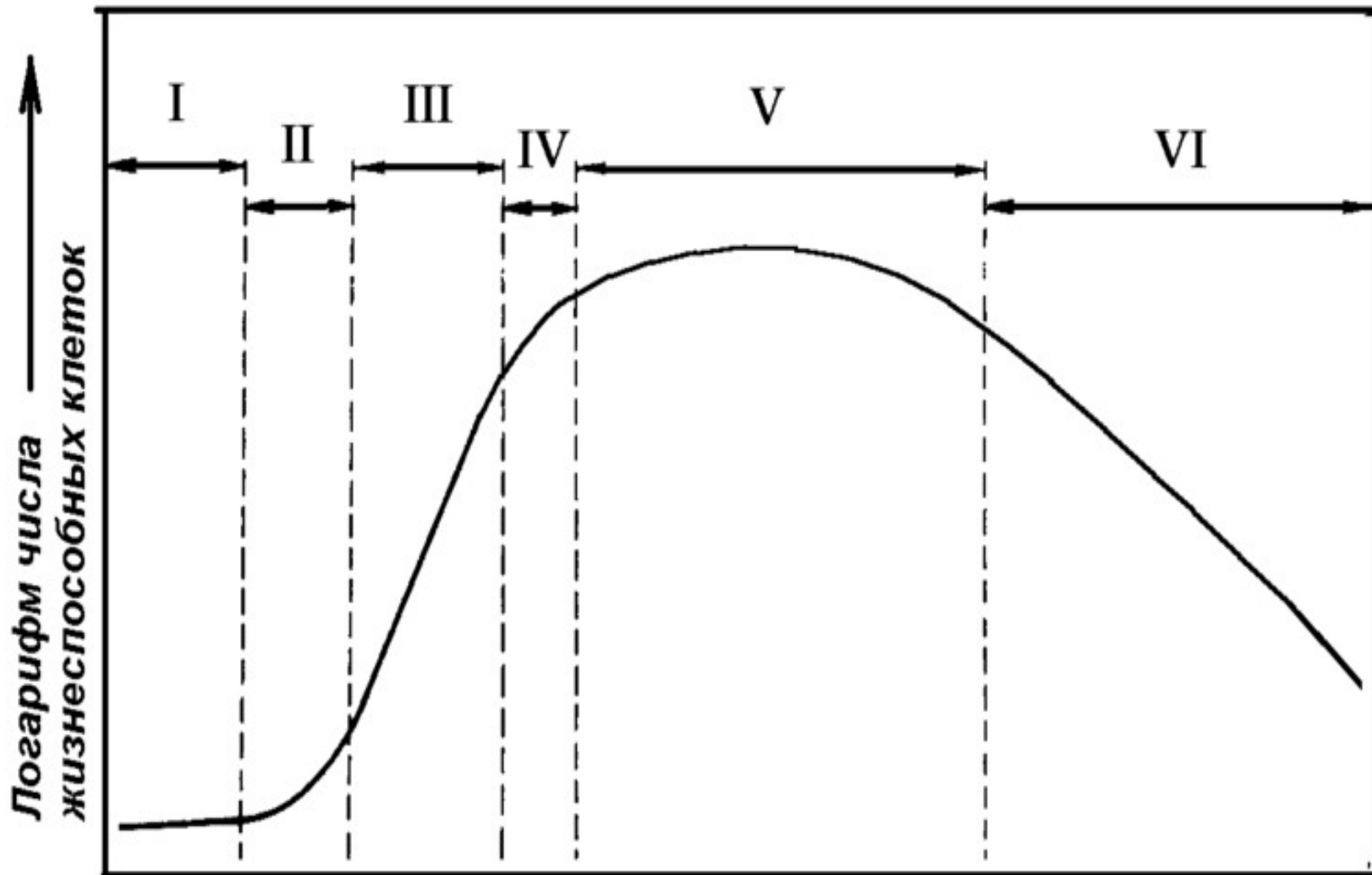


Рис. Фази кривої росту популяції рослинних клітин:

I - лаг-фаза,

II - експоненціальна фаза,

III - фаза лінійного зростання,

IV - фаза уповільненого зростання,

V - стаціонарна фаза,

VI - фаза відмирання

## **1) (лаг) фаза**

Видиме зростання інокулята не спостерігається ні по одному з критеріїв. При цьому спостерігається висока інтенсивність дихання, поглинання води і поживних речовин, максимальні значення енергетичного рівня, інтенсивний синтез ДНК, РНК, білків та інших компонентів клітини, але низький мітотичний рівень. Тривалість періоду адаптації залежить від кількості і фізіологічного стану інокулята і умов культивування.

## **2) експонентну фаза**

Характеризується зростанням з максимальною швидкістю, максимальними величинами мітотичної активності, а також переважанням дрібних клітин меристематичного типу. Можна виділити ранню і пізню експоненціальні фази. Протягом ранньої спостерігається ряд цитологічних змін: в клітинах зникає велика вакуоль, відбувається збільшення обсягу цитоплазми, числа рибосом і мітохондрій. Активується клітинний метаболізм. У пізній експоненціальній фазі спостерігається уповільнення клітинного поділу, але збільшення розміру клітин.

## **3) фазу уповільнення зростання**

Пов'язана з субстратним обмеженням і пригніченням продуктами обміну, характеризується незбалансованим зростанням популяції за основними критеріями, зниженням рівня дихання, переходом частини клітин в диференційований стан, збільшенням частки великих вакуолізованих клітин. Збільшується синтез вторинних метаболітів (серцевих глікозидів, антрахінона, диосгеніна та ін.)

#### **4) стаціонарна фаза**

Характеризується ще малою швидкістю деградації клітин, яка врівноважується поділом клітин, високими біосинтетичними і біотрансформаційним потенціями життєздатних дифференційованих клітин, низьким рівнем дихання і появою надзвичайно великих вакуолізованих клітин.

До цього періоду суспензійна культура досягає максимуму сухого ваги. В середньому від початку культивування до стаціонарної фази проходить 21-28 діб.

#### **5) фазу деградації клітин**

Характеризується питомою швидкістю росту, що приймає негативне значення.

Форма реальних ростових кривих може значно відрізнитися тривалістю фаз від модельної. Процеси ростового циклу визначаються видом рослини, кількістю внесеного матеріалу і умовами культивування (склад живильного середовища, температура, початкове значення рН, склад газової фази, швидкість перемішування).

# Параметри суспензійної культури

- ▶ ООК - обсяг осаджених клітин
- ▶ Число клітин на мл суспензії - щільність (камера Фукса-Розенталя, камера Гаряєва)
- ▶ Сира / суха біомаса
- ▶ Вміст білку
- ▶ Ступінь агрегованості суспензії
- ▶ Ступінь життєздатності клітин суспензії



# Способи культивування

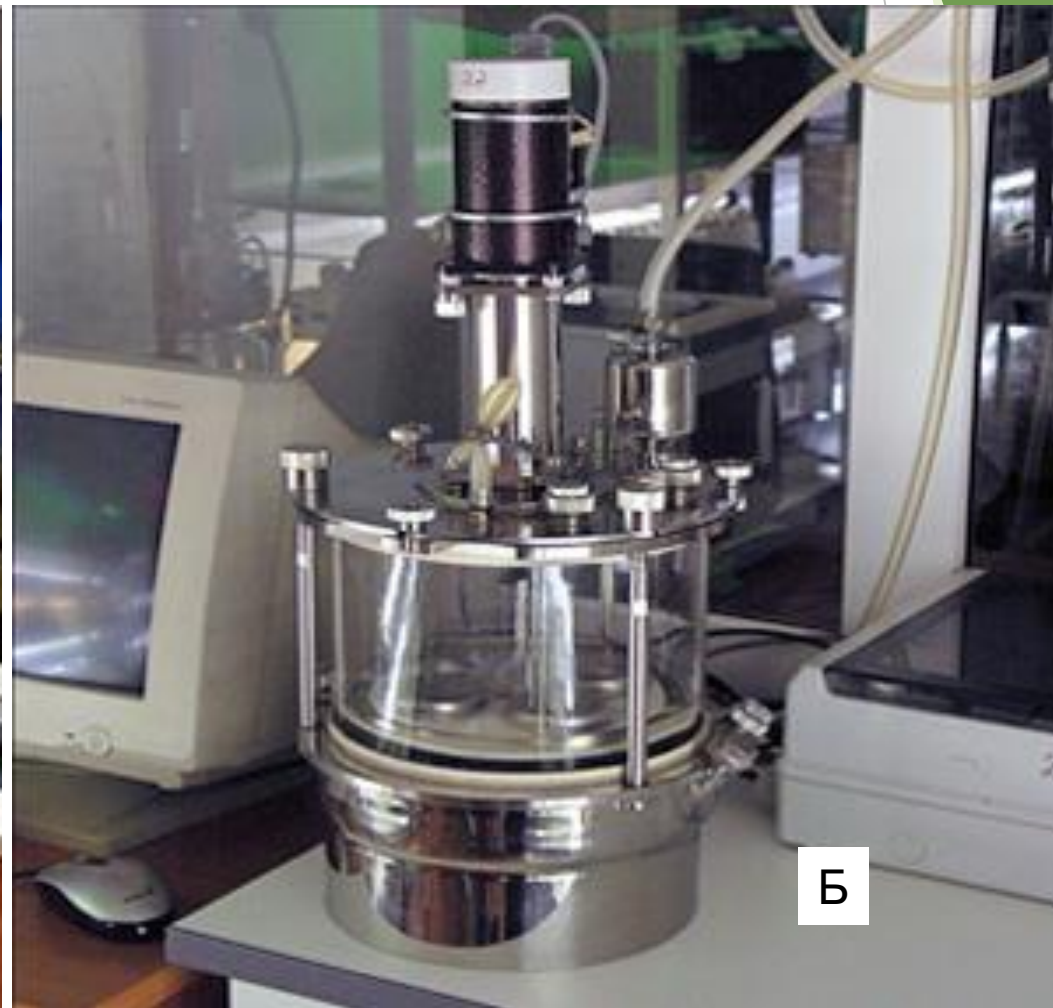
- ▶ закриті системи накопичувальне (періодичне) культивування - на гойдалках ротаційного або шейкерного типу



- ▶ Відкриті системи - безперервне культивування проточного типу в культиваторах або ферментерах



Закрите культивування суспензійної культури  
(А - колби Ерленмейра багаторусні платформні шейкери) і відкрите  
культивування (Б - лабораторний біореактор)



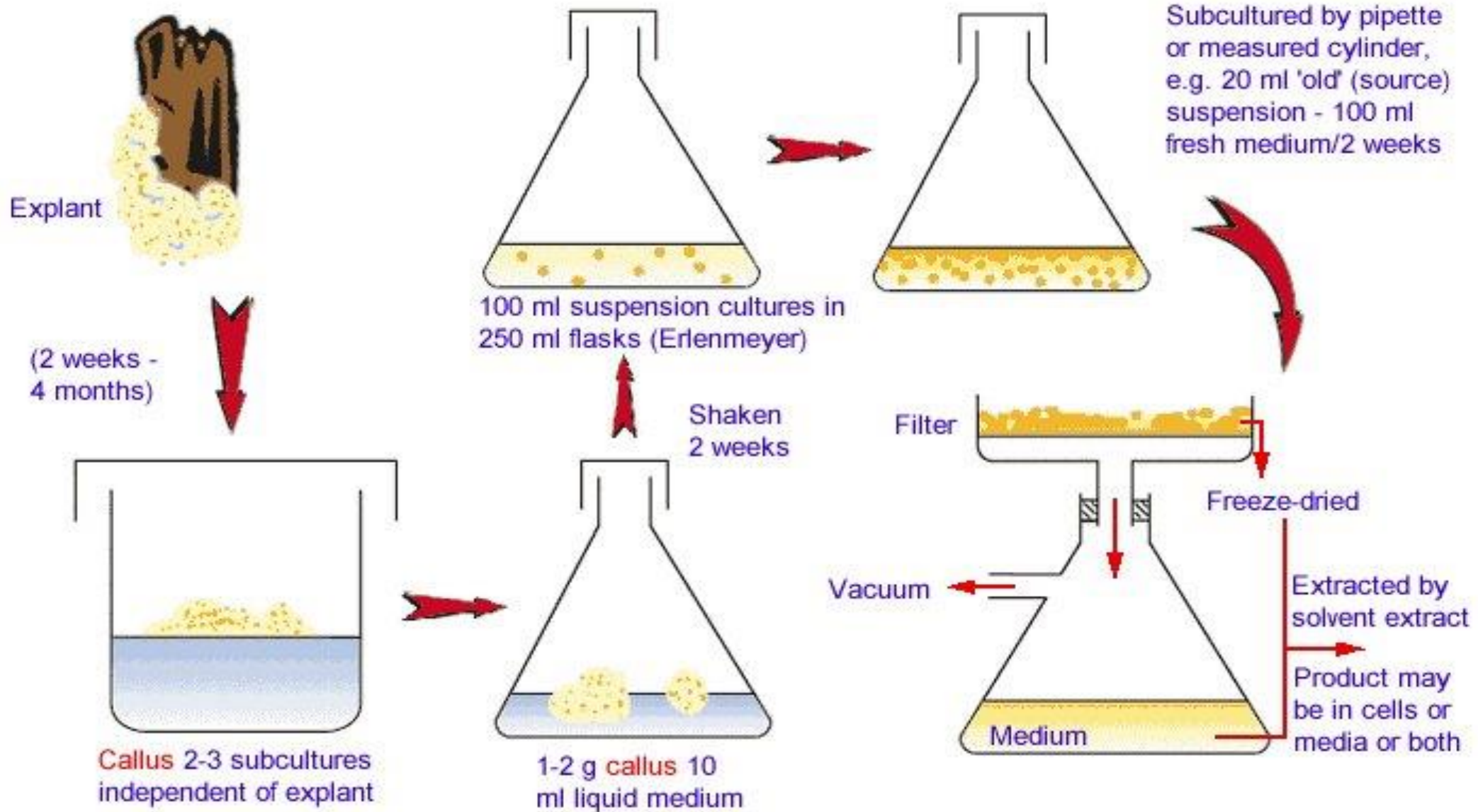


# Використання суспензійних культур

- ▶ Отримання вторинних метаболітів (стаціонарна фаза росту)
- ▶ Нарощування біомаси (логарифмічна фаза зростання)
- ▶ Клітинна селекція
- ▶ Отримання культури ізольованих протопластів
- ▶ Суспензійні культури найбільш часто використовують для промислового отримання вторинних метаболітів. Речовини, які продукують рослинними клітинами, застосовуються в медицині, парфумерній промисловості, рослинництві та інших галузях промисловості. До них відносяться: алкалоїди, терпеноїди, глікозиди, поліфеноли, полісахариди, ефірні масла, пігменти, антиканцерогени (птеростігмін, харрінгтонін), пептиди (інгібітори фітовірусів).



# Plant Cell Culture



Procedure for obtaining **digoxin** from cell suspension of *Digitalis lanata*

# Культура поодиноких клітин (поодиноких клонів)

- ▶ План лекції
- ▶ Отримання
- ▶ Способи культивування
- ▶ Метод культури «няньки»
- ▶ метод шару, що годує
- ▶ Метод Плейтинга
- ▶ Метод мікрокраплі
- ▶ Фактор «кондиціювання»
- ▶ Використання культур поодиноких клітин

# Отримання культури поодиноких клітин

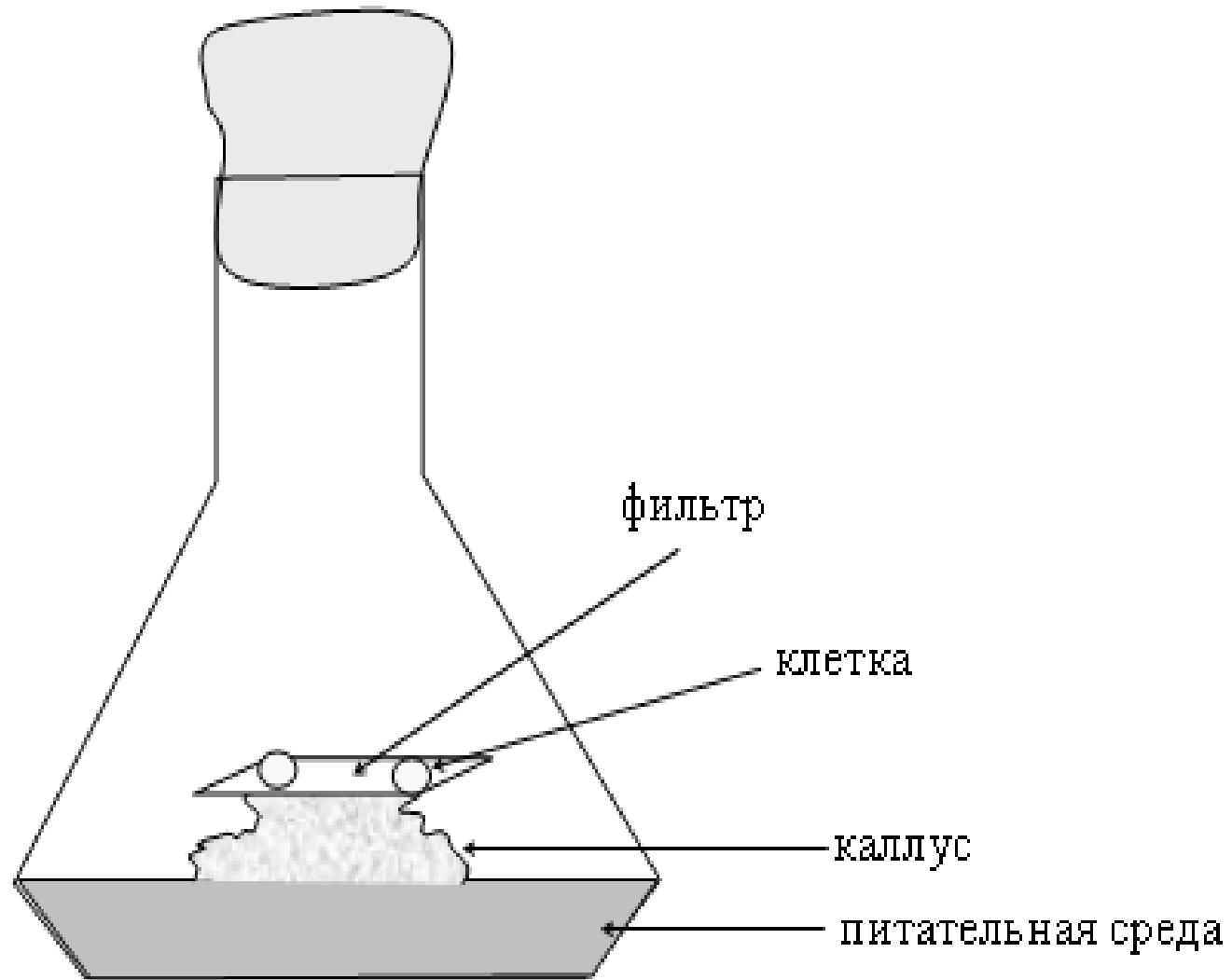
- ▶ Етапи створення культури:
  - ▶ Ізолювання поодиноких життєздатних клітин
  - ▶ Створення сприятливих умов для поділу і росту
- ▶ джерела:
  - ▶ суспензійна культура
  - ▶ пухкий каллюс
  - ▶ Мацерована тканина інтактної рослини
  - ▶ Ізольовані протопласти (після регенерації клітинної стінки)



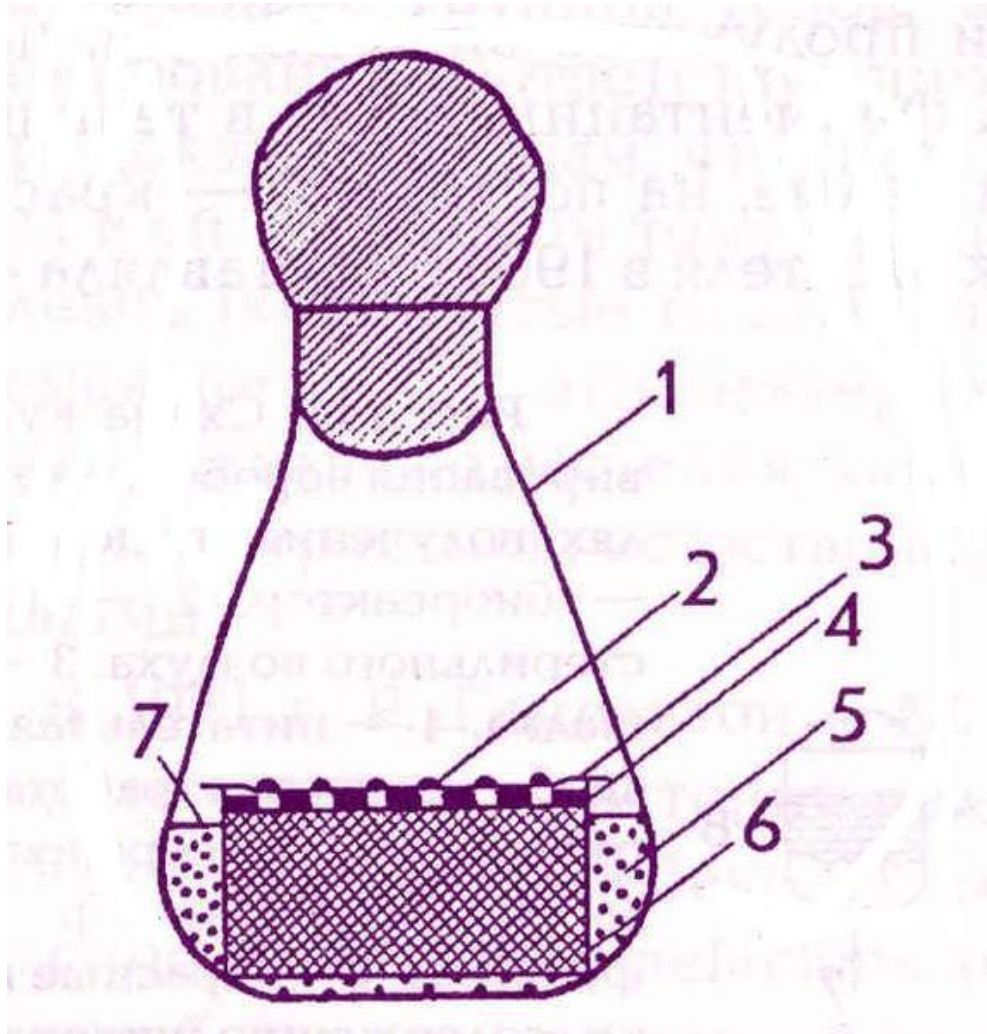
# Способи культивування поодиноких клітин

- ▶ Метод культури-няньки  
(тканини «няньки»)
- ▶ Метод «шару, що годує»
- ▶ Метод Плейтінга
- ▶ Метод мікрокраплі
- ▶ Метод мікрокамери

# Метод культуры-няньки (тканини «няньки»)



# Метод шару, що годує



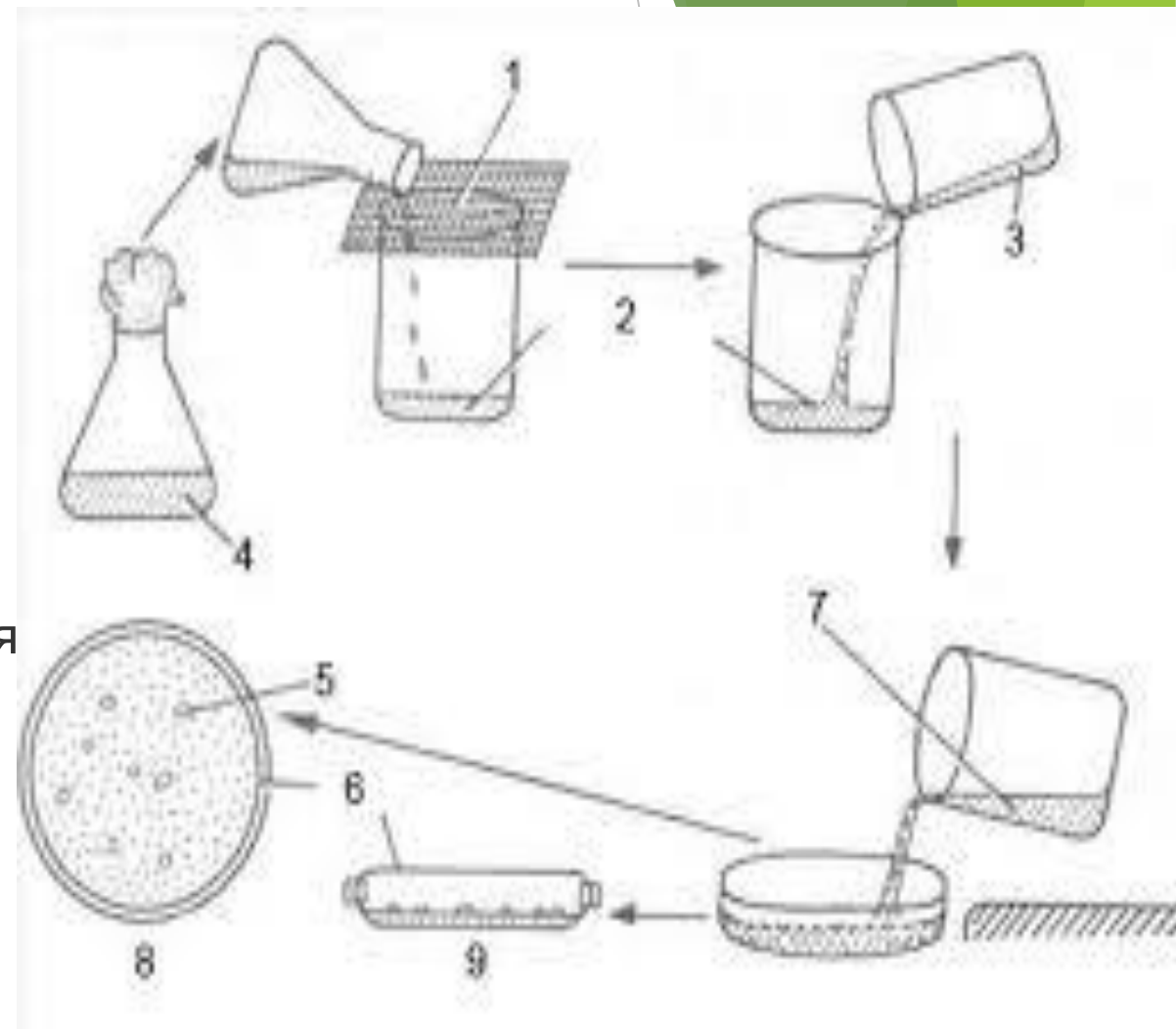
- ▶ РИС. Використання «шару, що годує» (суспензійна культура) при вирощуванні колоній з поодиноких клітин:
- ▶ 1 - колба,
- ▶ 2 - колонія, що виникла з окремої клітини,
- ▶ 3 - фільтрувальний папір,
- ▶ 4 - металева сітка,
- ▶ 5 - суспензія клітин «шару, що годує»,
- ▶ 6 - підкладка (пінополіуретан),
- ▶ 7 - живильне середовище



# Метод Плейтинга

Метод Плейтинга був розроблений для масового культивування окремих ізольованих клітин. У 1959 р він запропонував наступну схему:

- Профільтрувати суспензійну культуру (в його експериментах це були тютюн і квасоля) стерильно через один шар батисту (осередки 0,3x0,1 мм). В результаті отримували суспензію, на 90% складається з окремих клітин.
- Цю суспензію змішували з живильним середовищем того ж складу, що використовувався при культивуванні суспензії (середовище містило 0,6% агару).
- Суміш розливали тонким шаром (1 мм) в чашки Петрі. Агар розподіляв клітини, але не перешкоджав обміну хімічними сигналами між ними, а товщина шару дозволяла спостерігати за їх поведінкою під мікроскопом.



# Метод мікрокраплі (Ю.Ю. Глеба)

- ▶ Метод мікрокультури (мікрокрапель) базується на використанні дуже малих обсягів дуже багатою живильного середовища, наприклад, середовища Као-Михайлюк
- ▶ При цьому обсяг середовища, в яку поміщаються клітини, повинен був мінімальним (мікрокраплі об'ємом до 20 мкл)
- ▶ Однак навіть при дотриманні всіх цих умов відсоток клітин, що активно проліферують залишається низьким. Метод запропонував академік Ю.Ю. Гліба. У мікрокраплі зручно спостерігати за отриманням і поділом клітин за соматичної гібридизації

# Фактор «кондиціонування»

- ▶ Поодинокі клітини можна «змусити» ділитися:
- ▶ 1) збільшуючи число клітин, що виробляють фактор кондиціонування, щоб він не розсіювався в великих обсягах живильного середовища;
- ▶ 2) зменшуючи обсяг середовища, що містить фактор кондиціонування, в якому буде вирощуватися клітина



# «Фактор кондиціонування»

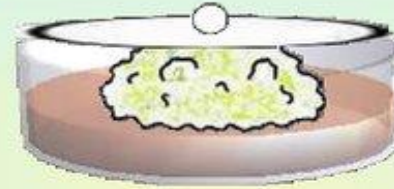
- ▶ Речовина, що стимулюють поділ окремих клітин - природа і механізм дії невідомі !!!
- ▶ Характеристики:
  - ▶ - мол.масса - 700 Д
  - ▶ - термолабилен
  - ▶ - водорозчинний
  - ▶ - низкомолекулярний
  - ▶ - видоспеціфічен
  - ▶ - не замінюється відомими фітогормонами
  - ▶ - синергічен з брасиностероїдами

# Використання культури поодиноких клітин

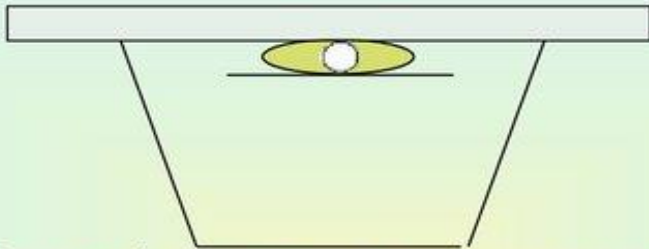
- ▶ Для вивчення фізіологічної і генетичної стабільності і \ або мінливості
- ▶ Клітинна (клонової) селекція мутантних, гібридних і трансформованих ліній
- ▶ Модель для порівняння процесів в тканини і ізольованій клітині
- ▶ Для вивчення стимулів до поділу - «фактора кондиціонування»

# Разработка методов культивирования единичных клеток in vitro

## 1. Метод культуры-няньки автор: Р. Г. Бутенко



*На активно растущий каллус помещают фильтровальную бумагу с единичной клеткой на ней*



*На предметное стекло с лункой наносят каплю питательной среды и в каплю помещают единичную клетку.*

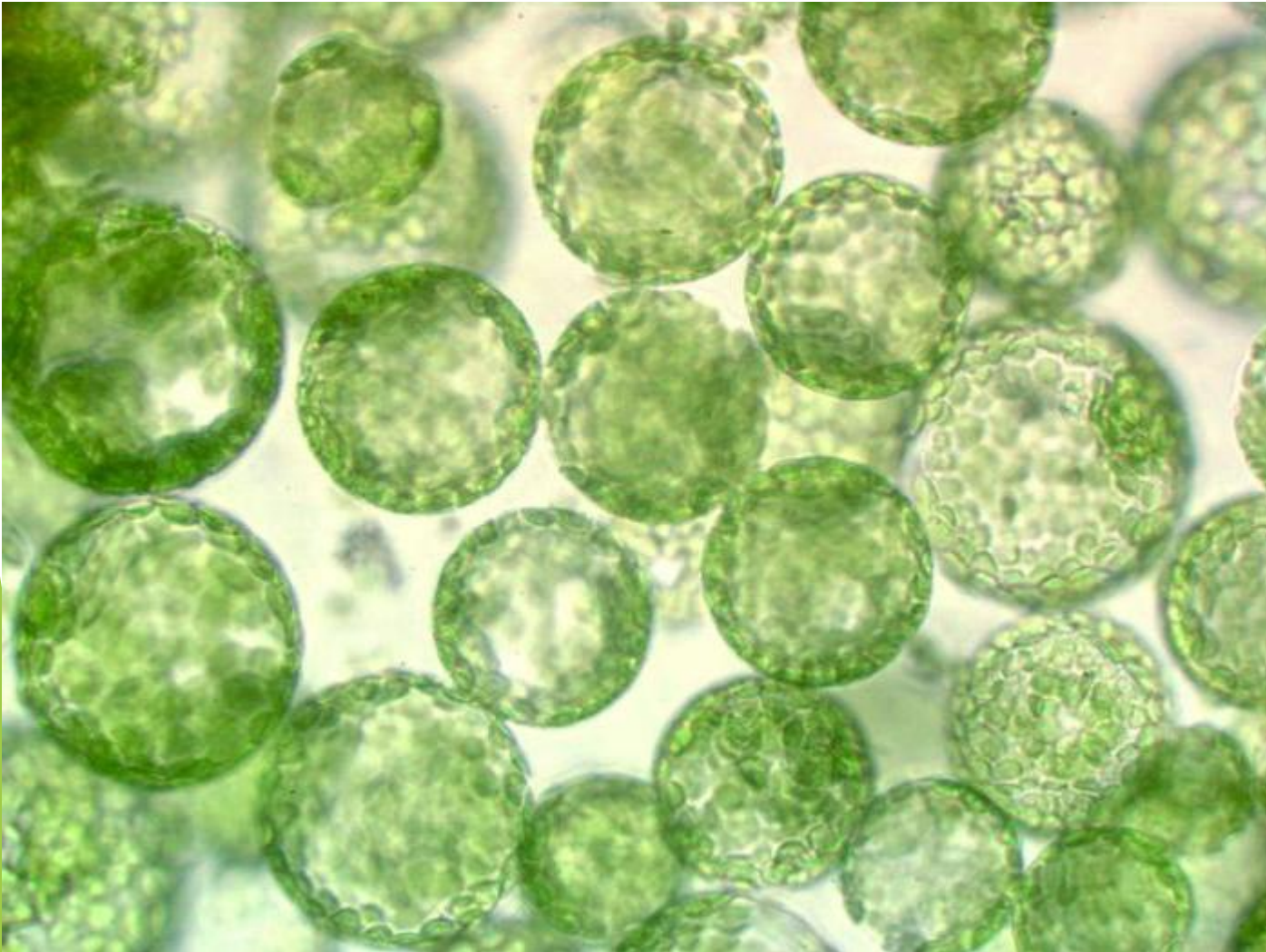
*Каплю закрывают покровным стеклом и конструкцию переворачивают*

## 2. Метод висячих капель автор: Ю.Ю. Глеба

# Культура ізольованих протопластів

План лекції :

- ▶ Визначення
- ▶ Використання
- ▶ Способи отримання
- ▶ Умови культивування
- ▶ Соматична гібридизація
- ▶ Види гібридів





# Ізольовані протопласти

- ▶ Ізольований протопласт - це клітина, позбавлена клітинної оболонки, оточена цитоплазматичною мембраною, яка зберігає всі властивості, притаманні цілісній рослинній клітині
- ▶ Ізольований протопласт - це частина клітини, що залишається після видалення клітинної стінки ензиматичним або фізичним способом

Изучение состава и структуры клеточной  
стенки методом разрушения  
специфическими ферментами

Моделирование  
метаболизма, роста,  
дифференциации в  
отсутствии межклеточных  
связей

Механизмы репарации и  
роста клеточной стенки

**Изолированные  
протопласты**

Действие гормонов и  
патогенов на плазмалемму  
и протопласт

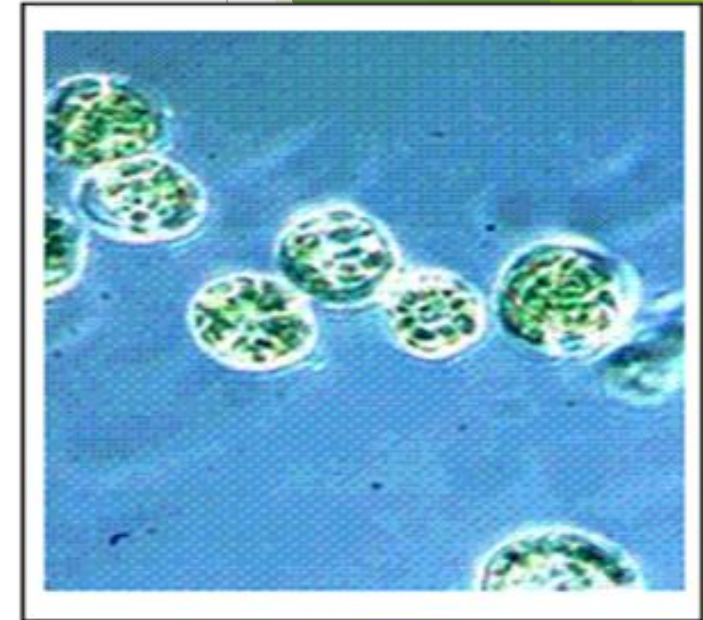
Организация и  
функционирование  
плазмалеммы

Поступление через плазмалемму  
низкомолекулярных веществ, частиц,  
органелл

**Ізольовані протопласти -  
об'єкт і модель  
в фізіологічних  
дослідженнях  
(Бутенко, 1996)**

# Використання ізольованих протопластів для теоретичних і прикладних досліджень:

- ▶ Вивчення структури клітинної стінки (при руйнуванні та синтезі *de novo*)
- ▶ Вивчення властивостей плазмолеми, трансмембранних переміщень
- ▶ «М'яке» виділення органел
- ▶ Вивчення соматичних гібридів (взаємодії ядра і цитоплазми)
- ▶ Введення «чужих» органел
- ▶ Введення чужорідних генів в рослинну клітину (трансгеноз)



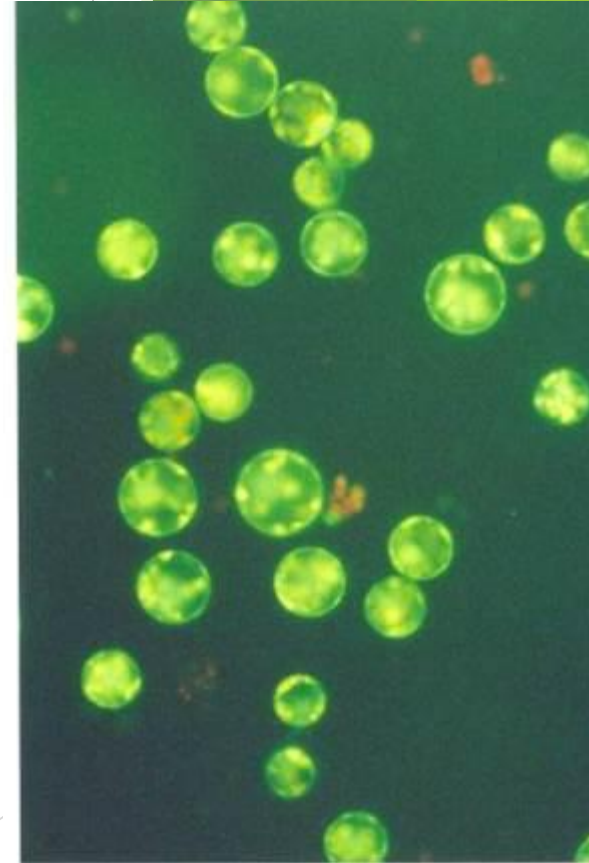
# Способи виділення протопластів

## ► Механічний метод

- 1892 р. - Дж. Клеркер
- невисока продуктивність
- трудомісткість і тривалість
- можливо тільки для тканин з сильним плазмолізмом

## ► Ензиматичний метод

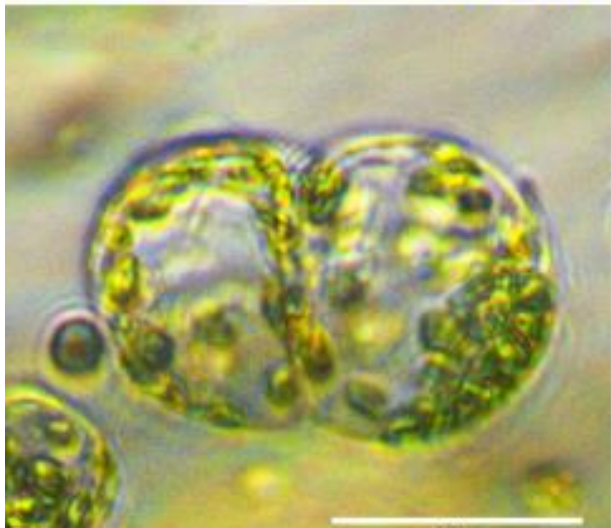
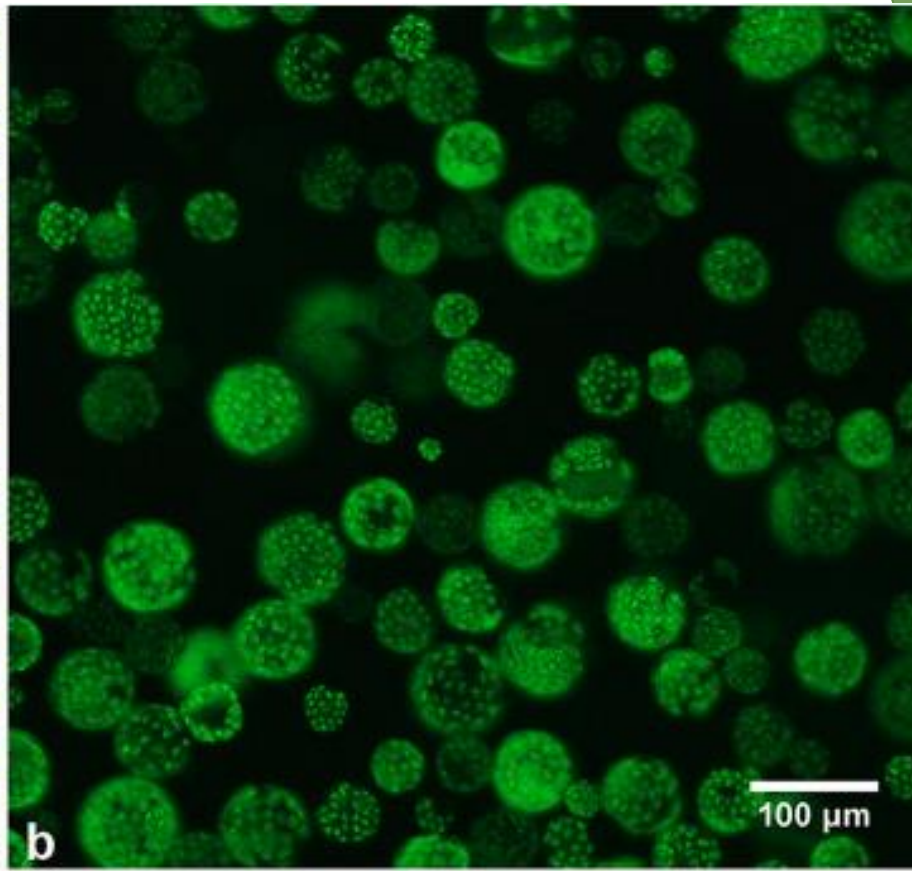
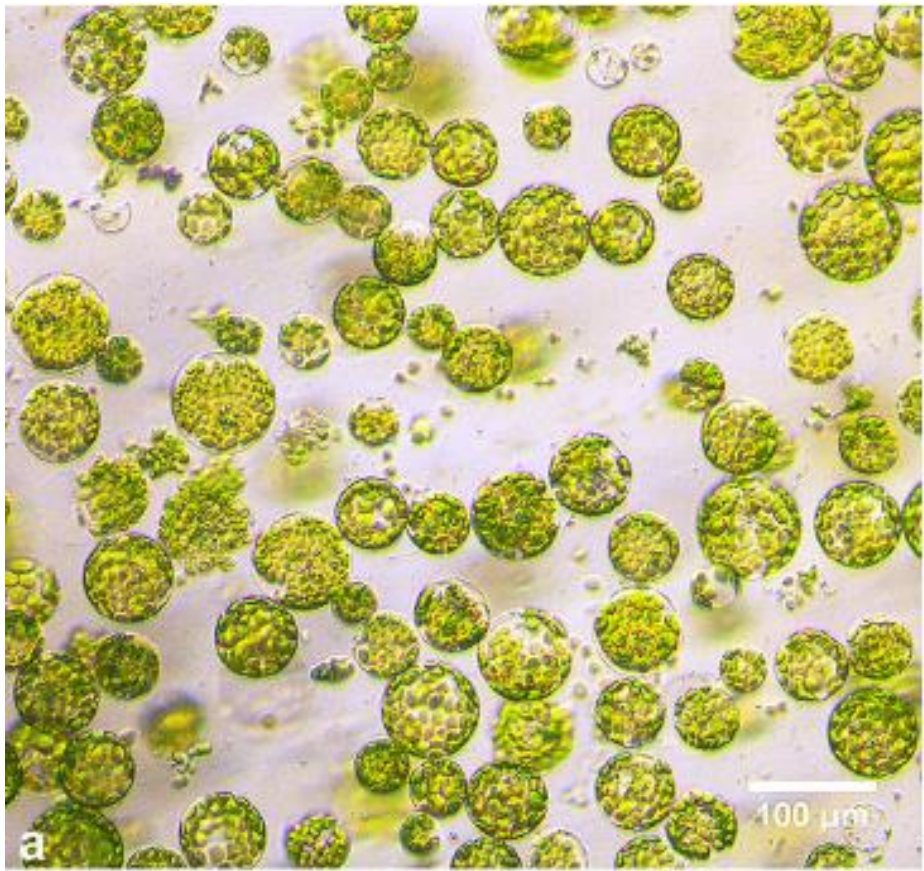
- 1972 г. - Е. Коккінг
- 1г тканини - 10 млн протопластів
- не піддаються осмотичного стресу
- не пошкоджуються
- метод швидкий



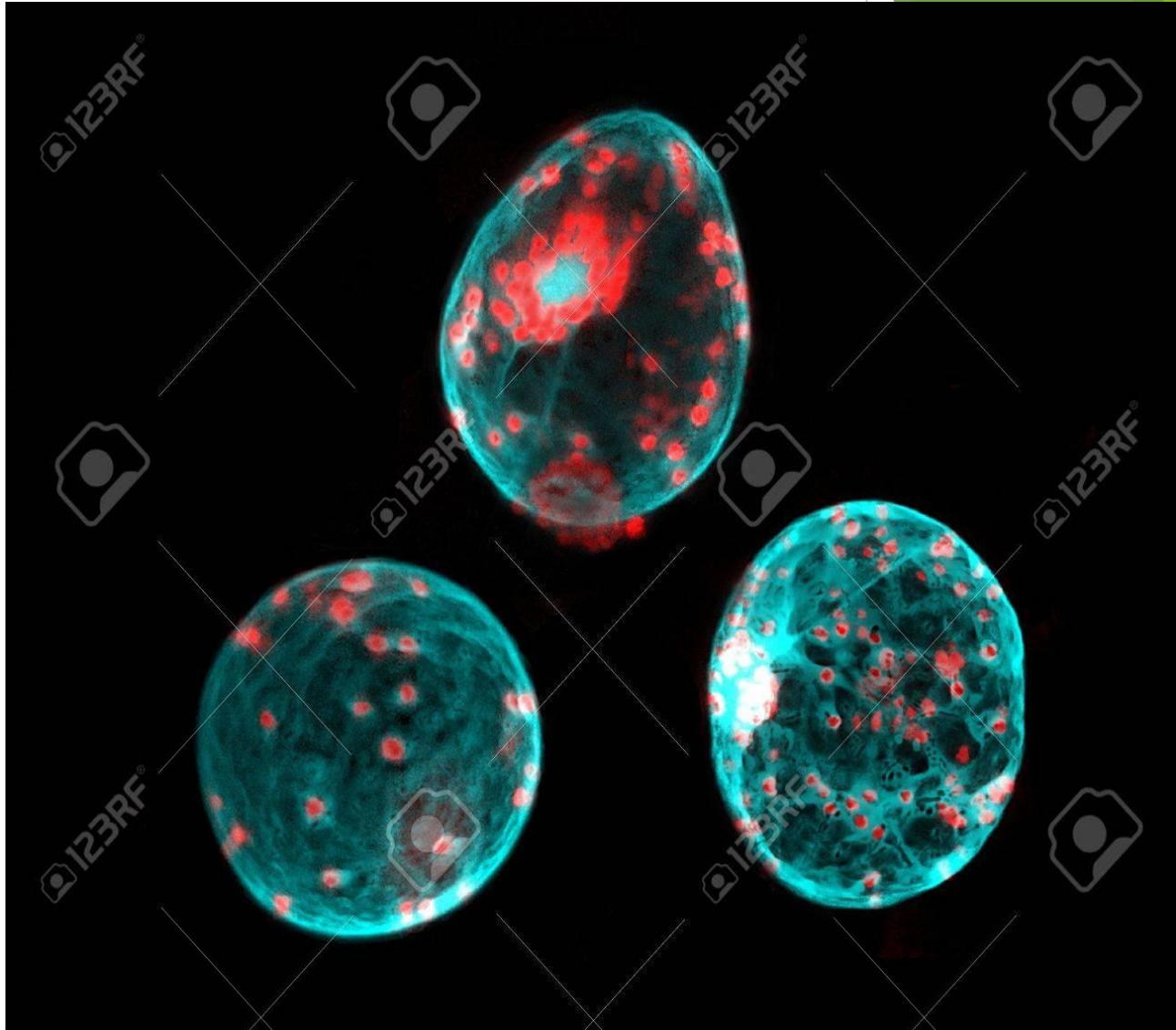
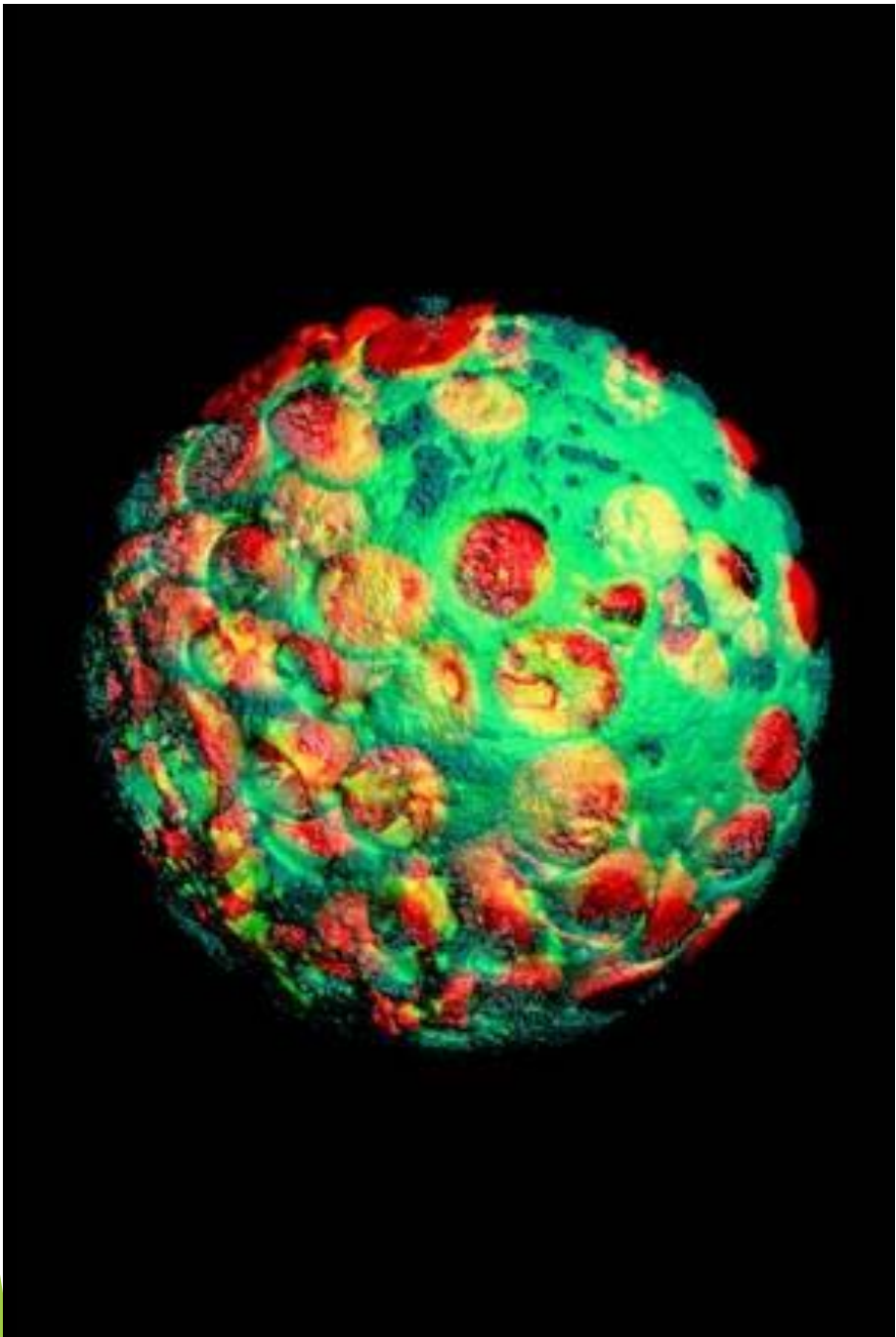


# Ензиматичний метод - стандартна методика - Такебе отримання з мезофіла листа тютюну

- ▶ Комплекс ферментів:
  - ▶ Целлюлази
  - ▶ Геміцеллюлази
  - ▶ Пектинази
- ▶ Етапи отримання:
  - ▶ 1 - обробка ферментами
  - ▶ 2 - виділення протопластів з клітинних стінок
  - ▶ 3 - виокремлення інтактних протопластів від клітинних уламків

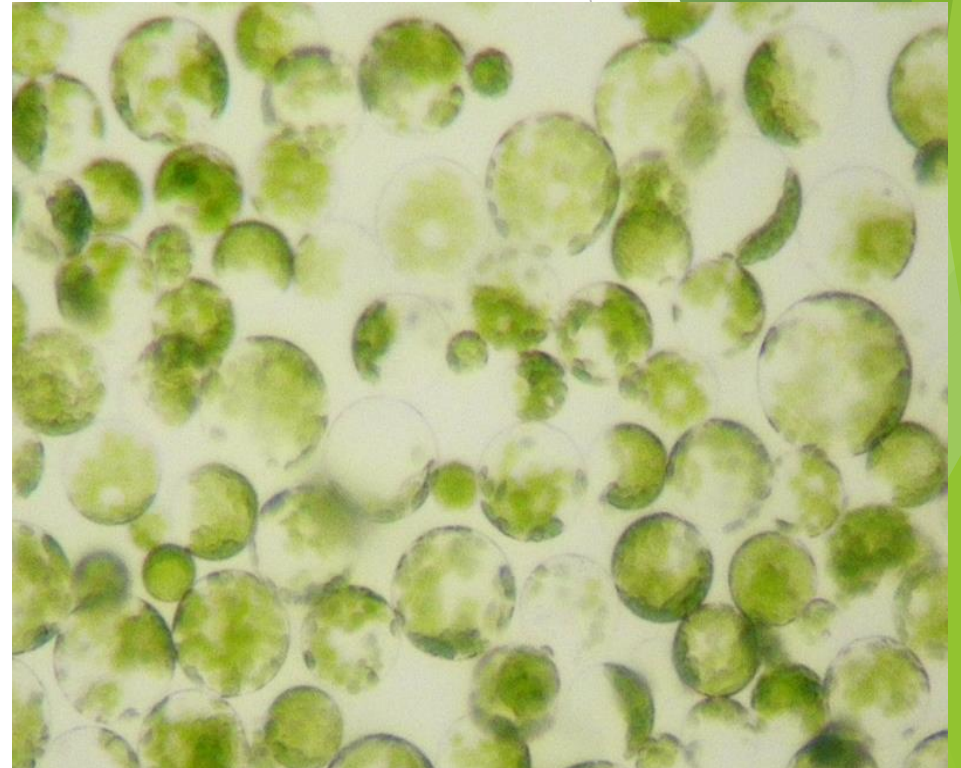






# Виділення протопластів

- ▶ Підбір осмотичного стабілізатора
- ▶ Осмотики - сахароза, сорбіт, манітол, розчини солей 0,3-0,8 М
- ▶ Вибір рН середовища (5,4-5,8)
- ▶ Підбір температури (22-28 °С)
- ▶ Методи очищення:  
фільтрація + центрифугування;  
метод «флотації»





# Злиття рослинних протопластів - соматична гібридизація

- ▶ Ізольовані протопласти (до формування клітинної стінки) можуть зливатися між собою
- ▶ Спонтанне (пасивне)
- ▶ Індуковане
- ▶ Процес злиття:
  - адгезія
  - власне злиття мембран (збільшення текучості, обмін ліпідними ділянками)
  - злиття протопластів

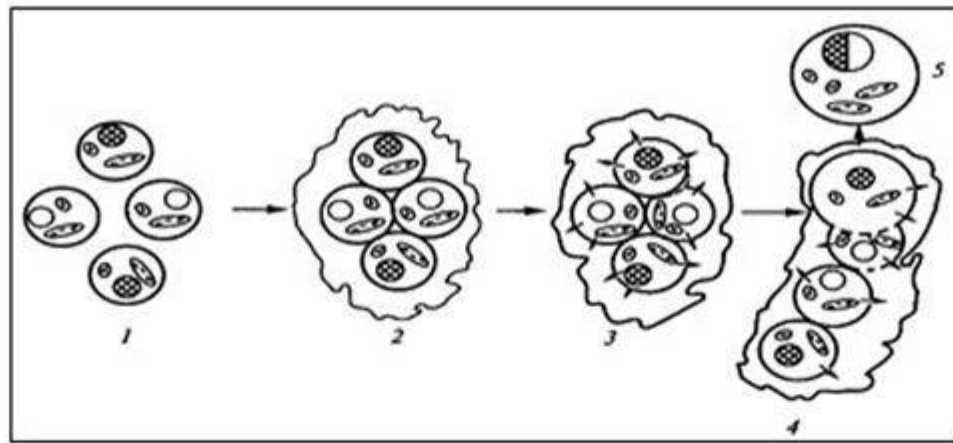
# Індукція злиття протопластів

## Фізичні методи

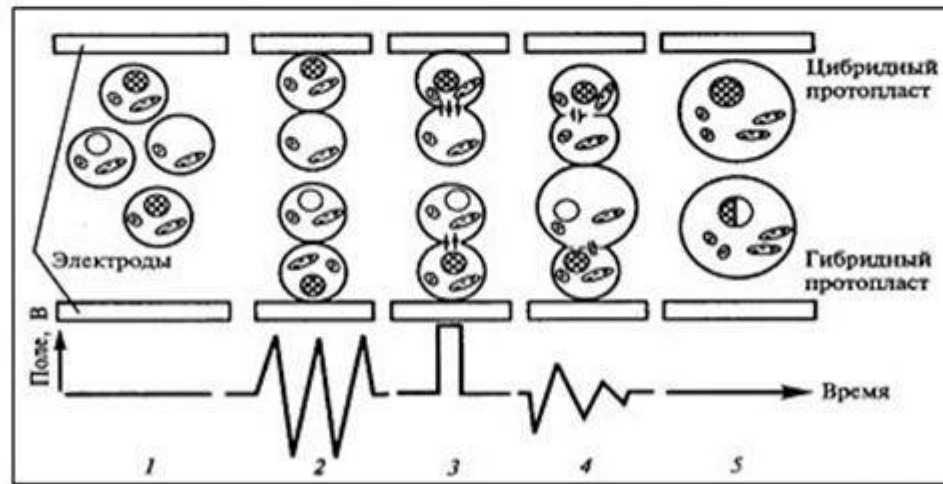
- ▶ Дія постійного і змінного струму
- ▶ Неоднорідне електричне поле
- ▶ Постійне поле - стискає мембрани
- ▶ Змінюється дифузія білків  
→ вільні ліпідні області

## Хімічні методи

- ▶ ПЕГ - високе рН (9-11) - концентрація кальцію
- ▶ ПЕГ - адгезія
- ▶ Після видалення ПЕГ + Са + рН11 - злиття



**Рис. 4.1. Слияние протопластов под действием полиэтиленгликоля**  
 1 – изолированные протопласты; 2 - слияние протопластов в результате дегидратации; 3 - образование пор в мембране протопласта; 4 – перетекание через поры внутриклеточного материала; 5 – гибридный протопласт



**Рис. 4.2. Слияние протопластов под действием электрического тока**  
 1 – изолированные протопласты; 2 – слияние протопластов полярными поверхностями; 3 - образование пор в мембранах под воздействием сильного импульса постоянного тока; 4 – смешивание цитоплазмы; 5 – образование гибридных протопластов

# Соматична гібридизація

- ▶ Суть методу соматичної або парасексуальної гібридизації полягає в тому, що в якості батьківських клітин при злитті використовуються не статеві клітини (гамети), а диплоїдні клітини соми (у тому числі ті, з яких отримують ізольовані протопласти)
- ▶ При соматичній гібридизації в утвореному гібриді обидва партнери (батьки) мають рівний цитоплазматический статус



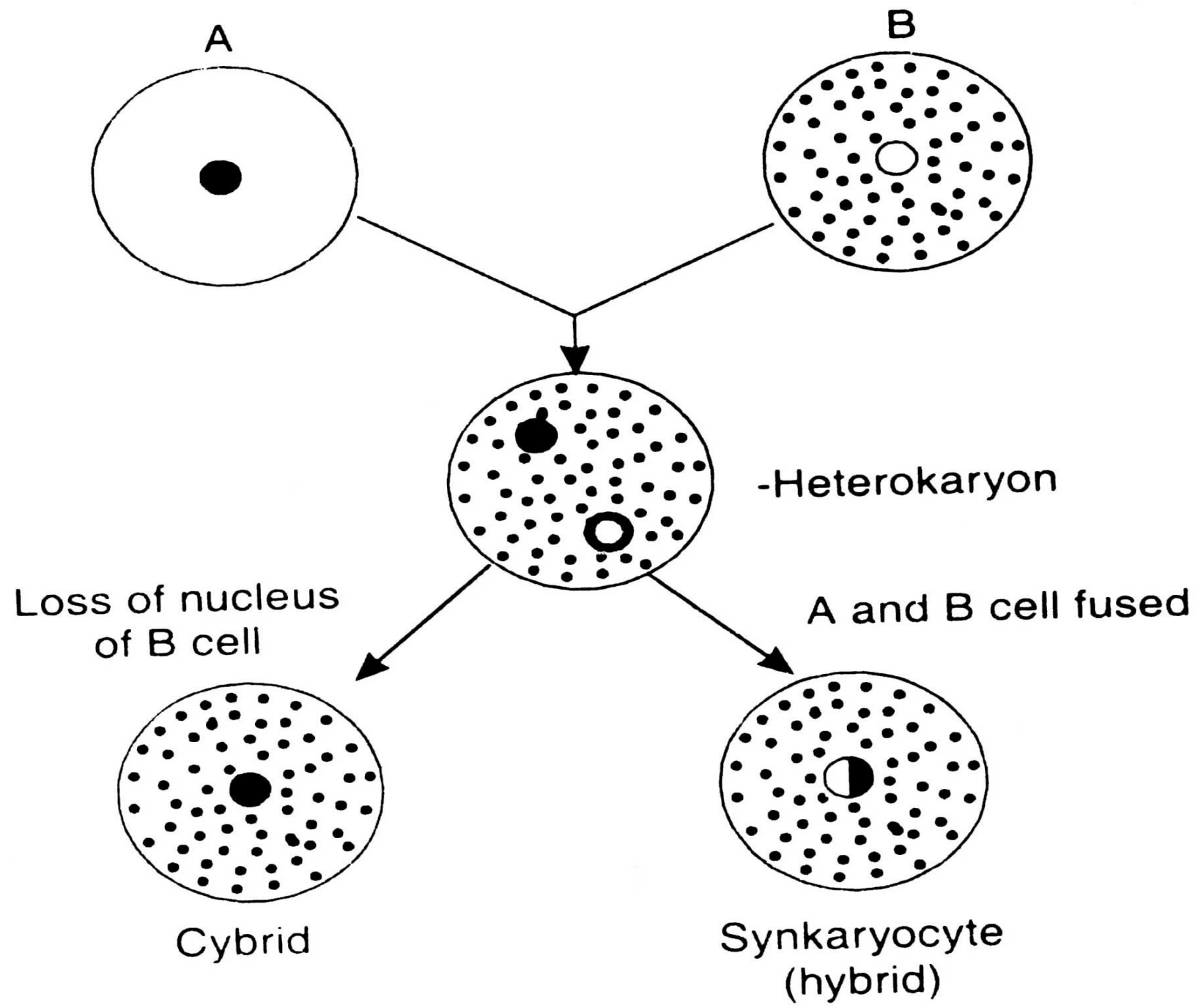
# Види соматичних гібридів

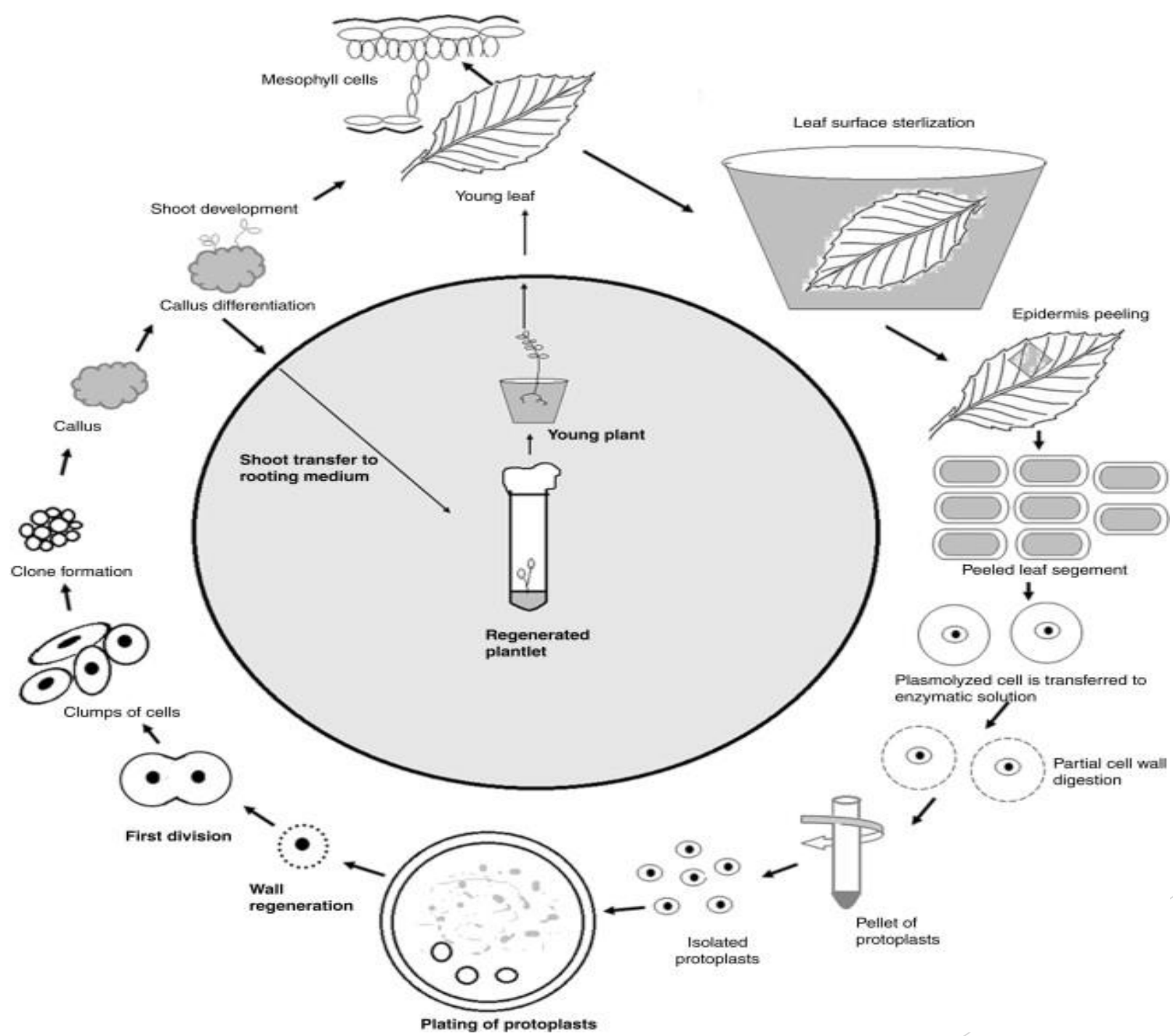
## ▶ Гібрид

- ▶ Симетричний - повний хромосомний набір обох батьківських видів
- ▶ Асиметричний - продукт злиття має повний хромосомний набір одного з батьків і частина іншого (аж до елімінації)
- ▶ Гібриди можуть бути отримані шляхом злиття трьох і більше батьківських клітин

## ▶ Цибрид

- ▶ Цибрид - (цитоплазматический гібрид) продукт злиття протопластів, що містить цитоплазму обох батьків і ядро тільки одного

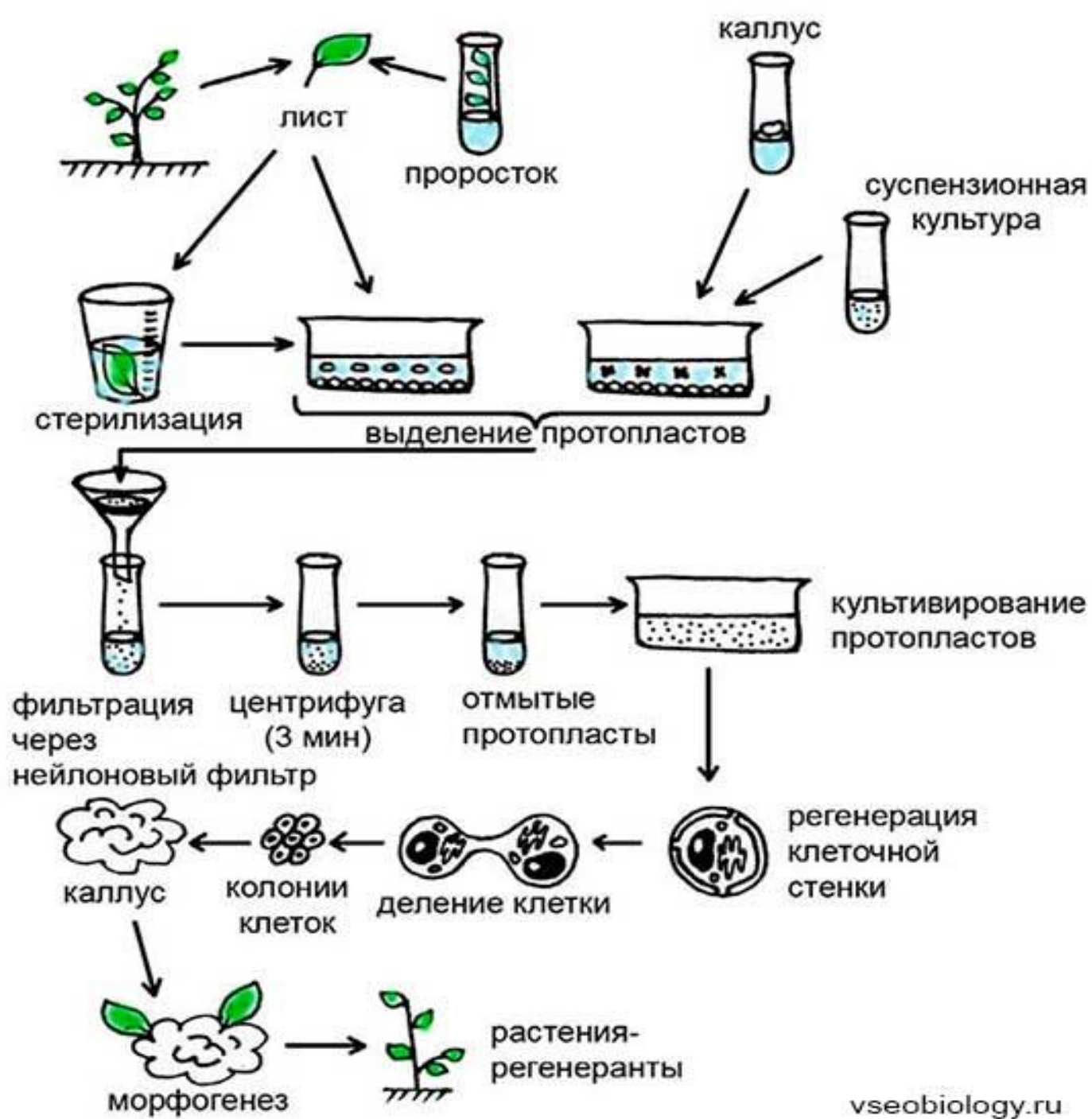


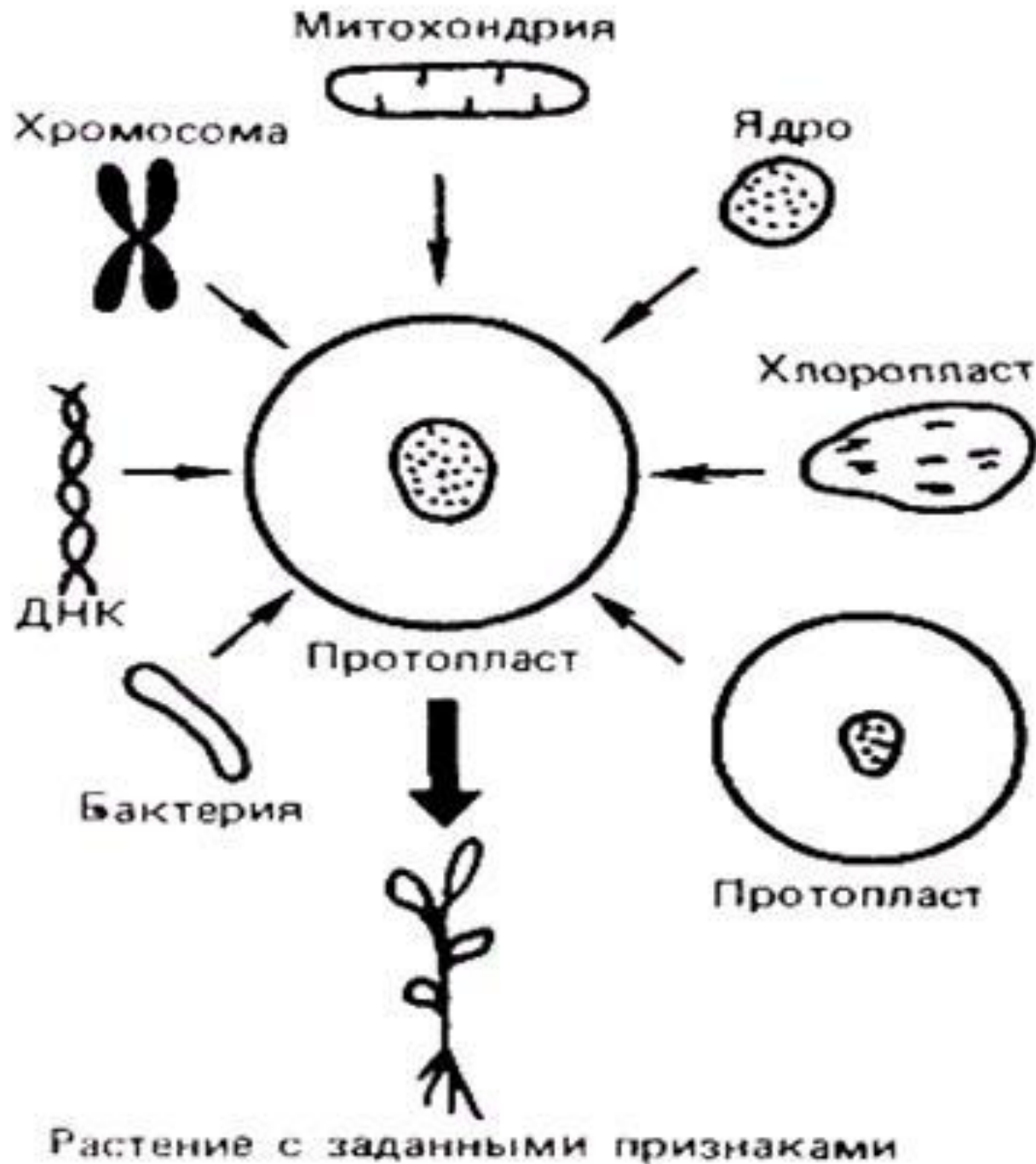


# Отримання рослин-регенерантів з ізольованих протопластів

- ▶ Регенерація клітинної стінки (1 доба)
- ▶ Етап першого поділу (2-3 доби)
- ▶ Поділ клітин - утворення 8 клітинних колоній (7-8 діб)
- ▶ Утворення каллюса (21-30 діб)
- ▶ Регенерація цілої рослини-регенеранта (3-5 місяців)







Конструювання клітин з використанням ізолюваних протопластів (Бутенко, 1996)

# Культури гаплоїдних клітин

Гаплоїдія - процес, що призводить до отримання рослин зі зменшеним вдвічі числом хромосом

У гаплоїдів в хромосомному наборі представлена тільки одна з гомологічних хромосом

# Отримання гаплоїдів

- ▶ Класичний метод - віддалена гібридизація (використання гаплопродюсерів)
- ▶ в зиготі віддаленого гібрида хромосоми одного з видів (батьків) елімінує
- ▶ Культивування *in vitro*
- ▶ - з незапліднених статевих клітин з наступною регенерацією цілої рослини
- ▶ (андрогенез та гіногенез)



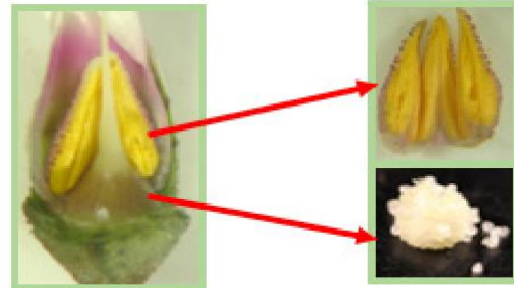
## ***In vitro* Androgenesis and Gynogenesis**



**Growing Donor Plant**



**Harvesting Floral Organs  
and Identification  
Appropriate Stage**



**Surface Sterilization and  
Anther / Ovule Isolation**



***In vitro* Culture of Explants**



**Determination Ploidy Level  
Recovery Haploids and  
Chromosome Doubling**

**Figure 1.** Basic steps of androgenesis and gynogenesis in *Cyclamen*

# Переваги гаплоїдів і дігаплоїдів в селекційній роботі

- ▶ Можливість спостерігати мутації
- ▶ Дігаплоїди характеризуються абсолютною гомозиготністю
- ▶ Генетичний аналіз: взаємодія генів, визначення груп зчеплення, числа генів в кількісних ознаках та ін.
- ▶ Гаплоїди позбавлені летальних і сублетальних мутацій

# Андрогенез - процес отримання рослин-регенерантів з чоловічих статевих клітин рослини

- ▶ 1964 - перші гаплоїдні рослини при культивуванні пиляків дурману
- ▶ Зараз більше 200 видів рослин
- ▶ Культура ізольованих пиляків
- ▶ Культура пилку - культивування мікроспор

# Культура пиляків

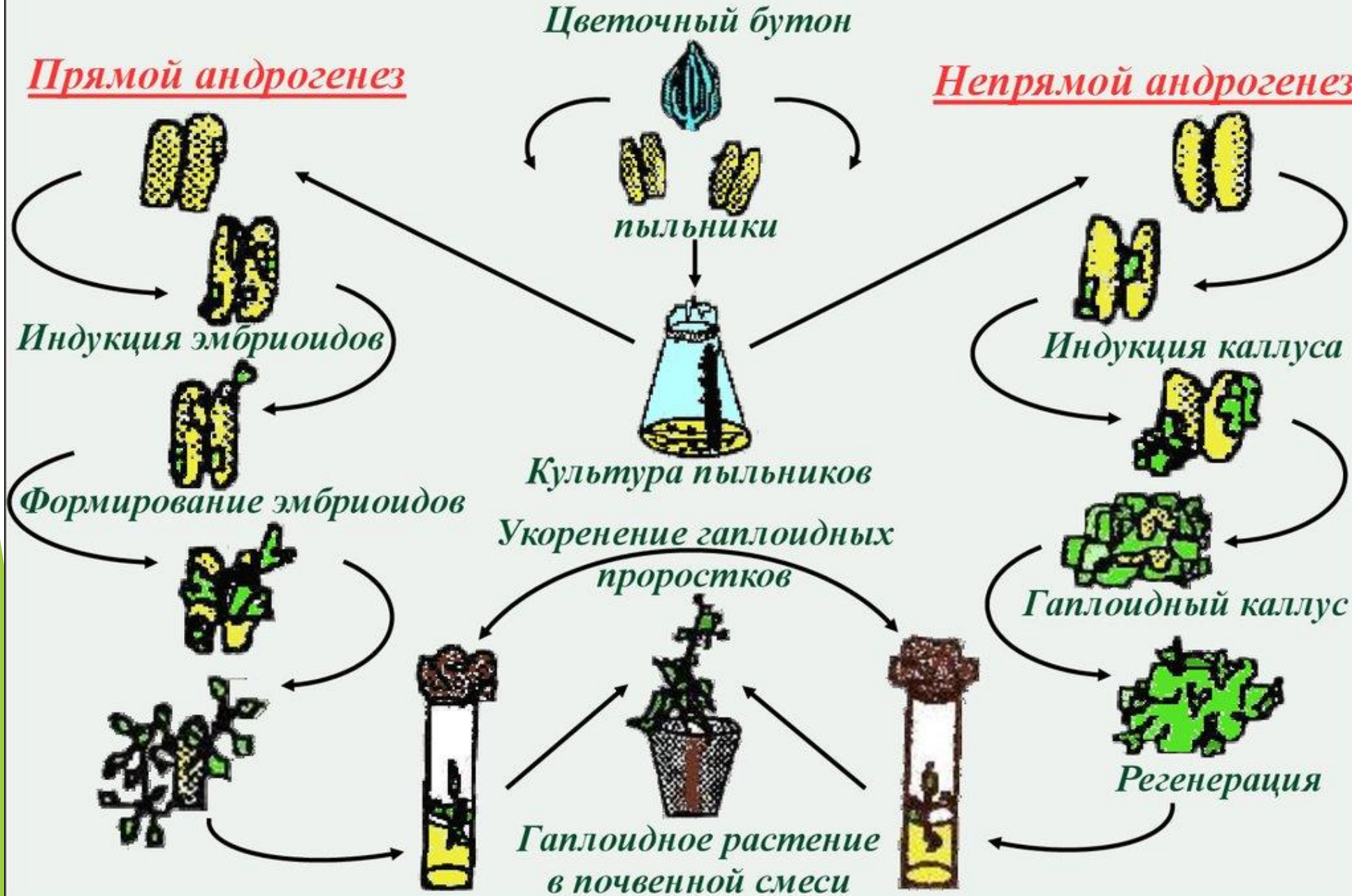
- ▶ Квіткові бутони
- ▶ Виділення стерильних пильовиків на певній фазі розвитку
- ▶ Переміщення на тверде живильне середовище
- ▶ 2 шляхи регенерації:
- ▶ Пряма регенерація (через формування ембріодів) - гаплоїдні рослини
- ▶ Непряма (непряма регенерація) - обов'язкова стадія калусогенеза - морфогенез - рослини-регенеранти з різним ступенем плоїдності (ді-, полі-, анеуплоїди) - фертильні діплоїди



# Типы андрогенеза *in vitro*

## Прямой андрогенез

## Непрямой андрогенез



## Фактори, що впливають на індукцію гаплоїдного калусу та регенерацію

- ▶ Генотип батьків
- ▶ Фізіологічний стан рослини-донора (попередня обробка)
- ▶ Стадія розвитку пилку - одноядерна
- ▶ Перед обробка бутонів (низькі температури)
- ▶ Склад поживних середовищ - сахароза 60-120 г/л, ФГ склад
- ▶ Умови культивування

# Культура пилку (мікроспор)

- ▶ Культивування мікроспор, звільнених з соматичних тканин пильовика в рідкому середовищі
- ▶ Способи виділення пилку:
  - ▶ -спонтанне вивільнення (пасивний)
  - ▶ -розрізання, гомогенізація та фільтрація
- ▶ Особливості регенерації:
  - ▶ дуже багато рослин-альбіносів у злаків (фертильні)
  - ▶ утворення спонтанних фертильних дігаплоїдів

# Культивування жіночого гаметофіту *in vitro*

- ▶ Апоміксис (партеногенез) - розвиток яйцеклітини без запліднення
- ▶ Апогамія - зародок розвивається з синергід або антипод
- ▶ 1964 - незапліднена сім'япочка гінгко (рослини не отримали)
- ▶ 1976 - ячмінь - зелені гаплоїдні рослини



# Віддалена гібридизація

- ▶ Схрещування диплоїдних ячменів
- ▶ *Hordeum vulgare* (культурний) і *Hordeum bulbosum* (багаторічний дикий цибулинний)
- ▶ через 5 днів після запліднення - елімінує дикий
- ▶ Через 15 днів зародок переносять *in vitro*
- ▶ Регенерують проростки (альбіноси не утворюються)



Fresh

No pretreatment

Cold pretreatment

1 or 2 weeks, 4°C, dark

Snipping bracts off



Disinfection/Sterilization

30 min, NaOCl + 2 drops of Tween per 100 ml of solution, then washed 3 times with DW

Induction

16/8h photoperiod, 24°C



Explanting

On MS salt and vit., 100 g L<sup>-1</sup> suc.,  
2.8 g L<sup>-1</sup> phytigel™ ;  
Hormone-free, 1 and 2 mg L<sup>-1</sup> BAP



Ovaries dissecting

To remove ovules

Observation

Between 1st and 2nd months



Subculturing

On MS, 30 g L<sup>-1</sup> suc.,  
2.8 g L<sup>-1</sup> phytigel™; 0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP.



To grow and develop

16/8 h photoperiod, 24°C



technivit lab

**Beta vulgaris *in vitro***