**Лекция 1**

**Основные селекционные задачи,**

**решаемые с помощью** **методов биотехнологии**

Биотехнологические методы в селекции растений стали применяться примерно с середины минувшего столетия, и значение их непрерывно возрастает, поскольку био­технологии под силу задачи, которые тра­диционными методами селекции решить невозможно или чрезвычайно трудно. Уже сейчас достигнуты впечатляющие резуль­таты: миллионы гектаров в мире занима­ются ежегодно сортами и гибридами, по­лученными с помощью биотехнологии.

Отличительным признаком биотехно­логических методов, используемых в се­лекции растений, является манипуляции in vitro.

Все методы биотехнологии могут в той или иной степени быть использованы в практической работе как на отдельном ее этапе, так и на всех этапах селекции, само­стоятельно или комплексно в зависимости от задач и степени кооперации селекцио­неров и биотехнологов.

Основные селекционные задачи, решае­мые с помощью методов биотехнологии, следующие:

-создание нового исходного материала для селекции;

-ускорение селекционного процесса за счет быстрой гомозиготизации генотипа после проведения скрещива­ния или получения самоопыленных линий при селек­ции гетерозисных гибридов, сокращения ряда селек­ционных питомников;

-повышение эффективности отбора ценных генотипов за счет 1)целенаправленной интрогрессии генов, 2)сниже­ния негативного влияния «генетического груза» по­пуляции иповышения ее селекционной ценности, 3)по­стоянного контроля за наличием ценных генотипов в отбираемом селекционном материале;

-снижение трудоемкости селекционных работ за счет уменьшения популяций для отбора и сокращения ряда селекционных питомников.

Большой и важный раздел клеточной биотехноло­гии — оздоровление посадочного материала от вирусов и некоторых болезней, однако непосредственно селекции это не касается.

**Биотехнологические методы,**

**применяющиеся** **в селекции растений**

Все биотехнологические методы, которые применяют­ся в селекции растений, можно разделить на две группы:

-использование культуры клеток и тканей и

-генетическую (генную) инженерию.

Последнюю принято рассматривать отдельно.

Существуют три вида культуры клеток и тканей:

* каллусная культура;
* культура клеток и агрегатов клеток;
* культура протопластов.

Они могут быть использованы по отдельности или со­ставлять технологическую цепочку, располагаясь в той последовательности, в которой из одного вида получают другой.

Применение культуры клеток и тканей в селекции рас­тений основывается на фундаментальном положении о **тотипотентности** любой клетки — т.е. **способно­сти воспроизвести растительную форму, которой клетка принадлежит, со всеми ее генотипическими и фенотипи­ческими особенностями**. Представление о тотипотентно­сти клетки было выдвинуто и теоретически обосновано Г. Габерландтом, известным немецким физиологом расте­ний, в самом начале прошлого века и впоследствии полу­чило экспериментальное подтверждение.

Получение культуры клеток и тканей чаще всего осу­ществляется через каллусную культуру. Технология по­лучения этим способом и поддержания культуры клеток и тканей в самых общих чертах заключается в следую­щем.

1. Эксплант (фрагмент растительной ткани или орга­на, включающий различные ткани) помещают на/в искус­ственную питательную среду. Все операции проводят в стерильных условиях: эксплант обеззараживают, а среду готовят в условиях, исключающих заражение. В качест­ве экспланта можно использовать фрагменты запасающей паренхимы, других тканей корня, стебля, листа, просто участки этих органов, участки зародыша и даже пыльни­ки. Разработан состав большого количества питательных сред, в которые входят сахара как источник питания, мак­ро- и микроэлементы в виде минеральных солей, витами­ны, фитогормоны и некоторые другие вещества. Иногда в качестве добавок применяют эндосперм кокосового оре­ха, сок или экстракты из различных органов растений ради содержащихся там физиологически активных ве­ществ.

Для получения каллусной ткани эксплант помещают на полутвердую питательную среду на основе агар-агара или других желирующих веществ (применяют и жидкие среды). Каллусная ткань возникает на поверхности экс- планта или в его толще (тогда она обычно разрывает ткань экспланта и выходит на его поверхность). Клетки каллу­са не имеют определенной структуры, их рост беспорядо­чен, поскольку они утрачивают специализацию, свойст­венную ткани экспланта, из которой получены.

2. Для получения суспензионной культуры клеток каллусную ткань переносят в жидкую питательную среду и перемешивают. В результате каллус распадается на от­дельные клетки и агрегаты клеток. Если хотят получить клоны из отдельных клеток, освобождаются от агрегиро­ванных клеток. Этого можно достичь фильтрацией через фильтры с уменьшающимися порами или другими спосо­бами. В результате деления обособленной клетки (деление клеток инициируется различными способами) образуется колония генетически одинаковых клеток — клон, которую можно пересадить на агаризованную питательную среду. Отдельные клетки можно получить непосредственной ма­церацией тканей растения, минуя каллусную культуру.

3. Культуру изолированных протопластов можно полу­чить как из культуры клеток, так и из тканей растений, используя такие ферменты, как пектиназа и целлюлаза и другие вещества, разделяющие клетки и разрушающие клеточную оболочку.

Культуры каллусной ткани, суспензионные культуры клеток (клеток и агрегатов клеток), культуры протопла­стов представляют собой материал, который применяется в селекционной работе. Во-первых, можно воспользовать­ся генетическим разнообразием культуры. Само по себе обособление клеток или их протопластов часто означает появление новых генотипических вариантов, которые либо уже существовали в тканях исходного растения, либо появились в порядке спонтанных мутаций. При этом му­тагенными факторами могут выступать вещества, входя­щие в состав культуральных сред, и сама дезинтеграция ткани. Генетическая неоднородность клеток исходного растения наблюдается в специализированных тканях и большей частью заключается в кратном увеличении набо­ра хромосом, что, очевидно, представляет какое-то при­способление, связанное с функциональными особенностя­ми ткани. Это могут быть и соматические мутации, не реа­лизуемые через половой путь.

Во-вторых, мутационная изменчивость может быть индуцирована мутагенами, применяемыми в обычной се­лекции: физическими — рентгеновским, гамма- и ультра­фиолетовым излучением; химическими: этилметансульфонатом, нитрозометил- и нитрозоэтилмочевиной и др. При этом подбирают дозы, концентрации и экспозиции, обес­печивающие высокий выход мутантов и не вызывающие чрезмерно большой гибели клеток.

В-третьих, путем слияния протопластов клеток раз­личных растительных форм и видов (соматическая гиб­ридизация) могут быть получены гибридные протопласты, а затем и клетки, так как клеточная оболочка спонтанно восстанавливается. Слияние протопластов стимулирует­ся добавлением в среду этиленгликоля, значительной кон­центрацией двухвалентных ионов, высоким значением рН, лазерным облучением. Предварительное облучение гамма-лучами или другим ионизирующим облучением протопластов донора полезных свойств, но обладающего вместе с тем многими отрицательными характеристика­ми, что бывает особенно при привлечении в качестве до­нора дикорастущих форм, часто позволяет устранить часть ядерного материала последнего. Но эта дозировка контро­лю не поддается. В отдельных случаях ядерный материал одного из партнеров может быть полностью элиминиро­ван и тогда гибридной остается только цитоплазма — по­лучается цибрид.

Отбор различных генетических вариантов осуществ­ляется переносом (пассированием) клеточных клонов, которые в биотехнологии принято называть сомаклонами (соматическими клонами), поскольку при получении их не использовался половой путь, на новую среду для их разделения и получения из них растений.

Более целенаправленный подход заключается в том, что в культуральную среду может быть введен селектив­ный фактор, который позволяет отобрать клетки, устой­чивые к нему, другие же погибают или прекращают делить­ся. Клоны клеток, продолжающихся делиться, несмотря на присутствие селективного фактора, подвергают неодно­кратным пассажам на среды без этого фактора, а затем вновь испытывают на устойчивость к селективному фак­тору на соответствующей среде. Таким образом, избавля­ются от клонов, у которых устойчивость носила эпигене­тический характер – не наследуемый или изменение экспрессии генов, носящей характер длительной модификации. Так, при селекции картофеля на устойчивость к черной ножке стабильно ус­тойчивой оказалась только половина клонов.

Селективным фактором при селекции на устойчивость к болезням может быть токсин, выделяемый патогеном.

При селекции на устойчивость к грибам из рода *Fusarium* используют фузариевую кислоту. Формы овса, устойчи­вые к *Helmintosporium victoriae*, получены с помощью токсина этого гриба. Для аналогичной цели был исполь­зован Т-токсин гриба *Helmintosporium maydis*, поражаю­щий кукурузу с техасским типом ЦМС. Вместо чистого токсина можно применять культуральные фильтраты из культуры патогена, содержащего токсин.

При селекции на солеустойчивость в культуральную среду добавляют NaCl или Na2SO4, в зависимости от того, на хлоридное или сульфатное засоление ориентируются при возделывании культуры. При селекции на устойчи­вость к кислым почвам, в зависимости от характера ки­слотности, подкисляют культуральную среду или добав­ляют в нее ионы алюминия.

**Использование в культураль­ной среде селективного фактора — фактора естественного отбора на клеточном уровне — получило название клеточ­ной селекции, хотя правильнее было бы говорить о кле­точном отборе.**

Спонтанно возникшие генетические варианты клеток, варианты, индуцированные применением мутагенов, гиб­ридные клетки, полученные от слияния протопластов, имеют значение для селекции только в том случае, если из них удается вырастит растения-регенеранты (см. цв. вкл., ил. 8).

Способность к регенерации инициируется с помощью специальных сред, на которые или в которые (при глу­бинном культивировании) переносят культуру клеток. Растения можно получить и прямо из культуры каллу­сов, не прибегая к культуре клеток и их агрегатов. Но в этом случае велики шансы на возникновение химерности, осложняющей дальнейшую селекционную работу.

Реге­нерация начинается с организованного роста, который возникает не по всему клону (или каллусу), а очагами, либо в виде меристем с последующим развитием из них орга­нов растения, либо в виде зародышеподобных структур — эмбриоидов, образующих впоследствии проросток. На этом этапе тоже возможно применение селективных сред — так, например, вели селекцию на устойчивость к клеверному раку во ВНИИ кормов. Причины того, что одни клетки оказываются способными перейти к организованному рос­ту и дифференциации, а другие — нет, пока неясны. При многократном пассировании каллуса или клеточного кло­на часто наблюдается потеря способности к регенерации.

Процент регенерантов сильно зависит от вида расте­ния. Одни сельскохозяйственные культуры (табак, кар­тофель, томат, люцерна, морковь, капуста) дают высо­кий процент регенерантов, другие (зерновые злаки) — единичные случаи. Последнее обстоятельство — один из главных факторов, сдерживающих применение культу­ры клеток и тканей в селекции. Считают, что лишь одна из 400...1000 клеток регенерирует в растение. Но это еще не значит, что такое растение будет представлять селек­ционную ценность. Так, в одной работе с табаком (куль­тура, у которой процент регенерантов наиболее высок) было использовано около 46 млн клеток и их протопла­стов, а выделено только три растения, устойчивых к бактериальной рябухе. Несравненно меньше шансов по­лучить растения-регенеранты с каким-либо хозяйствен­но ценным свойством.

К селекции в культуре клеток непосредственно при­мыкает пыльцевая селекция. В этом случае имеют дело с отдельной популяцией клеток, что упрощает работу. Как и при клеточной селекции, используют селективный фак­тор. Регенерировавшие растения будут гаплоидными, и их приходится обрабатывать раствором колхицина для пере­вода на диплоидный уровень, если только не наблюдается спонтанная диплоидизация. В экспериментах было пока­зано, что пыльца растений озимой пшеницы, менее устой­чивых к фузариозу, погибает при меньших концентраци­ях токсина, чем пыльца более устойчивых. Если нанести на рыльце пестика каплю раствора с селективным факто­ром и произвести опыление избытком пыльцы, есть шан­сы получить гетерозиготу с аллелями устойчивости и при этом обойтись без получения растений-регенерантов. Но этот метод пока не испытан, а пыльцевая селекция в це­лом пока в стадии эксперимента и результатов в селекции еще не дала.

Потомство растений-регенерантов должно быть вклю­чено в обычный селекционный процесс. Прежде всего необходимо проверить, сохранилось ли у растения то цен­ное свойство, которое было обнаружено в клоне клетки в результате клеточной селекции (устойчивость к болезни, солеустойчивость и т. д.). Дело в том, что устойчивость или другое свойство клетки может быть не эквивалентно свой­ству целостного растения, на уровне которого могут дей­ствовать надклеточные механизмы. Например, устойчи­вость к болезни может зависеть от воскового налета, осо­бенностей кутикулы и т. д. Однако отмечены случаи, когда устойчивость клетки и полученного из нее растения сов­падают, например устойчивость к гербицидам, высоким концентрациям ионов алюминия. Естественно, что полу­ченный таким образом материал, помимо свойств, кото­рые удалось отселектировать в культуре клеток, должен обладать целым комплексом хозяйственно ценных при­знаков и свойств. Только в этом случае он может претен­довать на статус сорта. В других случаях отбор из культур клеток и тканей должен рассматриваться как предбридинг, и работа с потомством сомаклона должна заключать­ся в получении нового материала для отбора уже обычны­ми селекционными методами (гибридизация и т. д.). По­томство сомаклона может быть использовано и как донор ценных свойств (например, устойчивости к болезням при гибридизации). Если речь идет о перекрестноопыляющейся культуре, потомство сомаклона должно быть переопы­лено другими формами во избежание инбредной депрес­сии, а полученная популяция пройти отбор (отборы), ха­рактерный для перекрестников.

Использование культуры клеток (всех ее видов) в се­лекции уже дало определенные результаты, хотя во мно­гих случаях пока приходится говорить о предваритель­ных исследованиях (например, по гибридизации прото­пластов).

На Гавайях в культуре клеток были отобраны клоны сахарного тростника, устойчивые к ложной муч­нистой росе и вирусным болезням. Получен сорт сахарно­го тростника, устойчивый к болезни Fiji. Подобные ре­зультаты по отношению к некоторым болезням картофе­ля достигнуты в России и США. У картофеля получены сомаклоны с более высоким содержанием крахмала и бел­ка в клубнях, чем у исходного сорта Зарево. У картофеля, томата, ячменя, люцерны, пшеницы с помощью селектив­ных фонов получены формы, относительно устойчивые к грибам из рода *Fusarium*. У риса, пшеницы и ячменя — к грибам из рода *Helmintosporium*. У картофеля — к фитофторозу, кольцевой гнили и черной ножке. У риса — к пирикулярии. У пшеницы, риса, картофеля получены со­леустойчивые формы, у моркови — формы с очень высо­ким содержанием некоторых незаменимых аминокислот (в питательную среду добавляли их токсичные аналоги).

Биотехнологические манипуляции на клеточном уров­не используются и в других селекционных технологиях:

- для оплодотворения в искусственных условиях,

-выращи­вания гибридных зародышей,

-получения гаплоидов,

-микроклонального размножения,

-криосохранения клеток рас­тений.

К оплодотворению in vitro на питательной среде прибегают, когда по каким-либо причинам обычным пу­тем оно не происходит (часто бывает при отдаленной гиб­ридизации). На питательную среду переносится завязь или кусочки плаценты с семяпочками. На них наносят созрев­шую пыльцу. Метод был успешно применен при отдален­ной гибридизации в роде *Tabacum*. Разрастание семяпо­чек указывает на то, что оплодотворение произошло.

При отдаленной гибридизации часто наблюдается ги­бель гибридного зародыша. Причина заключается в том, что зародыш не может развиваться, поскольку эндосперм не способен обеспечить его нормальное питание. Однако если перенести его на питательную среду, зародыш нор­мально формируется и способен к прорастанию, это так называемая эмбриокультура. Метод был использован при получении гибридов между видами льна *Аustriacum и Linum perenne*. Культура зародышей применяется в селек­ции овощных растений — у лука, томата и др.

**Вопросы и задания для самоконтроля**

1. Перечислите основные селекционные задачи, решаемые с помощью методов биотехнологии.
2. Какие биотехнологические методы применяются в селекции растений, какие получены результаты?