

УДК 575.1(631.52+634.23)

## Биотехнология в сохранении биоразнообразия растений

### Biotechnology in conservation of plants biodiversity

Плаксина Т. В.

Plaksina T. V.

Научно-исследовательский институт садоводства Сибири им. М. А. Лисавенко, Барнаул. E-mail: [tplaksina@mail.ru](mailto:tplaksina@mail.ru)  
The Lisavenko Research Institute of Horticulture for Siberia, Barnaul

**Реферат.** В работе рассмотрены биотехнологические методы *in vitro* на примере вишни степной (*Prunus fruticosa* Pall.) (эмбриокультура, микроклональное размножение, депонирование в условиях *in vitro*) для сохранения, размножения и создания генбанка сортов и ценных гибридов.

**Summary.** The paper discusses biotechnological methods *in vitro* on the example of frutescent cherry (embryo culture, micropropagation, deposition *in vitro*) for conservation, propagation and establishment of gene bank of the cultivars and valuable hybrids.

В настоящее время актуальна проблема сохранения генофонда как дикорастущих видов, так и культурных растений, представляющих ценный материал для селекционной работы. Для этих целей широко используются методы биотехнологии, такие как микроклональное размножение *in vitro*, эмбриокультура, сохранение коллекций в условиях *in vitro*, криосохранение.

В работе с плодовыми и ягодными культурами биотехнологические приемы используются для получения новых генотипов, сохранения генетических коллекций, размножения и оздоровления посадочного материала (Вечернина, 2004).

Для расширения генетической базы садовых растений применяется метод эмбриокультуры, который позволяет не только довести каждый зародыш до взрослого организма, но и получить от каждого эмбриона несколько идентичных организмов (Высоцкий, 2011). Регенерация растений из тканей семядолей прямым путем позволяет размножить ценные генотипы, а через непрямой органогенез дает возможность получения соматоклональных вариантов – источника нового исходного материала для селекции. С использованием этих приемов были получены гибриды вишни, интересные для дальнейшей селекционной работы (Плаксина, 2015).

Для быстрого тиражирования ценных клонов, сеянцев, новых сортов широко используется метод микроклонального размножения *in vitro*. Включенный в систему производства посадочного материала этот метод обеспечивает ряд преимуществ в сравнении с традиционным черенкованием и прививкой. Во-первых, работа проводится круглый год и на небольших лабораторных площадях, во-вторых, значительно увеличивает коэффициент размножения. Так, коэффициент размножения после второго пассажа у земляники составляет 5–20 на один эксплант в зависимости от сорта, у черной смородины – 3–12, вишни – 5–18.

Перед учеными разных биологических специальностей стоит задача сохранения редких и исчезающих растений, диких сородичей культурных растений для притока генов, создание коллекций сельскохозяйственных культур. Возможности создания банка культур *in vitro* для длительного хранения генофонда растений является достижением биотехнологии. Большое значение в технологии культуры тканей *in vitro* имеет разработка условий длительного сохранения пробирочных растений как резервного банка ценных видов, форм и сортов разных культур.

Цель наших исследований: усовершенствовать метод эмбриоспасения зародышей вишни сложного полигеномного состава и оптимизировать питательные среды для беспересадочного депонирования вишни в условиях *in vitro* с целью создания генбанка.

Объектами исследования являлись гибридные зародыши семян вишни степной (134 семени) 28-ми комбинаций скрещивания.

Нами использованы общепринятые приемы работы с изолированными зародышами и тканями растений в культуре *in vitro* (Джигадло и др., 2005).

В качестве основной питательной среды применяли агаризованные среды (0,7 % бактериологический агар) по прописи Мурасиге-Скуга (МС) (Murashige et al., 1962), в состав которых входили регуляторы роста (РР): цитокинин 6-БАП (6-бензиламинопурин), ауксины – ИМК (в-индолилмасляная кислота), НУК (б-нафтилуксусная кислота), ГК<sub>3</sub> (гибберелловая кислота). Процессы регенерации проходили в условиях фотопериода 16/8 часов свет/темнота при  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ .

В результате проведенных в 2016 г. исследований установлено, что возможно получить микро-растения из 30-дневных зародышей на среде с содержанием БАП 2,0 мкМ + ИМК 0,2 мкМ + ГК 0,5 мкМ. Всего было испытано 6 вариантов питательных сред с разным содержанием РР. Оптимальным же сроком введения в культуру изолированных зародышей является 40–45 дней с момента опыления, при культивировании на этапе введения на среде с содержанием БАП 4,0 мкМ + ИМК 0,2 мкМ + ГК 0,5 мкМ. В эти сроки большинство зародышей не достигают окончательного размера, что позволяет управлять их развитием, гормональным составом питательной среды. Установлено, что для зародышей, которые на этапе введения не тронулись в рост, необходим прием стимуляции более высокими концентрациями БАП (10 мкМ) совместно с ауксинами НУК или в-индолилпропионовой кислотой (ИПК) в концентрации 2 мкМ. Такой подход увеличил выход растущих зародышей ещё на 14,9–30,5 %.

Для увеличения выхода гибридного материала и в случае гибели зародышевой почки возможно индуцировать органогенез из тканей семядолей. Использование тканей семядолей перспективно, так как они обладают высоким морфогенетическим потенциалом, что доказано работами с семядолями гибридных семян яблони и облепихи (Вечернина и др., 2003; Sriskandarajah et Lundquist, 2009). Испытано 2 варианта среды: БАП 10,0 мкМ + НУК 2,0 мкМ и БАП 5,0 мкМ + НУК 0,5 мкМ + ГК 5,0 мкМ. На питательной среде, дополненной БАП 10,0 мкМ + НУК 2,0 мкМ, через 20 дней культивирования



Рис. Гибридный зародыш вишни после культивирования на среде микроразмножения с БАП 2,2 мкМ + ИМК 0,5 мкМ.

на семядолях наблюдали образование апикальных точек роста, которые затем формировали листья и микропобеги. В зависимости от генотипа в 18,2–61,0 % случаях наблюдался прямой органогенез в семядолях.

Последующее культивирование с пониженным содержанием РР позволило получить микрорастения либо для последующего размножения, либо укоренения (рис.). Такой подход позволил уже через 10 месяцев с момента введения в культуру изолированного зародыша получить достаточное количество исходного гибридного материала для высадки его в открытый грунт для дальнейшего изучения и оценки.

Для сохранения культуры в условиях *in vitro* необходимо поддерживать её устойчивое жизнеспособное состояние при невысокой интенсивности ростовых процессов. Существует несколько способов, изменяющих кинетику роста. Первый – понижение температуры, при которой происходит культивирования, второй – внесение в питательную среду соединений, способных замедлить рост. Одни могут оказывать осмотическое действие, например, сахароза, маннит или быть ингибиторами роста гормональной природы, таким как абсцизовая кислота (АБК) (Митрофанова, 2011). Проведенные нами исследования в этом направлении позволили установить питательные среды для длительного беспересадочного культивирования *in vitro* культуры вишни. Наилучшие показатели были получены на питательной среде Гамборга и Эвелег (B<sub>5</sub>) (Gamborg et Eveleigh, 1968) и МС, содержащих 60 г/л сахарозы. Большинство растений на этих средах имели зеленые листья и корни. В зависимости от генотипа жизнеспособных растений было 33–100 % после восьми месяцев культивирования без пересадок. При переносе микропобегов на среду инициации возобновлялся рост апикальных точек роста с образованием боковых и адвентивных побегов.

Благодаря использованию эмбриокультуры удалось сохранить 76,8 % введенных в культуру зародышей и получить 103 клоновых линии.

Таким образом, проведенные исследования на примере гибридного материала вишни степной демонстрируют возможности методов биотехнологии в сохранении и приумножении ценных генетических ресурсов.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Вечернина Н. А. Методы биотехнологии в селекции, размножении и сохранении генофонда растений. – Барнаул: Изд-во Алт. гос. ун-та, 2004. – 205 с.
- Вечернина Н. А., Таварткиладзе О. К., Васина М. А. Микроразмножение гибридов яблони путем регенерации в культуре *in vitro* семядолей // Биология растительных клеток *in vitro* и Биотехнология: тез. докл. VIII междунар. конф. (9–13 сентября 2003 г., Саратов). – Саратов, 2003. – С. 343–344.
- 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.
- Джигадло Е. Н., Джигадло М. И., Голышкина Л. В. Методические рекомендации по использованию биотехнологических методов в работе с плодовыми, ягодными и декоративными культурами. – Орел: ГНУ ВНИИСПК, 2005. – 51 с.
- Митрофанова И. В. Соматический эмбриогенез и органогенез как основа биотехнологии получения и сохранения многолетних садовых культур. – Киев: Аграрна наука, 2011. – 344 с.
- Плаксина Т. В. Возможности эмбриокультуры *in vitro* при сохранении ценных гибридов вишни // Северная вишня: III Всероссийский симпозиум косточковедов: сб. науч. тр. – Челябинск, 2015. – С. 109–113.
- Gamborg O. L., Eveleigh D. E. Culture methods and detection of glucanases in cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem., 1968. – Vol. 46, № 5. – P. 417–421.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant., 1962. – Vol. 15, № 13. – P. 473–497.
- Sriskandarajah S., Lundquist P.-O. High frequency shoot organogenesis and somatic embryogenesis in juvenile and adult tissues of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) // Plant Cell Tiss Organ Cult., 2009. – Vol. 99. – P. 259–268.