

УДК 634.23:581.17

БИОТЕХНОЛОГИЯ В СЕЛЕКЦИИ, РАЗМНОЖЕНИИ И СОХРАНЕНИИ РАСТЕНИЙ

©Т.В. Плаксина, Г.Н. Пищева

Научно-исследовательский институт садоводства Сибири

им. М.А. Лисавенко, Горно-Алтайск, Россия

e-mail: tplaksina@mail.ru

Технологии *in vitro* позволяют: достичь высокого уровня мультипликации растительного материала; освободить от вирусных, бактериальных, грибных заболеваний; продолжительно хранить растительный материал в асептических условиях; экономить площади под коллекциями и снижать затраты труда для их поддержания. Возможности создания банка культур *in vitro* для длительного хранения генофонда растений является достижением биотехнологии. На примере плодовых, ягодных и цветочных культур продемонстрирована возможность использования методов эмбриокультуры и микроразмножения *in vitro* для сохранения и размножения перспективных и ценных генотипов.

Ключевые слова: биотехнология, методы сохранения и размножения *in vitro*.

С конца 80-х годов прошлого века методы биотехнологии *in vitro* применяют для сохранения генофонда растений и используют в селекционных программах.

В настоящее время считается, что на Земле существует 300 тыс. видов высших растений. В середине XX века для получения технического сырья использовалось 2062 вида, для пищевых целей – 2558, кормовых – 1567, садово-декоративных – 5741 (Куприянов, 2013). Сохранение диких сородичей для притока генов, создание коллекций сельскохозяйственных культур позволит осуществлять успешные программы по селекции растений. Генофонд плодовых, ягодных и декоративных культур представлен преимущественно полевыми коллекциями и сосредоточен в ботанических садах, дендрариях и научно-исследовательских институтах, что несет за собой ряд проблем:

- возможности обмена генофондом ограничены из-за риска передачи болезней;
- создание и хранение гермоплазмы в полевых генных банках высоко затратны;

– требуются большие площади;

– коллекции нуждаются в тщательном и своевременном уходе с использованием ручного труда.

Современные технологии *in vitro* дают возможность более эффективно организовать эту работу и позволяют:

- достичь высокого уровня мультипликации растительного материала;
- освободить от вирусных, бактериальных, грибных заболеваний;
- продолжительно хранить растительный материал в асептических условиях;
- экономить площади под коллекциями и затраты труда для их поддержания.

Все применяемые методы биотехнологии можно разбить на две группы – вспомогательные и самостоятельные. К первой группе относятся микроразмножение; культура семян; зародышей; пыльников; микроспор; завязей, а также криосохранение клеток, тканей и органов. Ко второй – клеточная селекция с использованием каллусной ткани, соматическая гибридизация и генная инженерия.

В нашей стране и за рубежом успешно работают питомники, где созданы лаборатории биотехнологии, широко использующие методы *in vitro* для размножения плодовых, ягодных и декоративных растений (Куликов, 2005; Данилова, 2007). На сегодняшний день практически в каждом ботаническом саду и научно-исследовательском институте имеется лаборатория биотехнологии, но по данным Engelmann и Engels (2002) коллекции *in vitro* поддерживают лишь 2% ботанических садов. Возможности создания банка культур *in vitro* для длительного хранения генофонда растений является достижением биотехнологии. Формирование оздоровленных коллекций растений на основе применения методов *in vitro* позволяют более широко использовать их для обмена, в том числе и международного (Вечернина, 2004).

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко» (НИИСС) – единственный за Уралом научно-исследовательский институт, занимающийся селекционной работой по созданию сортов плодовых, ягодных и цветочных культур для суровых климатических условий Алтайского края и Западной Сибири. На сегодняшний день в селекционном Центре института ведутся исследования по 13 плодовым и ягодным культурам, в коллекции насчитывается 4681 сортообразцов, а в селекционных садах – 156650 гибридных сеянцев. В Центре декоративного садоводства создана богатая коллекция многолетних цветов, кустарников и деревьев, насчитывающая более 2355 видов и сортов. Селекционерами института создано 390 сортов плодовых и ягодных культур, в том числе, первые в мире сорта облепихи и калины, 61 – цветочных.

Для повышения эффективности

селекционной работы широко используются различные методические приемы. С начала 80-х годов в НИИСС были начаты исследования по культуре тканей *in vitro*, которые смогли бы стать вспомогательным инструментом в селекционных программах по облепихе, вишне, сливе, яблоне, землянике и другим культурам. Перед биотехнологами были поставлены задачи сохранения и размножения ценных генотипов растений с помощью методов эмбриокультуры и клонального микроразмножения. Первый метод позволяет проращивать сеянцы на искусственных питательных средах из семян, которые при обычных условиях выращивания не дают полноценных всходов, а второй – получать множественные копии растений фенотипически и генотипически идентичные растению, из которого они произошли (Здруйковская-Рихтер, 2003; Джигадло, 2004; Миронова, 2004; Кухарчик и др., 2006; Высоцкий, 2011).

Использование современных методов биотехнологии *in vitro* в селекционной работе НИИСС позволило сохранить и размножить ценные генотипы растений, после направленной гибридизации, заложить маточные насаждения перспективными отборными формами и сортами таких культур как земляника, вишня, смородина, ирисы, примула и другие.

На сегодняшний день в НИИСС сохраняется такой комплексный подход в решении селекционных задач, когда селекционер работает совместно с биотехнологом. Таким примером может служить работа по культуре вишни.

Эмбриокультура и микроразмножение гибридов вишни (*Cerasus* Juss.).

Гибридный фонд вишни на Алтае постоянно пополняется новыми оригинальными генотипами, в том числе,

гибридами сложного генетического происхождения и пloidности, не имеющими аналогов в европейской части страны и за рубежом. Эти формы при скрещиваниях часто дают нежизнеспособные семена, что снижает эффективность селекции, поэтому применение метода *in vitro* повышает выход гибридных растений. При подборе состава питательных сред необходимо учитывать то, что в процессе роста и развития зародыша происходит эндогенное изменение содержания цитокининов, ауксинов и гиббереллинов. Все эти вещества тесно взаимодействуют между собой. По мере созревания семян и плодов у вишни наблюдается снижение концентрации гиббереллинов и замена их абсцизовой кислотой (Гусев, 2006). Известно, что при переходе к покою содержание гиббереллинов, ауксинов, цитокининов в зародыше снижается, при прорастании – повышается (Гамбург, 1990).

При культивировании зародышей, гибридов сложного происхождения, необходимо обращать внимание на степень их зрелости. Если зародыш переступает порог относительной автономности, то он становится не зависимым от гормонов, углеводов, витаминов и других веществ, обеспечиваемых материнским организмом. Это подтверждено работами с эмбриокультурой у разных представителей цветковых растений (Батыгина, Васильева, 2002), поэтому при работе с зародышами вишни мы брали семена до полного их созревания, когда плоды еще не окрашены, мякоть плотная. В зависимости от погодных условий это приходилось на 45-й – 50-й день после опыления.

Культивирование изолированных зародышей указанного срока на питательных средах с регуляторами роста позволяет регулировать процессы их роста и развития.

Испытано влияние разных концентраций регуляторов роста в питательной среде Мурасиге-Скуга (МС) на развитие изолированных зародышей через 50 дн. после опыления (рис.1).

Меньше всего проросло зародышей на среде, в которой в качестве стимуляторов роста использовали 6-БАП 2,0 мкМ+НУК 0,2мкМ+ГКЗ 0,5мкМ (среда 6) и на среде с одним цитокинином (среда 2). Оптимальной оказалась среда 3, где в качестве ауксина использовали ИМК 0,2 мкМ совместно с 6-БАП 2,0 мкМ и ГКЗ 0,5 мкМ. На этой среде 53,8 % зародышей продолжили свой рост и через 30 дней культивирования формировали побег с листьями (рис. 2).

На среде с одним цитокинином у зародышей отдельных генотипов наблюдали образование дополнительных побегов (от 1 до 5 на один зародыш) (рис. 3). Это является

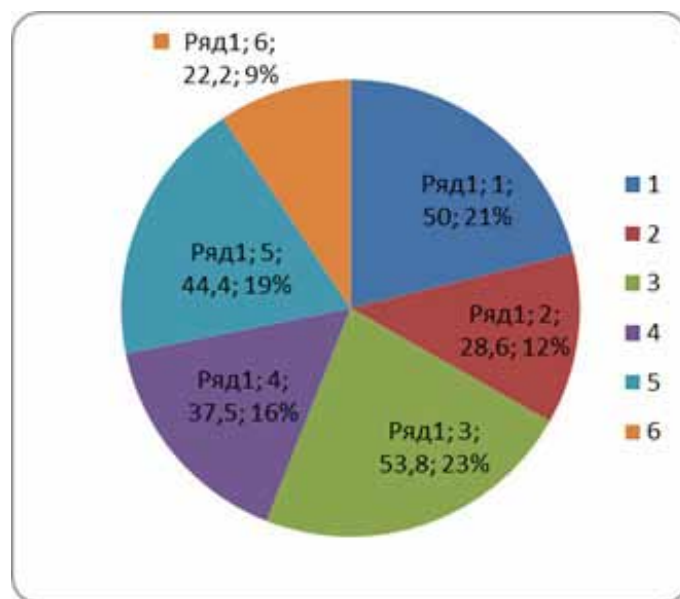


Рис. 1. Прорастание зародышей вишни в зависимости от гормонального состава питательной среды, %.

Условные обозначения:

- 1 – БАП 2,5мкМ+ИМК 0,1мкМ+ГК 1,0мкМ;
- 2 – БАП 2,0мкМ;
- 3 – БАП 2,0мкМ+ИМК 0,2мкМ+ГК 0,5мкМ;
- 4 – БАП 2,0мкМ+ИМК 0,2мкМ+ГК 1,0мкМ;
- 5 – БАП 4,0мкМ+ИМК 0,2мкМ+ГК 0,5мкМ;
- 6 – БАП 2,0мкМ+НУК 0,2мкМ+ГК 0,5мкМ.

важным показателем, когда речь идет о ценных экземплярах.

В случае гибели либо недоразвития самого зародыша, но при развитии семядолей, возможно культивирование их на питательной среде с определенным содержанием регуляторов роста. Использование тканей семядолей очень перспективно, так как они обладают высоким морфогенетическим потенциалом. Так A.S. Rubos, J.A. Pryke (1984) при работе с эмбриональными тканями зародышей яблони установил, что наибольшей морфогенетической способностью обладают именно семядоли.

Культивирование тканей семядолей и регенерация из них растений позволяет получать и размножать регенеранты из гибридных семян, а также может служить дополнительным источником получения новых форм, тем самым расширяя генетическое разнообразие для селекционного отбора.

При этом важно правильно подобрать оптимальное соотношение концентрации цитокинина к ауксину, чтобы стимулировать органогенез в тканях семядолей. В наших исследованиях при культивировании тканей семядолей гибридных семян вишни оптимальным было соотношение цитокинин: ауксин 5:1, что позволило индуцировать прямой органогенез и получить адвентивные побеги в изолированных семядолях (рис. 4).

На питательной среде с БАП10,0 мкМ+НУК 2,0 мкМ отмечен прямой органогенез с образованием нескольких побегов (от 2 до 4 шт.), что важно при микроразмножении.

Микрорастения, полученные из семян, в дальнейшем включались в процесс собственно микроразмножения. Добавление в питательную среду одного 6-БАП для микроразмножения гибридов вишни было не достаточно. Ряд



Рис. 2. Гибридный проросток на питательной среде 6-БАП 2,0мкМ+ИМК 0,2мкМ +ГК 0,5мкМ на 30-й день культивирования (×4)



Рис. 3. Гибрид 3-66-9 (6х) × в. Максимовича на питательной среде МС с БАП 2 мкМ на 45-й день культивирования (× 4)



Рис. 4. Прямой органогенез из семядолей гибрида ВЧ 89-95-48(6х) × сеянец Сахалинской на питательной среде 6 - БАП10,0 мкМ+НУК 2,0 мкМ

исследователей, добивались высокого коэффициента размножения у вишни на питательных средах, где использовали 6-БАП в концентрации 0,2-2,0 мг/л (Методические рекомендации, 2005: 35). У наших гибридов коэффициент размножения колебался от 1,2 до 4,2 (количество побегов на эксплант) при концентрации 6-БАП от 2,0 до 4,5 мкМ. Дальнейшее увеличение концентрации 6-БАП в питательной среде приводило не только к снижению коэффициента размножения, но и к гипергидротации тканей эксплантов. Применение комбинированных питательных сред по гормональному составу, 6-БАП 2,5 мкМ + ИМК 0,1 мкМ + ГКЗ 1,0 мкМ, позволило повысить коэффициент размножения у регенерантов большинства комбинаций скрещивания, при этом концентрация 6 БАП была снижена почти в 2 раза. Коэффициент размножения у гибридов имел волнообразный характер, с чередованием подъемов и спадов в зависимости от пассажа, что видно на рисунке 6, и составил от 2 до 9 побегов на эксплант (рис. 5,6). Возможно, такая реакция на эндогенные регуляторы роста связана со сложным генетическим происхождением сибирских гибридов, не имеющих аналогов в европейской части страны и зарубежом.

Микроразмножение путем активации развития меристем сортов хризантемы (*Chrysanthemum*).

В настоящее время в НИИСС создается коллекция *in vitro* хризантемы. Эта многолетняя цветочная культура используется в озеленении городов и частных домовладений. В полевой коллекции нашего института она появилась сравнительно недавно. Существующие приемы микроразмножения для наших объектов оказались не совсем подходящими, поэтому начата работа по усовершенствованию существующих методик. Так, при микроразмножении корейской хризантемы предлагалось использовать в питательной среде только ауксины ИУК 0,5 мг/л или ИМК от 0,1 до 1,0 мг/л (Миронова, 2004). В наших опытах подобная среда приводила к сильному вытягиванию и истончению растений, что в дальнейшем отрицательно сказывалось на их развитии. Smaranda Vantu (2005) предложил для микроразмножения хризантемы *Morifolium* Ramat. добавлять в питательную среду МС 2 мг/л БАП и 0,002 мг/л НУК. Подобная среда в наших опытах приводила к витрификации эксплантов и стимулировала образование каллуса в базальной части побега. Для микроразмножения хризантемы мы

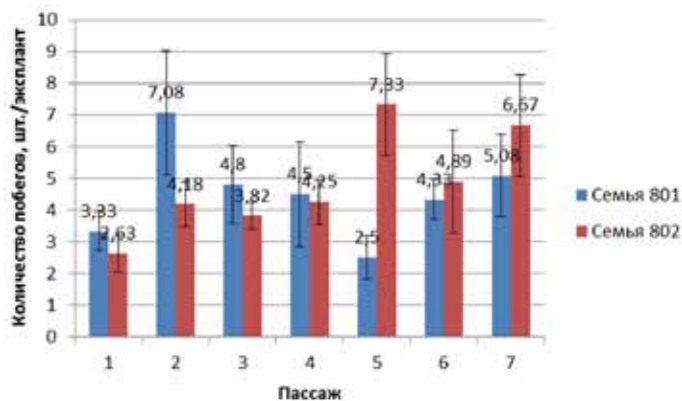


Рис. 5. Количество дополнительных побегов при культивировании верхней части побега в зависимости от пассажа на среде 6 - БАП 2,5 мкМ + ИМК 0,1 мкМ + ГКЗ 1,0 мкМ, n=12



Рис. 6. Адвентивные и пазушные побеги у экспланта вишни на среде МС, дополненной 6 - БАП 2,5 мкМ + ИМК 0,1 мкМ + ГКЗ 1,0 мкМ

испытали среды с разным качественным и количественным содержанием экзогенных регуляторов роста.

Оптимальной оказалась среда МС, дополненная кинетином (Кн) в концентрации 0,5 мкМ и ИМК в концентрации 0,25 мкМ. На среде с таким содержанием регуляторов роста растения имели гармоничный рост и формировали в среднем от 8 до 12 междоузлий в зависимости от сорта и пассажа. Коэффициент размножения составил от 4,3 до 6,1 и оценивался по количеству отделенных микрочеренков длиной 2 см с двумя междоузлиями (рис. 7, 8).

Микроразмножение путем активации развития меристем сортов малины (*Rubus*)

В коллекцию *in vitro* в 2010 г. по обмену с Волгоградским ботаническим садом приобретены сорта ремонтантной малины.

Изучение особенностей микроразмножения сортов ремонтантной малины Атлант и Шапка Монаха выявило сортоспецифичность. Для обоих сортов лучшим цитокинином был 6-БАП, но для сорта Атлант оптимальная его концентрация составила 1,0 мкМ, для сорта Шапка Монаха потребовалась увеличить концентрацию до 5 мкМ (см. табл.).

Было отмечено, что сорт Атлант обладает высоким морфогенетическим потенциалом, это выразилось в способности формировать большее количество побегов в условиях *in vitro*.

Сейчас коллекция пополнена ещё 4 сортами малины, по которым начаты исследования.

Продолжительность стадии собственно размножения зависит от регенерационного потенциала размножаемого растения, поэтому для растений с высокой способностью к регенерации эта стадия может длиться годами. Примером длительного культивирования верхушек побегов может служить карельская берёза (в течение 7 лет) и два вида тополя (5 лет) (Машкина и др., 1999). На протяжении 7 лет поддерживались в состоянии активного роста растения *Brachanthemum baranovii* без уменьшения регенерационной способности (Вечернина, 2004). В лаборатории НИИСС уже на протяжении 5-ти лет в состоянии активного роста поддерживаются ценные гибриды вишни, 4-х лет розы и малины, 3-х лет хризантемы.

На сегодняшний день в коллекции *in vitro* ФГБНУ «Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им. М.А. Лисавенко»: вишня (*Cerasus* Juss.): 3 сорта, 2 отборные формы, 38 гибридов с участием

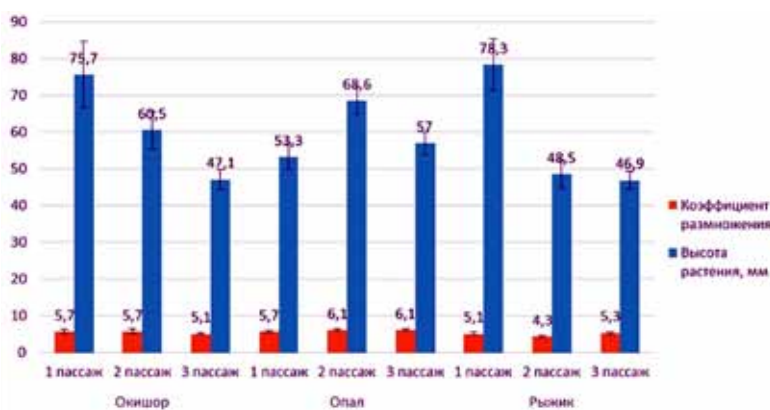


Рис. 7. Коэффициент размножения хризантемы корейской на питательной среде с Кн 0,5 мкМ+ИМК 0,25 мкМ, n=10

Рис. 8. Корейская хризантема на среде микроразмножения

Влияние регуляторов роста на коэффициент размножения, рост и развитие сортов ремонтантной малины на среде МС (n=15)

№	Регуляторы роста, мкМ	Кол-во побегов, шт./экспл.		Высота побега, мм		Кол-во листьев на побеге, шт./экспл.	
		Атлант	Шапка Монамаха	Атлант	Шапка Монамаха	Атлант	Шапка Монамаха
1	6-БАП 1,0	2,3±0,2	1,0±0,2	14,3±0,7	11,2±0,3	8,0±0,4	8,4±0,3
	6-БАП 1,0+НУК 0,1	1,8±0,1	1,0±0,2	13,7±1,0	13,7±0,5	11,6±0,7	9,0±1,4
	6-БАП 5,0	1,5±0,2	1,8±0,5	10,2±0,3	18,8±3,2	7,3±0,3	13,0±1,3
2	6-БАП 5,0+НУК 0,25	1,6±0,2	-	11,7±1,6	-	7,3±0,6	-
3	6-БАП 5,0+ИМК 0,25	1,9±0,2	1,5±0,1	15,3±0,5	12,8±1,9	9,0±0,6	8,7±0,8
4	6-БАП 5,0+ИМК 0,5 +ГК 1,5	2,0±0,1	-	9,2±4,4	-	11,5±0,3	-
5	6-БАП 5,0+ИМК 2,5	2,1±0,1	1,5±0,1	8,5±0,5	7,7±1,1	6,2±0,2	5,7±0,4
6	2-ip 1,0+НУК 0,1	1,3±0,1	1,3±0,2	13,7±1,2	17,0±0,8	7,4±0,5	12,2±0,8
7	2-ip5,0+ИМК 2,5	1,2±0,1	1,0±0,2	9,4±0,5	5,7±0,4	6,4±0,4	6,0±0,4

Примечание: «±» – доверительный интервал; «-» - эксперимент не проводился

C. kurilensis, *C. maakii*, *C. vulgaris*, *C. pennsylvanica*, *C. avium*, *C. sachalinensis*, *C. fruticososa*, *C. остропильчатая*; микровишня (*Microcerasus*) – 5 отборных форм с участием *M. tomentosa* (Thunb.) Wall. и *Cerasus besseyi* (Bail) Lunell); малина (*Rubus*) – 6 сортов; земляника (*Fragaria × ananassa*) – 6 сортов; актинидия коломикта (*Actinidia kolomikta* Maxim) – 6 сортов; флокс метельчатый (*Phlox paniculata*) – 6 сортов и 2 гибрида; клематисы (*Clematis viticella* – 1 сорт), *C. patens* – 1 сорт); хризантема (*Chrysanthemum coreanum* L., *C. indicum* L., *C. hortorum*) – 17 сортов; роза (Rose) разных садовых групп – Hybrid Tea, Floribunda, Climbing Polyantha, Rambler, Miniature, Schrub, всего 16 сортов.

Таким образом, приведенные примеры демонстрируют успешность и эффективность использования биотехнологических приемов для селекционной работы, а так же для сохранения биоразнообразия генетических ресурсов растений.

Л и т е р а т у р а

Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: учебник. – СПб.: С.-Петербургский университет, 2002. – 232 с.

Вечернина Н.А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. – Алтайский гос. Университет, 2004. – 205 с.

Высоцкий В.А. Биотехнологические приёмы в современном садоводстве // Плодоводство и ягодоводство России: Сб. науч. работ / ГНУ ВСТИСП – Россельхозакадемии. М., 2011. – Т. XXVI. – С. 3–10.

Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. Ауксины в культурах тканей и клеток растений. – Новосибирск: Наука СО, 1990. – 243 с.

Гусев А.А. Гистологическая и экологическая оценка всхожести семян вишни: Автореф. дис. ...канд. с-х н., Мичуринск, 2006. – 23 с.

Данилова С. Меристема – новая ниша бизнеса ://хобиз.ru.: Новые идеи бизнеса. 2007. – URL: <http://www.hobiz.ru/ideas/creature/meristema> (дата обращения 07.04.2008)

Джигадло Е.Н., Колесникова А.Ф., Фролова Л.В. Использование метода микроклонального размножения для создания и сохранения коллекции сортов вишни рода *Cerasus vulgaris* // Селекция и сортовая агротехника плодовых культур: Сб. науч. тр. Орел: ГНУ ВНИИСПК, 2004. – С. 135–142.

Здруйковская-Рихтер А.И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений. – Ялта, 2003. – 368с.

Куликов И.М., Высоцкий В.А., Шипунова А.А. Биотехнологические приемы в садоводстве: экономические аспекты // Садоводство и виноградарство, 2005. – №5. – С. 24–28.

Куприянов А.Н. Интродукция как инновационный процесс // Состояние и перспективы развития сибирского садоводства: матер. Междунар. научно-практич. конф., посв. 80-летию ГНУ НИИСС Россельхозакадемии (г. Барнаул, 20-22 августа 2013 г.). – Барнаул, 2013. – С. 187–189.

Кухарчик Н.В., Кастрицкая М.С., Пугач Р.М. Методика культивирования изолированных зародышей вишни и сливы // Плодоводство: науч. тр. – Самохваловичи, 2006. – Т. 18. – Ч. 2: Методическое обеспечение устойчивого развития современного плодоводства. – С. 157–162.

Машкина О.С., Табацкая Т.М., Стародубцева Л.М. Длительное микроочеренкование для массового клонального размножения карельской берёзы и тополя // Физиология растений, 1999. – Т. 46. – № 6. – С. 950–952.

Миронова О.Ю. Разработка и совершенствование технологий клонального микроразмножения декоративно-цветочных культур: Дис. ... к.б.н., - М. – 2004. – 141 с.

Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами / под ред. Е.Н. Джигадло. – Орел: ГНУВНИИСПК, 2005. – 51с.

Engelmann F., Engels J. Technologies and strategies for ex situ conservation // Managing Plant genetic Diversity. Rome, 2002. – P. 89–104.

Rubos A. C.,Pryke J.A. Morphogenesis in embryonic tissue cultures of apple // Hort. Sci., 1984. – 59. – № 4. – P. 469–475.

Smaranda Vantu In vitro multiplication of *chrysanthemum morifolium* Ramat //Analele stintifice ale Universitatii “Al.I. Cuza” Iasi Tomul LI, s. II a. – Biologie vegetala, 2005. – P.75–79.

Доклад представлен на конференции (с международным участием) “Актуальные проблемы сохранения растительного генофонда восточной Азии на территории России” (6–13 октября, 2014г. Ботанический сад-институт ДВО РАН)

BIOTECHNOLOGY IN BREEDING, PROPAGATION AND CONSERVATION OF PLANTS

T.V. Plaksina, G.N. Pishcheva

M.A. Lisavenko Siberia Horticulture Research Institute, Gorno-Altayisk, Russia

Key words: biotechnology, methods of conservation and propagation in vitro.

In vitro technology allows to: achieve a high level of multiplication of the plant material; make free from viruses, bacterial and fun-

gal diseases; continuously store plant material under aseptic conditions; reduce area for collections and labor costs to maintain them. The possibility of establishing a bank cultures in vitro for long-term storage of the gene pool of plants is an achievement of biotechnology. On the example of fruit, berry and flower crops

the possibility of using the methods of embryoculture, micropropagation in vitro for conservation and breeding perspective and valuable genotypes have been demonstrated.

Tabl. 1. Il. 8. Bibl. 17.