

# Морфогенетичні реакції *in vitro*

## ТИПИ диференціації в культурі *in vitro*

Клітинне диференціювання (цитогенез)- поява в калусних тканинах спеціалізованих клітин, що мають специфічну морфологічну будову

Гістологічне диференціювання калусних клітин (гістогенез) - утворення в калусі різних тканин (молочних судин, волокон; елементів судинної системи - трахеї і трахеїди ксилеми, сітовідні трубки і клітини-супутниці флоєми)

Органогенез - диференціація калусних клітин в цілі органи; перетворення їх в апекси стебел або коріння, флоральні елементи.

Соматичний ембріогенез - утворення в калусних тканинах або суспензійній культурі ембріодів, тобто зачатків, здатних розвиватися в дорослу рослину.

# Морфогенез in vitro

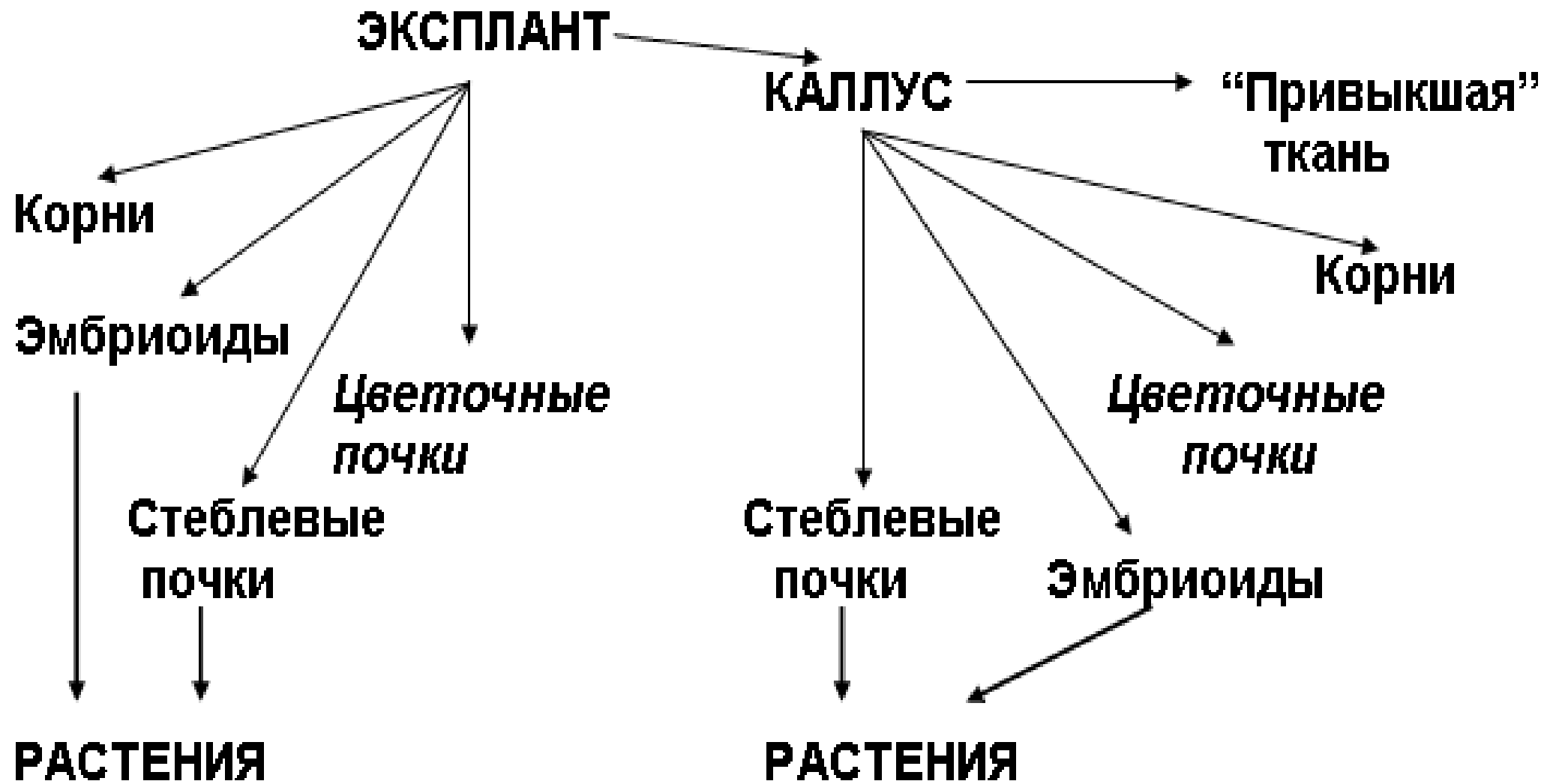


Прямий шлях -  
формування  
морфогенних структур  
відбувається  
безпосередньо на  
експланті



Непрямий шлях -  
формування  
морфогенних структур  
в калусній культурі

# Шляхи морфогенезу in vitro



# Фактори, що визначають спрямованість морфогенезу *in vitro*

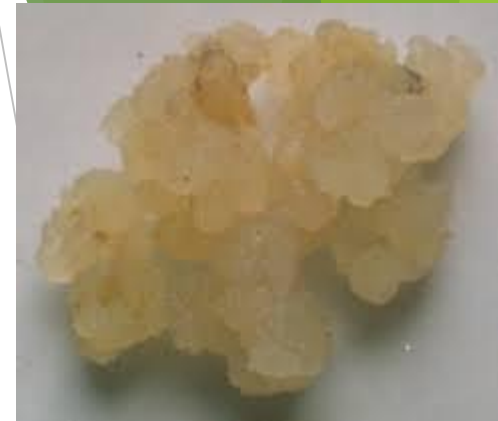
- Генотип - видоспецифічність
- Органо- і тканеспеціфічність
- Вік рослини-донора
- Положення експлантів на вихідній рослині (фізіологічна полярність)
- Вплив ФГ
- Умови культивування

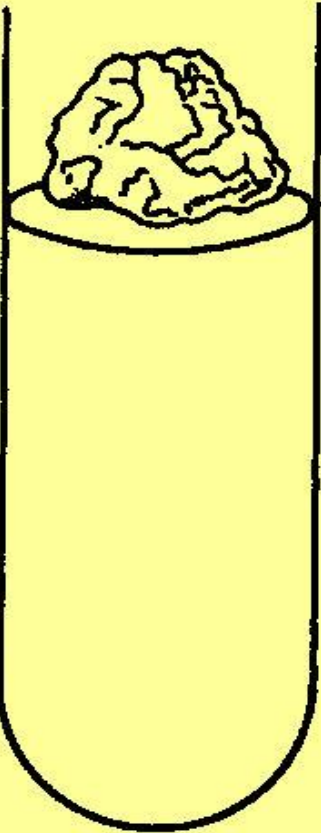
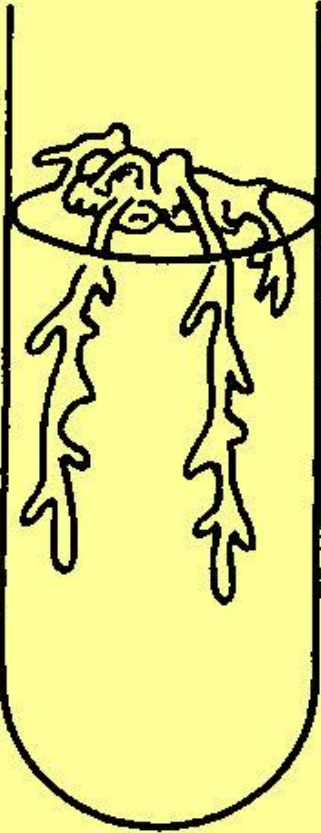
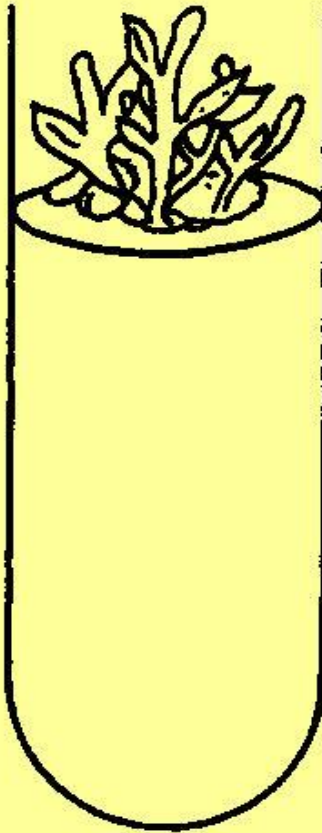
# Правило Скуга-Миллера (гормональної регуляції в культурі *in vitro*)

Ауксини = цитокініни → калус (калусогенез)

Ауксини > цитокініни → корені (ризогенез)

Ауксини < цитокініни → пагони, бруньки  
(гемогенез, адвентивне пагоноутворення)



<i>ИУК</i>	$3 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-6}$	$3 \times 10^{-8}$
<i>Кинетин</i>	$2 \times 10^{-7}$	$2 \times 10^{-8}$	$1 \times 10^{-6}$
<i>Регенерация</i>			

*Зависимость регенерации культуры ткани сердцевины табака от соотношения фитогормонов*

# Мікроклональне розмноження рослин



# План лекції

- ▶ Історія методу
- ▶ Переваги методу
- ▶ Основні етапи мікроклонального розмноження
- ▶ Основні типи (методи)
- ▶ Метод активація меристем
- ▶ Метод адвентивного утворення мериклонів
- ▶ Метод соматичного ембріогенезу
- ▶ Метод утворення мериклонів в калусній тканині
- ▶ Фактори регуляції ефективності процесу
- ▶ Генетичні та фізіологічні
- ▶ Фізичні та хімічні
- ▶ Фітогормональні





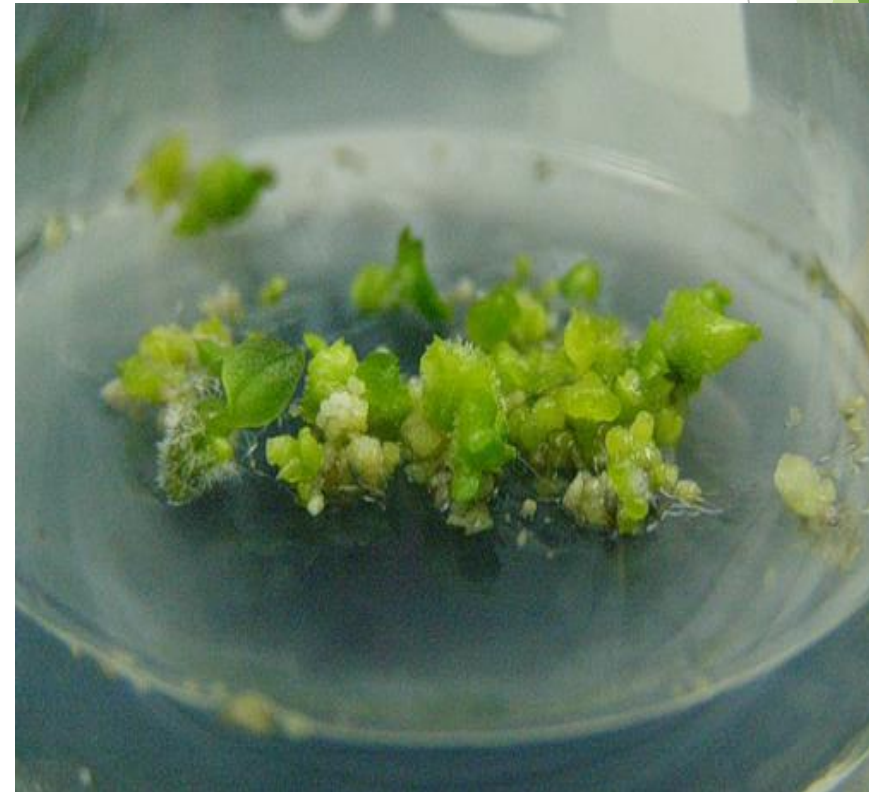
# Мікроклональне розмноження

- ✓ Отримання *in vitro* нестатевим шляхом рослин, генетично ідентичних вихідному
- ✓ (Метод вегетативного розмноження в культурі *in vitro*)
- ✓ Тотипотентність - властивість соматичних клітин реалізовувати генетичний потенціал цілого рослинного організму



# Історія методу мікроклонального розмноження

Жан Морель 1960 рік - утворення протокормів в культурі *in vitro* апікальної меристеми стебла орхідеї цимбидіума;  
пророщування насіння орхідей на штучних середовищах *in vitro* - прискорення процесу, без мікоризації



# Переваги методу

- ❑ отримання генетично однорідного посадкового матеріалу
- ❑ звільнення рослин від вірусів
- ❑ високий коефіцієнт розмноження ( $10^5$ - $10^6$  - для трав'янистих,  $10^4$ - $10^5$  - для деревних);
- ❑ прискорення переходу рослин від ювенільної до репродуктивної фази розвитку;
- ❑ розмноження рослин, які важко розмножуються традиційними способами;
- ❑ можливість проведення робіт протягом року
- ❑ економія площ, необхідних для вирощування посадкового матеріалу



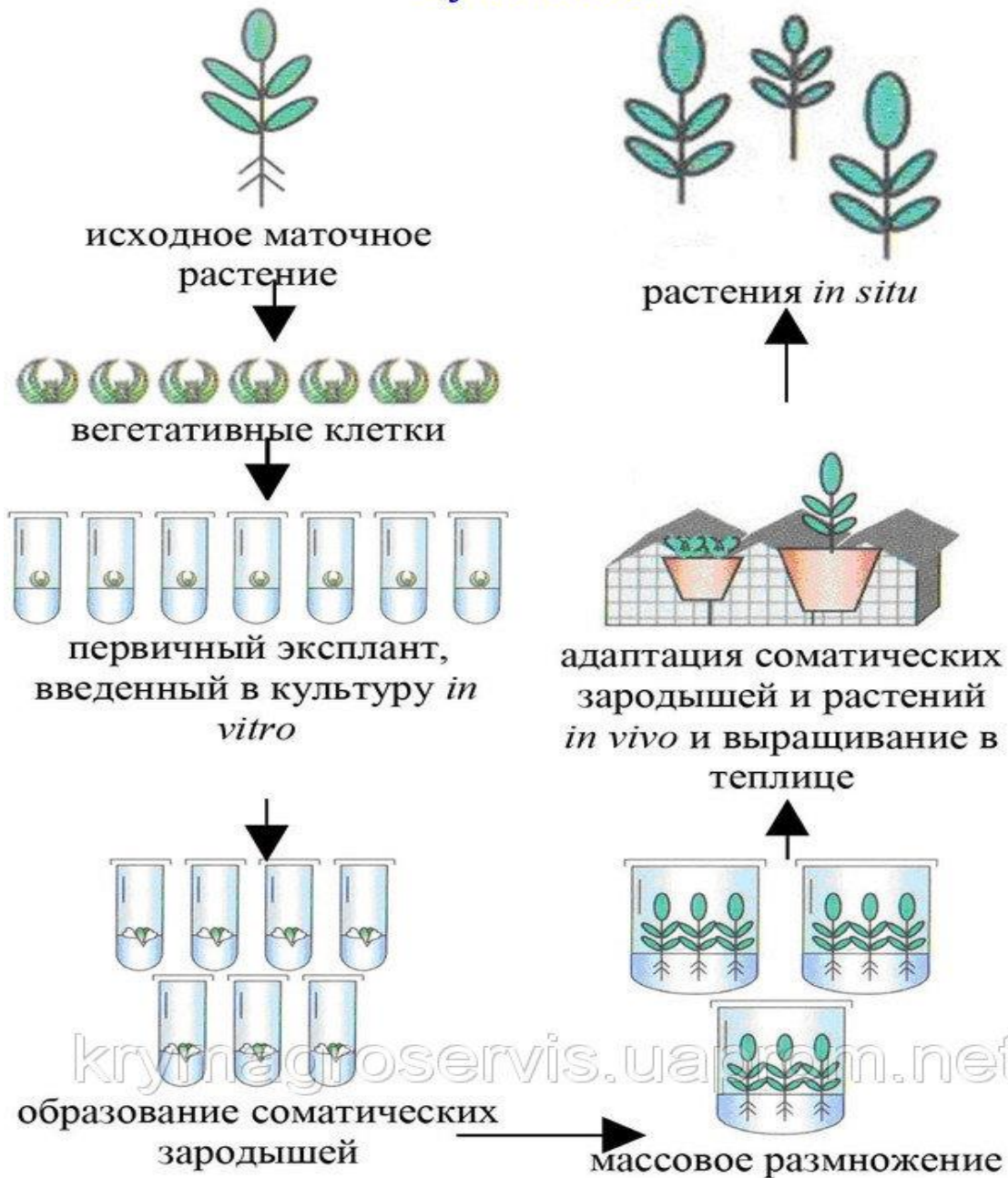
# Основні етапи

- ✓ 1) вибір рослини-донора, ізолювання експлантів і отримання добре зростаючої стерильної культури;
- ✓ 2) власне мікророзмноження - отримання максимальної кількості меріклонів;
- ✓ 3) укорінення розмножених пагонів з наступною їх адаптацією до ґрунтових умов
- ✓ 4) вирощування рослин в умовах теплиці або посадка в поле



# Микроклональное размножение растений

## Суть метода



# Методи мікроклонального розмноження

Активація вже  
існуючих  
в рослині  
меристем

Індукція  
виникнення  
бруньок або  
ембріодів de novo

# Методи мікроклонального розмноження

- Активація вже існуючих в рослині меристем (апекс стебла, пазушні та сплячі бруньки стебла)
- утворення адвентивних пагонів безпосередньо тканинами експлантів;
- індукція соматичного ембріогенезу;
- диференціація адвентивних бруньок в первинній та пересадковій калусній тканині



# 1-й метод

- Основний метод, який використовується при клональному мікророзмноженні рослин - активація розвитку вже існуючих в рослині меристем
- Він заснований на знятті апикального домінування
- Цього можна досягти двома шляхами:
  - а) видаленням верхівкової меристеми стебла і подальшим мікрочеренкуванням пагонів *in vitro* на безгормональному середовищі;
  - б) додаванням в живильне середовище речовин цитокінінового типу дії, які індукують розвиток численних пазушних бруньок та пагонів





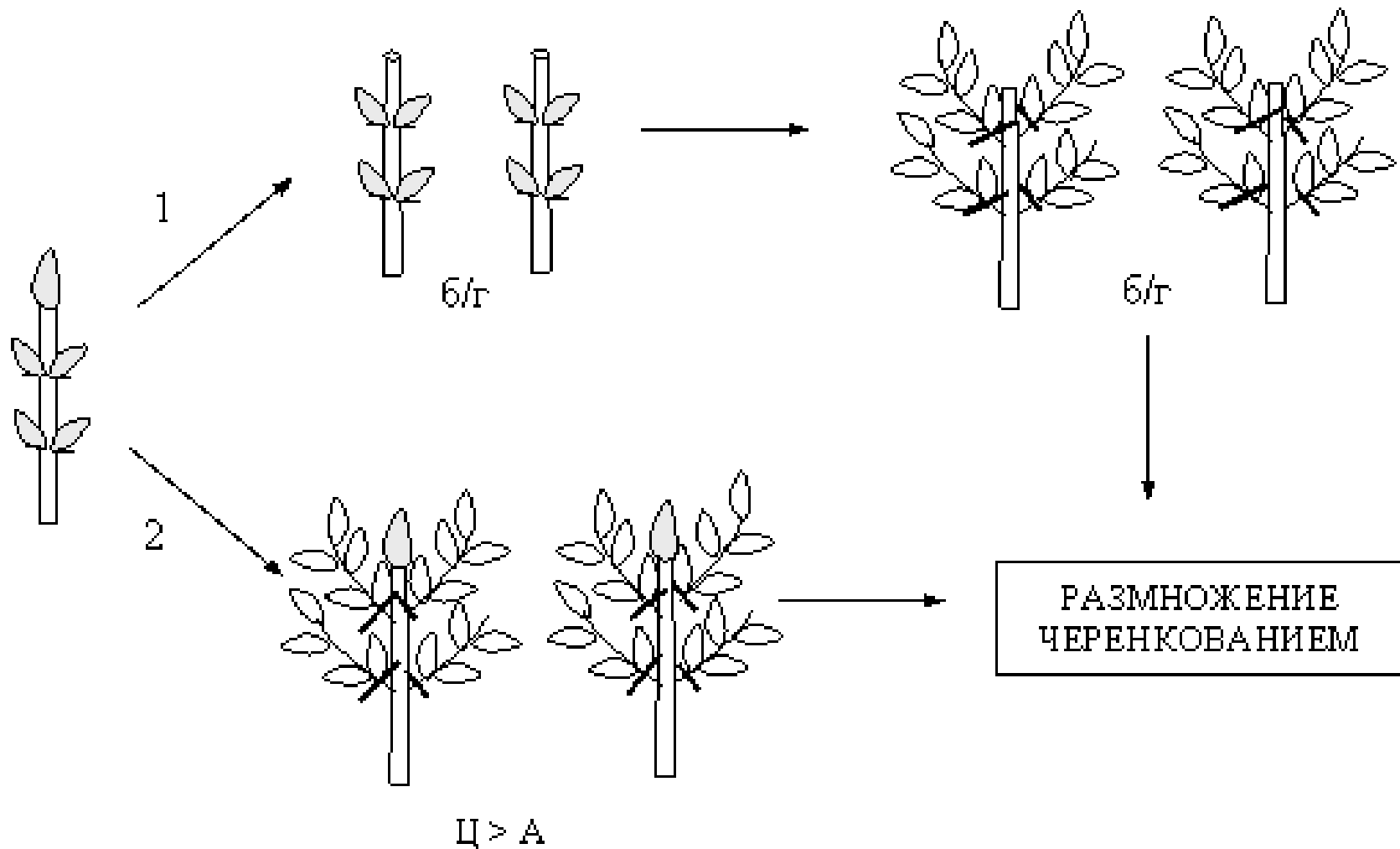
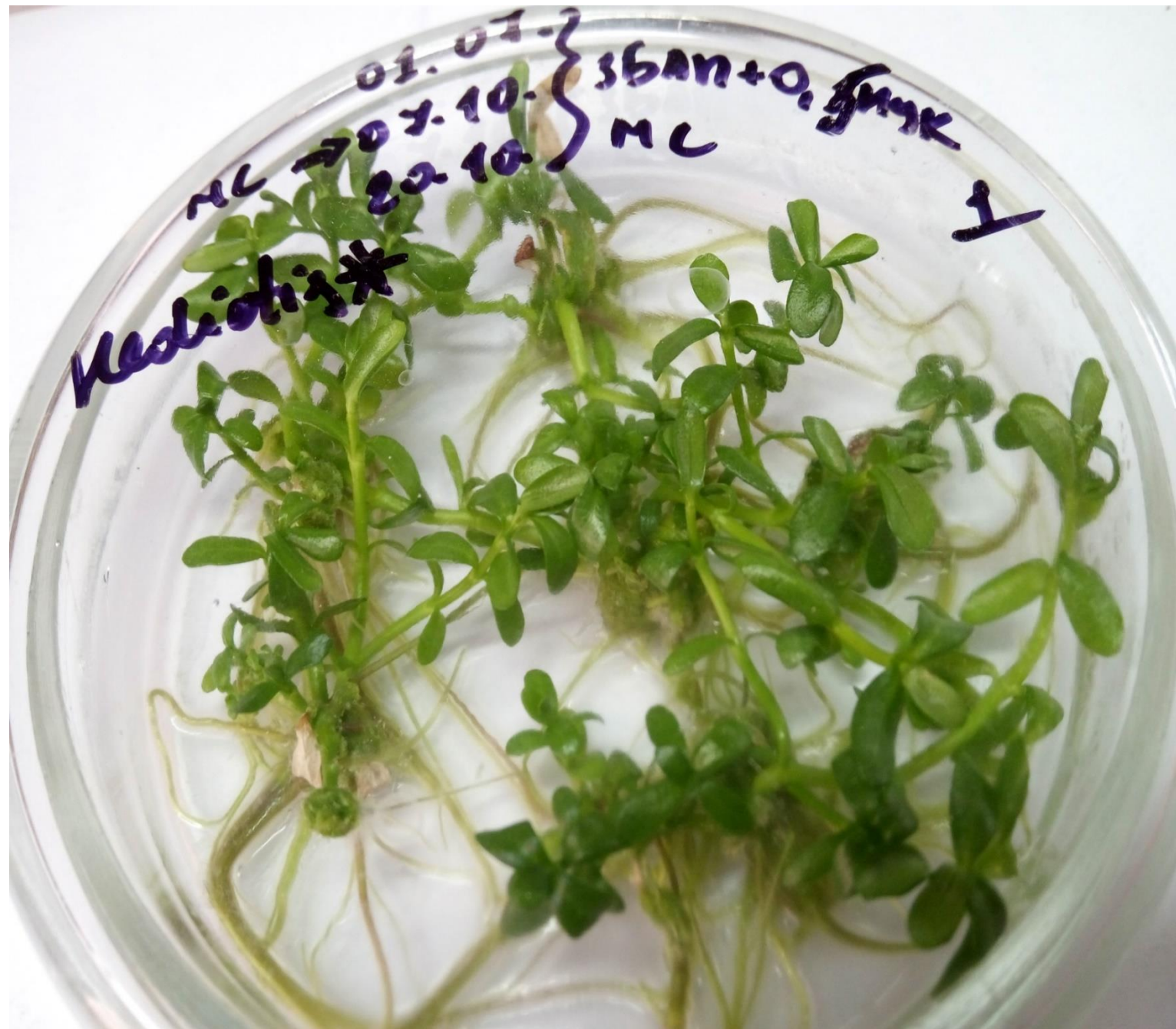


Схема розмноження рослин методом активації вже існуючих меристем 1 - шляхом видалення верхівкової меристеми: 2 - додаванням цитокінінів в середовище (б / г - середовище без гормонів, Ц - цитокініни, А - ауксин)



Medicago\*

01.07. } SBAN+0.5mM  
20.10. } MC

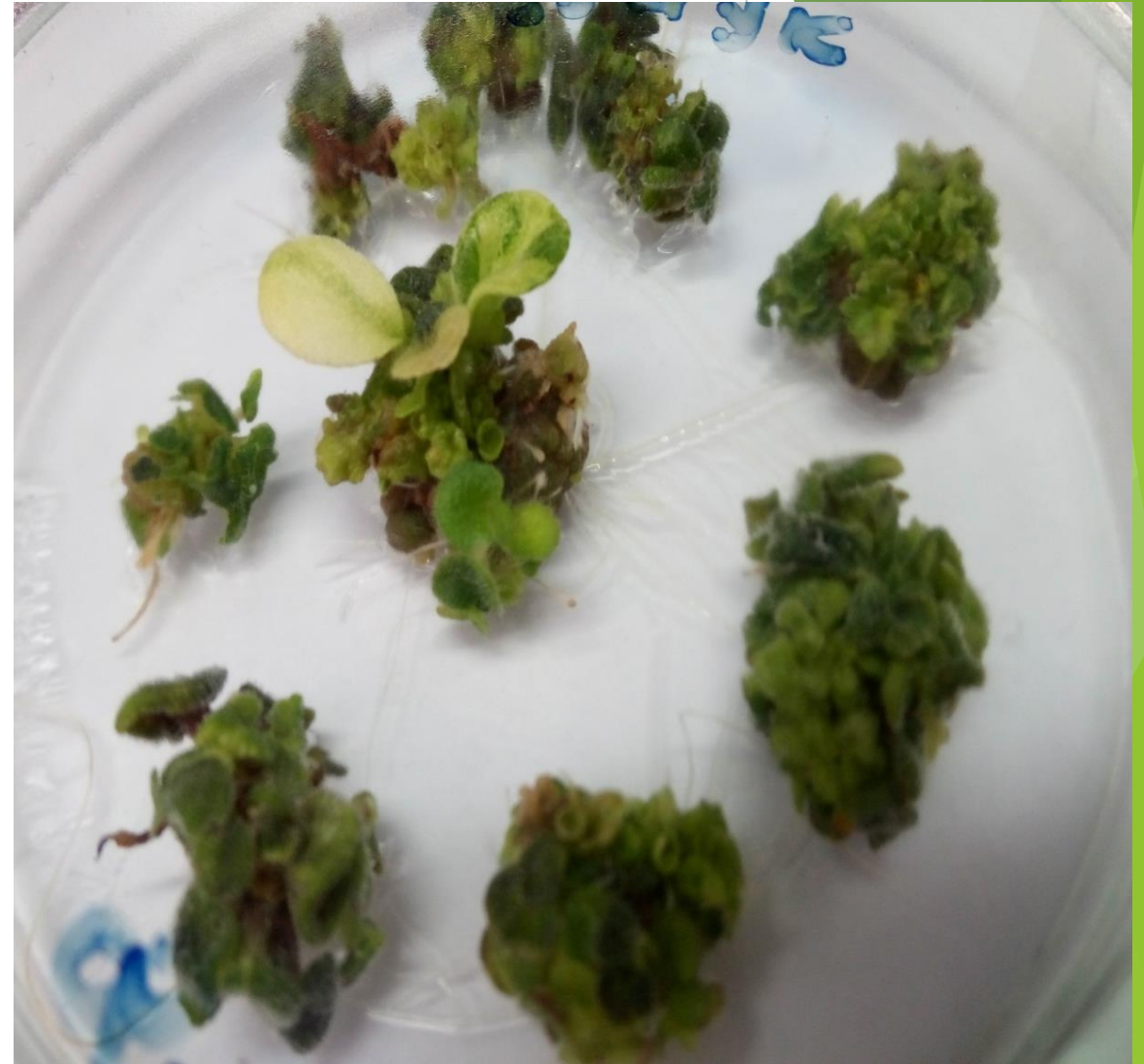
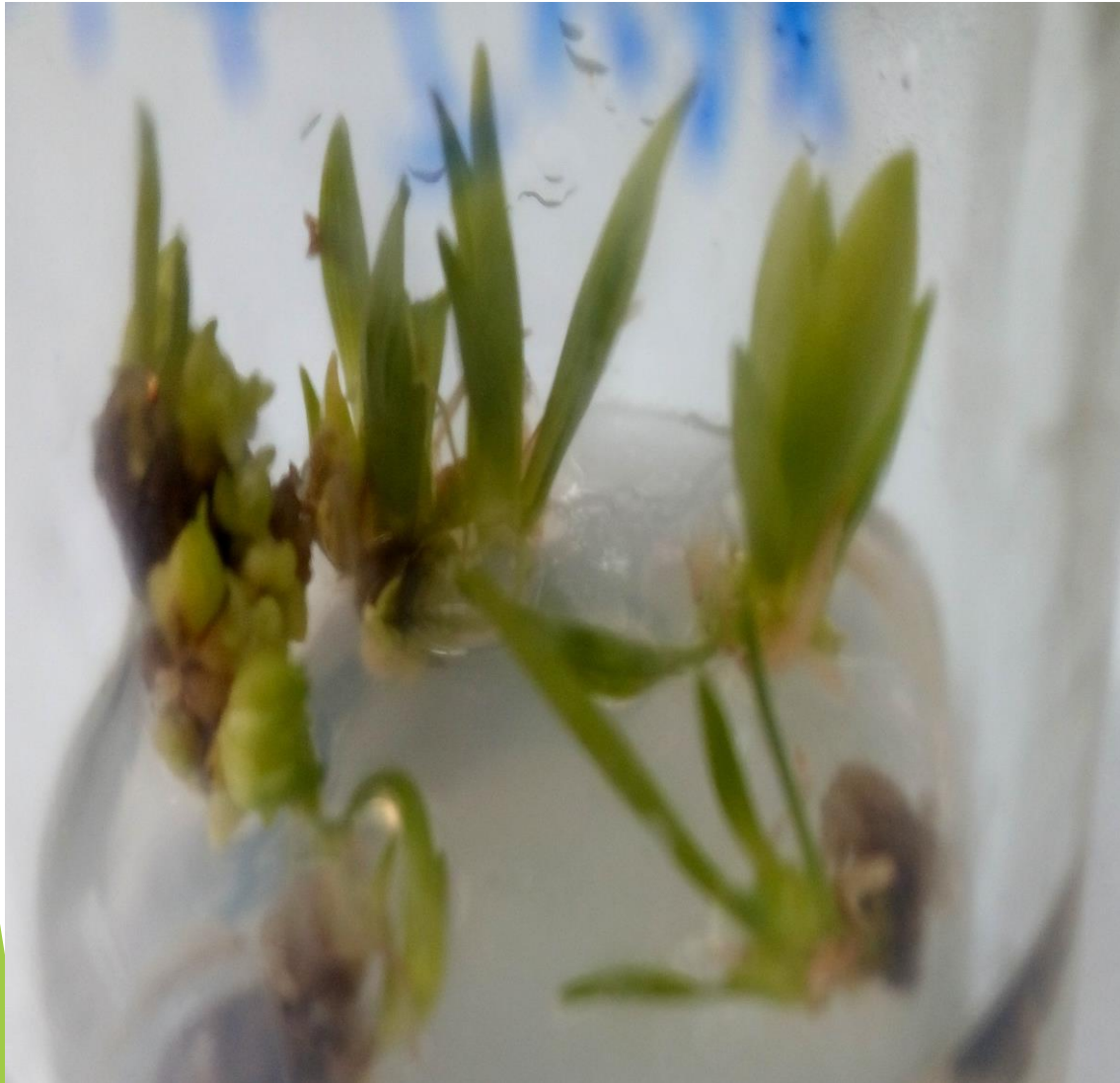
1

## 2-й метод

- Індукція розвитку адвентивних бруньок безпосередньо тканинами експлантів
- Заснований на здатності ізольованих частин рослини при сприятливих умовах живильного середовища відновлювати відсутні органи і таким чином регенерувати цілі рослини



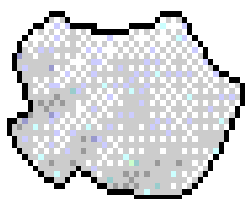
# Мікроклональне розмноження шляхом адвентивного формування мериклонів



# 3-й метод

- Соматичний ембріодогенез заснований на диференціації з соматичних клітин зародкоподібних структур, які за своїм виглядом нагадують зіготи́чні зародки
- Соматичні зародки проходять
- 3 стадії розвитку: глобулярну, серцеподібну, торпедоподібну і в кінцевому підсумку розвиваються в проросток



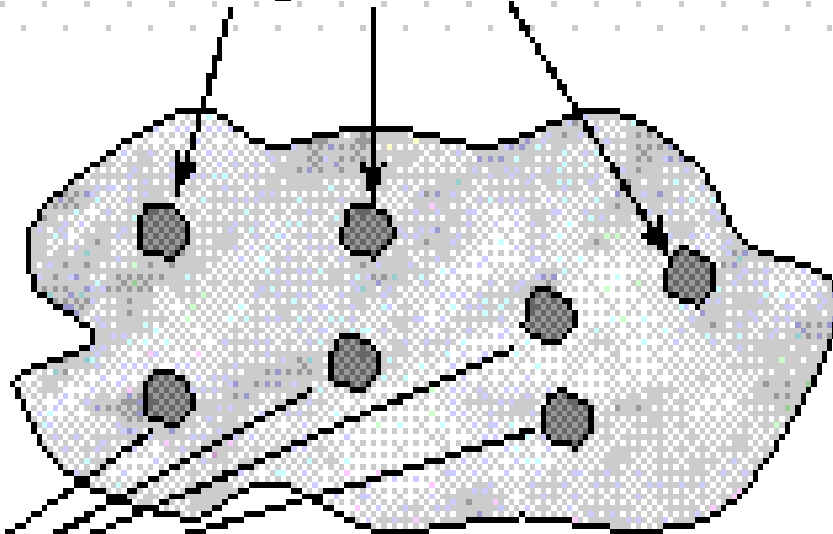


каллус

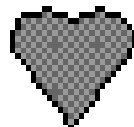
эмбриогенез



очаги эмбриогенных клеток



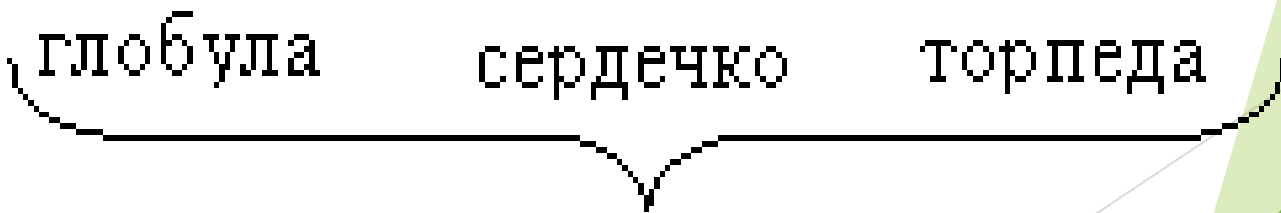
глобула



сердечко



торпеда



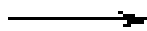
стадии развития эмбрионов

## 4-й метод

- ▶ диференціація адвентивних бруньок в первинній та пересадковій калусних тканинах



калус



почки



растение-регенерант

# ФАКТОРИ

Рослина  
донор

Фізіологічні та  
генетичні

Умови  
культиву-  
вання

Фізичні та хімічні

Умови  
культиву  
вання

Фітогормональні



# Генетичні і фізіологічні чинники

- ▶ Генотип
- ▶ Вік рослини-донора
- ▶ фізіологічний стан
- ▶ (Вегетація, спокій)
- ▶ предоброботка
- ▶ Розмір експлантов



# Фізичні та хімічні умови

- ▶ Кислотність середовища культивування
- ▶ Мінеральні компоненти (нітроген)
- ▶ Вуглеводне живлення
- ▶ Освітленість, фотоперіод, спектральний склад світла
- ▶ Температура культивування



# Фітогормональний баланс

- ▶ Ауксини ІОК, ІМК, НУК, 2.4 Д
- ▶ Цитокініни БАП, кінетин
- ▶ Співвідношення ІОК / БАП
- ▶ ІОК < БАП - адвентивне пагоноутворення
- ▶ ІОК > БАП - ризогенез



Download from  
Dreamstime.com

This watermarked comp image is for previewing purposes only.

ID 39982992

© Khwanchai Suksaen | Dreamstime.com

# Переадаптація (I стадія) (тривалість 10-20 діб)

## Особливості живильного середовища

- ▶ Збіднений склад мінеральних компонентів (1/2 МС)
- ▶ Зниження концентрації сахарози (1%)
- ▶ Зміна фітогормонального балансу
- ▶ Внесення ретардантів росту та адаптогенів
- ▶ Мікоризація та бактеризація

## Особливості умов культивування

- ▶ Збільшення інтенсивності освітлення (8-10 клк)
- ▶ Зниження вологості повітря
- ▶ Зниження температури культивування

# Переадаптація II стадія (тривалість 20-80 діб)

- ▶ Рекомендації:
- ▶ Використання приміщень з контрольованими умовами культивування (температура, вологість повітря, освітленість)
- ▶ Використання спеціальних ґрунтів (вермікуліт)
- ▶ Засоби, що знижують зневоднення рослин
- ▶ Обробка препаратами протибактеріальної та фунгіцидної дії
- ▶ Регулярні підкормки комплексними добривами

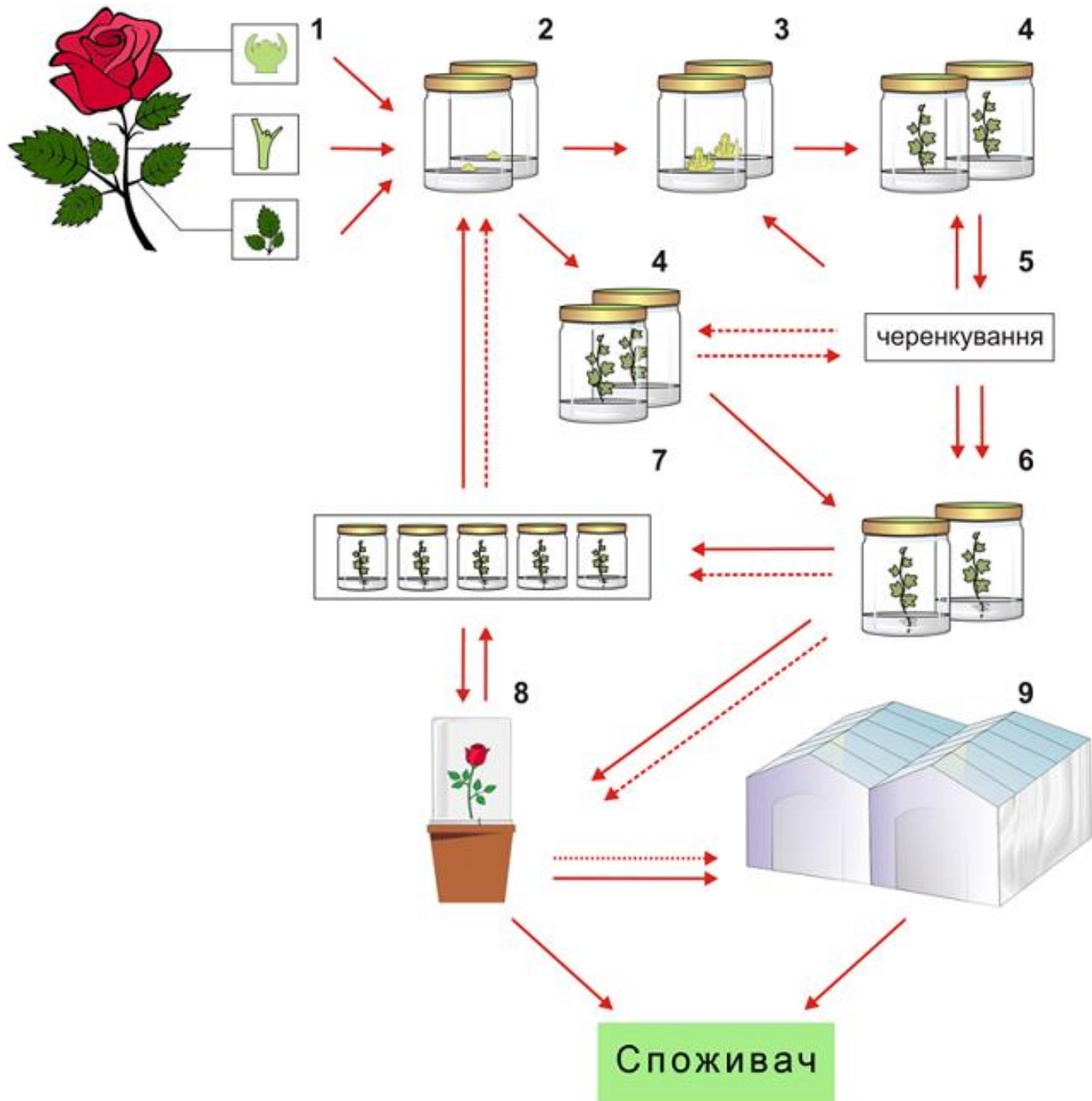


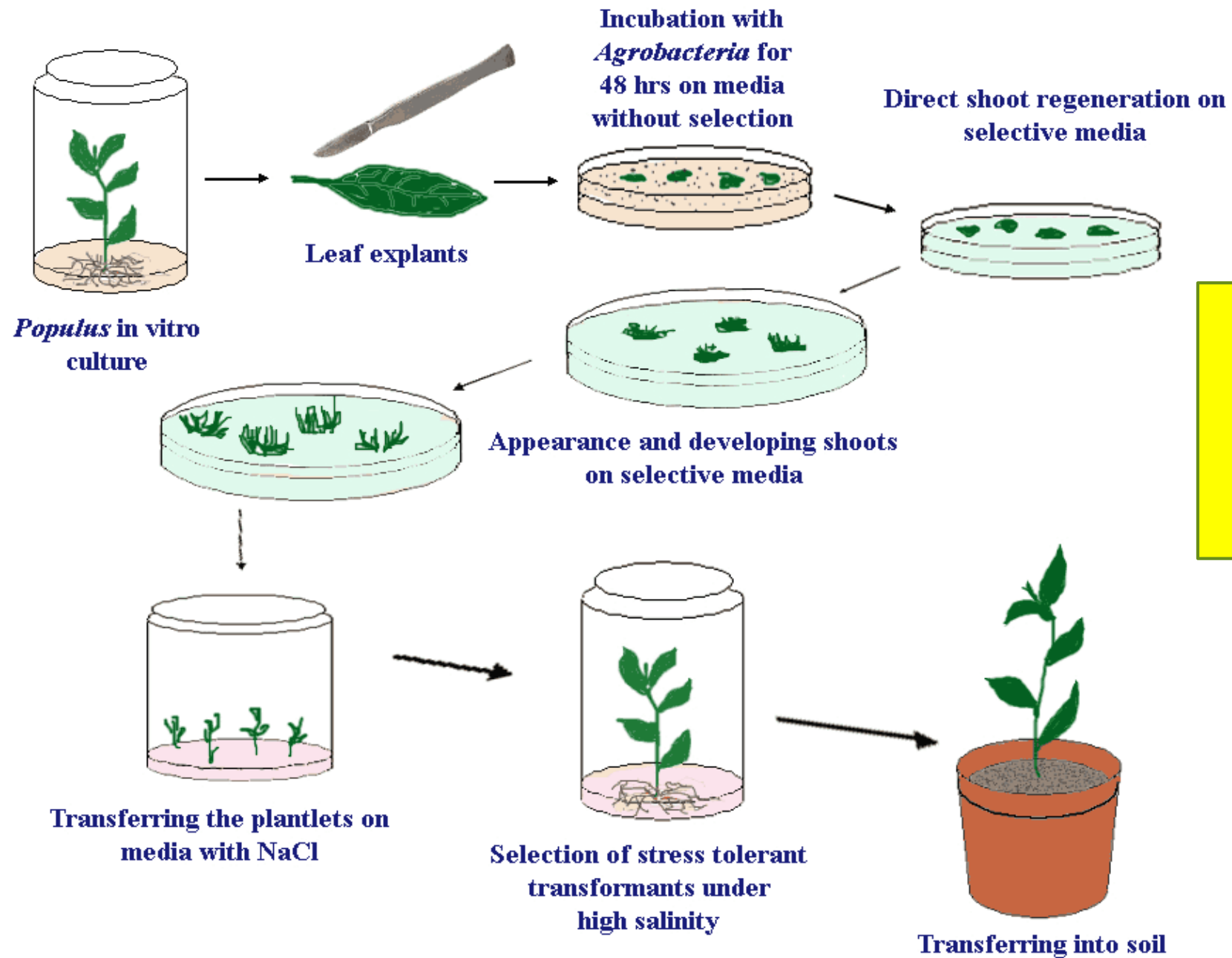
Схема  
мікроклонального  
розмноження  
Троянди  
ефіромасличної

# Особливості мікроклонального розмноження деревних культур

- Культивування тканин деревних рослин має ряд труднощів:
- Повільне зростання
- Погане вкорінення
- Високий вміст фенольних сполук, які призводять до пригнічення росту експлантів
- Вік дерева-донора значно сповільнює регенерацію тканин
- Накопичення внутрішньої інфекції
- Але незважаючи на перераховані труднощі, до теперішнього часу налічується понад 200 видів деревних рослин з 40 родин, які були розмножені *in vitro* (каштан, дуб, береза, клен, осика, секвойя, тополь, деякі хвойні та ін.)



Вкорінені  
мікроклони  
Дуба черешчатого



Microclonal propagation and genetic transformation of *Populus* sp. for improving the abiotic stress tolerance



📍 Подольск

360°  
ПОДМОСКОВЬЕ



# Оздоровлення рослинного матеріалу

- ✓ До 30 % втрат врожаю сільськогосподарських культур можуть викликати вірусні захворювання
- ✓ Картопля схильна до ураження багатьма вірусами (X, Y, S, F, M, A, L і ін.) Ці віруси викликають такі хвороби картоплі, як мозаїка листа, скручування листа картоплі, зморшкувата мозаїка, жовта карликовість та ін.
- ✓ Від хворої рослини до здорової віруси передаються **двома шляхами**: контактним і комахами через їх ротовий апарат, що містить мікрокраплі соку і, відповідно, вірусні частинки
- ✓ Майже всі віруси, потрапивши в організм рослини, деякий час можуть перебувати в прихованому стані, не викликаючи зовнішніх симптомів
- ✓ Інфекція знижує врожайність культури, вміст крохмалю в бульбах, впливає на інші якісні показники
- ✓ Уражені рослини самі стають джерелом інфекції

# Отримання безвірусного посадкового матеріалу

- Багато з вірусів поширюються **по флоемним елементам**, і на цій властивості засновано оздоровлення рослин in vitro
- Апикальні меристеми пагонів вільні від вірусів, в них не має диференційованих **флоемних елементів**, вона майже вільна від вірусної інфекції
- Концентрацію вірусів можна знизити також, витримуючи рослини при підвищеній температурі (**термотерапія**), або обробляючи їх речовинами, які інгібують розвиток вірусів (**хемотерапії**)
- Метод апікальних меристеми в поєднанні з термо- і хемотерапією є найбільш ефективним способом оздоровлення рослин
- Сучасне насінництво картоплі засноване на біотехнологічному методі апікальної меристеми звільнення від вірусних та інших хвороб
- Схема виробництва безвірусних бульб включає отримання мікророслин (клонів ) картоплі, потім висадку їх в теплиці або під укриття для уникнення контакту з комахами, в результаті чого отримують супер-супер еліту (зазвичай у вигляді мікробульб)
- Під час висадки мікробульб отримують суперелітний матеріал у вигляді мінібульб, а потім бульб звичайних розмірів

# Схема получения микроклубней *in vitro*

## 1. Получение субкультуры и размножение

Вычленение апикальной меристемы



Материнское растение



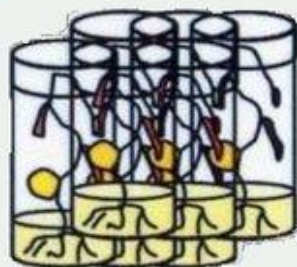
Получение субкультуры через 2-4 недели



## 2. Получение микроклубней *in vitro*



Содержание в темноте в течение 1 месяца



Формирование микроклубней

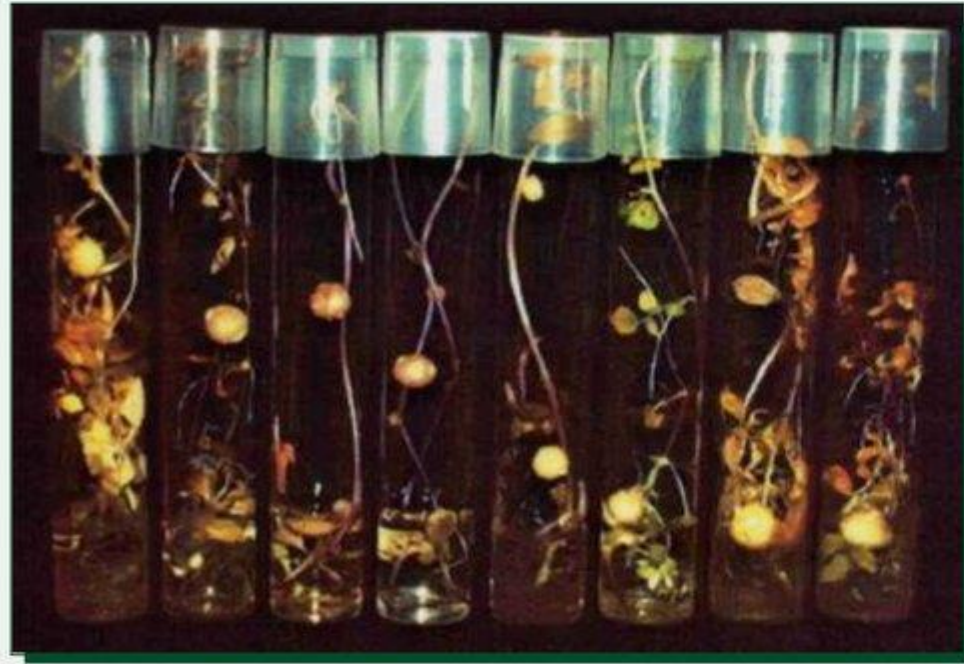


Сохранение при +4 °С

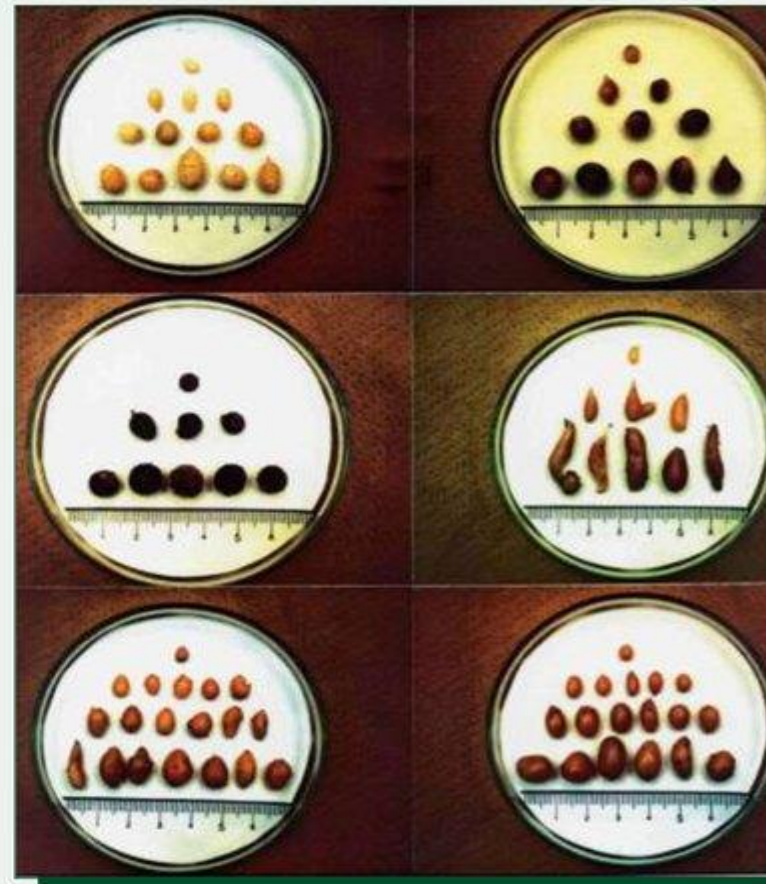
# Оздоровлення шляхом термо- та хемо-(хіміо-) терапії

- ▶ Відібрані візуально здорові маткові рослини до введення в культуру додатково перевіряють на наявність основних вірусів з використанням різних методів: біотестів (зараження рослин-індикаторів, тобто особливо чутливих до патогену), електронної мікроскопії, імуноферментного аналізу (ІФА) - ELISA (від англ. enzyme linked immunosorbent assay)
- ▶ Останнім часом знаходять застосування методи, засновані на аналізі нуклеїнових кислот патогенів: електрофорез, in situ гібридизація в поєднанні із застосуванням різних міток (наприклад, NASH - nucleic acid spot hybridization), варіанти ПЛР-аналізу (наприклад, RT-PCR - reverse transcription polymerase chain reaction)
- ▶ Культуру in vitro апікальних меристем отримують, виокремлюючи в умовах асептики під біокулярним мікроскопом верхню частину конуса наростання стебла розміром близько 200 μm і поміщаючи його на щільне живильне середовище
- ▶ У живильне середовище, крім цитокінінів і ауксинів, додають невелику кількість гібереліну. Культивування проводять на світлі. Чим більше листових зачатків має експлантат, тим легше він приживається на живильному середовищі, краще йде регенерація з нього проростків.
- ▶ Однак якщо стоїть завдання отримати вільні від вірусів рослини-регенеранти від хворих рослин або є підозра, що будь-які віруси не були виявлені при оцінці маточних рослин, розмір експлантати повинен бути якомога менше.
- ▶ Ефективність оздоровлення залежить не тільки від розміру експлантати, але і виду вірусу. Так, шляхом культивування апікальної меристеми картоплі вдалося отримати 70% рослин-регенерантів, вільних від Y-вірусу картоплі (PVY), і тільки 10% рослин без X-вірусу (PVX).

*Микроклубни картофеля  
Solanum tuberosum различных  
сортов*



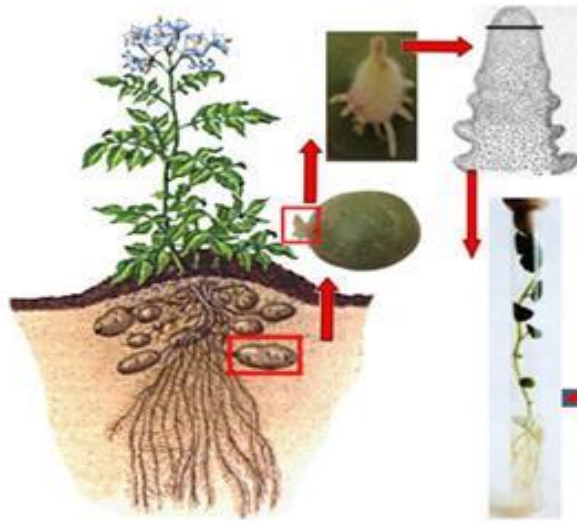
*Получение микроклубней  
картофеля  
Solanum tuberosum  
в пробирках*



# Оздоровлення шляхом термо- та хемо-(хіміо-) терапії

- ▶ Для підвищення ефективності оздоровлення від вірусної інфекції за допомогою культури меристем маткові рослини перед вичленовуванням експлантатів піддають **термотерапії** - тривалого впливу підвищених температур
- ▶ Термотерапію проводять в кліматичних камерах при температурі 37 °С і відносній вологості 90%; при освітленості рослин близько 5 тис. люкс; при фотоперіоді 16 ч. Протягом першого тижня рослини поступово адаптують до підвищених температур, щодня підвищуючи її на два градуси з 25 до 37 °С. Тривалість термотерапії різна в залежності від виду рослин і вірусів
- ▶ Застосування термотерапії в поєднанні з культурою меристем дало можливість отримати більше 70% вільних від вірусів рослин-регенерантів хмелю, 90% рослин суниці, 25% рослин чорної і червоної смородини, 50% малини, більше 80% рослин картоплі

# Оздоровление картофеля от вирусов методом культуры апикальной меристемы



Миниклубни картофеля



Микроклубни картофеля (длина линейки- 1см)



# Оздоровлення шляхом термо- та хемо- (хіміо-)терапії

- ▶ Однак більшість видів рослин погано переносять підвищені температури при підвищеній вологості нерідко рослини гинуть задовго до закінчення теплового впливу. Багато вірусів стійких до термотерапії (наприклад, з вірусів картоплі тільки вірус скручування листа PLRV чутливий до підвищеної температури)
- ▶ В окремих випадках досить ефективним методом оздоровлення посадкового матеріалу є не тепла, а холодова обробка рослин  $t=+4\text{ }^{\circ}\text{C}$
- ▶ Інший спосіб, який застосовується для звільнення рослин від вірусів в поєднанні з культурою меристем, - **хемотерапія** (також використовується термін «**хіміотерапія**»). Він полягає в додаванні в живильне середовище, на якому культивують апікальні меристеми, різних речовин, які проявляють протівірусну активність
- ▶ Найчастіше для цього використовують синтетичні аналоги пуринових і піримідинових основ: цианогуанозін, 2-тиоурацил, Д-рібофуранозіл-1,2,4-триазол-карбоксимід (комерційна назва - віразол), а також інтерферон, рідостин (рібонуклеат натрію), біназ (мікробна рибонуклеаза), фенолкарбонові кислоти: саліцилову, галову, бузкову, кавову, ферулову, кумарову
- ▶ Позитивні ефекти хемотерапії відзначені для ряду деревних і чагарникових культур (черешні, сливи, малини, смородини), деяких квіткових культур. Застосування хемотерапії дає можливість підвищити ефективність оздоровлення рослин від вірусів за допомогою культури меристем з 40 до 80-100%.