

УДК 001.4:632.3

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДОВ
IN VITRO В СЕЛЕКЦИИ
ПЛОДОВЫХ И ЦВЕТОЧНО-
ДЕКОРАТИВНЫХ КУЛЬТУР**

Медведева Нина Ивановна

канд. с.-х. наук

*Государственное научное учреждение
Крымская опытно-селекционная станция
Северо-Кавказского зонального научно-
исследовательского института
садоводства и виноградарства
Россельхозакадемии, Крымск, Россия*

Бунцевич Леонид Леонтьевич

канд. биол. наук

*Государственное научное учреждение
Северо-Кавказский зональный научно-
исследовательский институт
садоводства и виноградарства
Россельхозакадемии, Краснодар,
Россия*

Мохно Валентина Сергеевна

канд. с.-х. наук

*Государственное научное учреждение
Всероссийский научно-
исследовательский институт
цветоводства и субтропических
культур Россельхозакадемии,
Сочи, Россия*

На основе изучения различных источников и результатов собственных исследований дан анализ проблемы использования биотехнологических методов *in vitro* в селекции плодовых и цветочно-декоративных культур.

Ключевые слова: СЕЛЕКЦИЯ,
САДОВЫЕ КУЛЬТУРЫ, ГИБРИДЫ,
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

UDC 001.4:632.3

**THE USE OF METHODS IN VITRO
IN BREEDING OF ORCHARD
AND FLOWER-ORNAMENTAL
CROPS**

Medvedeva Nina

Cand. Agr. Sci.

*State Scientific Organization Krymsk
Experimental Breeding Station
of North Caucasian Regional Research
Institute of Horticulture and Viticulture
of the Russian Academy of Agricultural
Sciences, Krymsk, Russia*

Buntsevich Leonid

Cand. Biol. Sci.

*State Scientific Organization North
Caucasian Regional Research Institute
of Horticulture and Viticulture of the
Russian Academy of Agricultural Sciences,
Krasnodar, Russia*

Mokhno Valentina

Cand. Agr. Sci.

*State Scientific Institution All-Russian
Scientific Research Institute of Floriculture
and Subtropical Crops of the Russian
Academy of Agricultural Sciences,
Sochi, Russia*

The analysis of problem of using of biotechnological methods *in vitro* in breeding of fruit and flower-ornamental crops is given on the basis of research of different sources and results of own research.

Keywords: BREEDING,
ORCHARD CROPS, HYBRIDS,
BIOTECHNOLOGICAL METHODS

Введение. Значительное место в разработке приоритетных направлений науки XXI в. занимает метод культуры растительных клеток, тканей и органов, позволяющий наиболее полно реализовать морфологический потенциал растительного организма к размножению.

Реализация способности растительной клетки к регенерации целого растения имеет значение в решении ряда практических проблем садоводства. Методы культуры клеток и тканей открывают путь для новых нетрадиционных способов получения новых форм плодовых растений с комплексом хозяйственно-ценных признаков в значительно более короткие сроки по сравнению с традиционными способами.

К преимуществам этих методов можно отнести [1-6]:

- получение гибридных семян из зародышей ранних форм развития при отдаленной гибридизации;
- получение соматональных вариантов и соматических гибридов;
- манипуляция с пloidностью для получения организмов с измененным числом хромосом;
- длительное сохранение материала в условиях *in vitro*;
- получение вегетативного потомства у трудноразмножаемых форм;
- быстрое размножение ценных клонов;
- возможность работы в течение всего года и планирование выпуска материала к определенному сроку.

Обсуждение. В практике создания принципиально новых высокоадаптивных сортов плодовых культур широко используется метод отдаленной гибридизации. Однако при проведении скрещиваний с вовлечением диких видов или генетически отдаленных форм часто наблюдается постгамная несовместимость в результате которой становится практически невозможным получение жизнеспособных зародышей.

Для повышения результативности отдаленной гибридизации и преодоления нескрещиваемости в селекционном процессе создания сортов плодовых культур разработаны различные методы.

Культура зародышей in vitro в селекции плодовых растений позволяет преодолеть полную само- и перекрестную несовместимость при межвидовых и межродовых скрещиваниях, повысить выход гибридных регенерантов в скрещиваниях с участием отдаленных форм при скрещивании на раннеспелость, скороплодность, а также устойчивость к заболеваниям и абиотическим факторам окружающей среды.

Метод культуры изолированных зародышей *in vitro* широко используется при вовлечении в скрещивания гибридов первого поколения с крайне низкой фертильностью, от которых не удается получить потомство традиционными способами, а также при необходимости преодоления периода покоя у отдаленных гибридов, при различных типах скринингов и оплодотворении *in vitro*.

Основы метода культуры зародышей и его первое распространение заложено работами Hanning в 1904г., G. Stingl в 1907 г. Особенно возрос интерес к этому методу, когда были выявлены возможности его использования для ускорения селекционного процесса, преодоления явлений несовместимости, решения отдельных генетических задач и в целом растениеводства (Brooks, Hough, 1958; Lammerts, 1942).

Позднее были проведены широкие исследования и получены хорошие результаты по культивированию недоразвитых гибридных зародышей и семязачек в условиях *in vitro* целым рядом наших и зарубежных ученых (Бутенко, 1964, 1982; Здруйковская-Рихтер, 1979, 1981, 1983; Коршиковой, 1983; Высоцкий, Плотникова, 1987; Выхристова, 1981; Гавек, Новак, 1986; Жуков, Коломиец, 1997; Олейникова, Савельев, 1994; Титова, 1986; Яковлев, 1979 и др. на плодовых, цветочных, злаковых, овощных и технических культурах.

Культурой изолированных зародышей широко занимаются китайские исследователи CheShengquan, ShengJueying, QinWenyong (1996).

В Российской Федерации и странах СНГ есть отдельные публикации по этому вопросу – Н.А. Вечерко (1999), В.К. Мурсалиевой, Г.А. Сыртановой, К.Н. Сарсенбаева (1995).

Искусственное выращивание недоразвитых зародышей в культуре *in vitro* позволило получить отдаленные гибриды между диплоидными видами сливы и терна; диплоидными, гексаплоидными видами сливы; сливы с абрикосом, персиком и миндалем; гибриды между вишней обыкновенной и дикорастущими видами вишен (Курсаков и др., 1988).

У большинства луковичных и клубнелуковичных цветочных растений, в том числе у тюльпана и фрезии, наиболее эффективными методами формообразования считаются отдаленная гибридизация и полиплоидия.

Однако при использовании в селекционном процессе (в качестве доноров ценных биологических и хозяйственных признаков) форм разного уровня ploидности и диких видов из природных местообитаний часто наблюдаются проявления генеративной несовместимости как в прогамном, так и в постгамном периодах развития растений (нарушения оплодотворения, митотических делений, эндоспермогенеза и других аномалий, что ведет к образованию неполноценных семян или гибели зародышей на разных стадиях эмбриогенеза).

Существенную помощь в преодолении трудностей при получении новых гибридных форм из недоразвитых зародышей и семяпочек тюльпана и фрезии могут оказать методы культуры изолированных зародышей и семяпочек в условиях *in vitro*.

Выращивание семяпочек на искусственных питательных средах позволяет получать ценный исходный материал, который в дальнейшем может быть применен для разработки и решения теоретических и практических вопросов при использовании в отдаленной гибридизации, создании сортов разного уровня ploидности, а также для получения новых форм по заданным признакам.

В практической селекции также имеет значение выращивание в условиях стерильной культуры зародышей нормально развитых гибридных семян, представляющих ценность для получения уникальных новообразований, так как в культуре *in vitro* легче создать необходимые для прорастания зародыша и развития проростка условия.

Выращивание зародышей тюльпана и фрезии в культуре *in vitro*, по сравнению с традиционным культивированием в полевых условиях, дает возможность значительно повысить жизнеспособность семян, сократить период их покоя и развития растений, увеличить коэффициент размножения ювенильных сеянцев, что намного ускорит селекционный процесс, который у тюльпана, например, длится около 25 лет.

Кроме того, указанный метод позволяет сохранить в новом поколении сортов накопленное ранее их генетическое разнообразие и уникальные образцы генотипов от единичных семян, полученных при межвидовых и разноплоидных скрещиваниях.

Эффективность использования метода эмбриокультуры *in vitro* была существенно повышена после разработки *метода индукции регенерации побегов в культуре изолированных семядолей*. Так, для этой же цели используют *культуру изолированных семяпочек* и *культуру гибридной каллусной ткани*, полученной из гибридного зародыша или молодого проростка. Последний метод является способом преодоления леталей, реализующихся в эмбриогенезе или в фазе молодых проростков при некоторых комбинациях отдаленных скрещиваний. Искомые гибридные растения получают в результате индукции образования побегов в гибридной каллусной ткани.

В настоящее время все большее внимание привлекают процессы *регенерации растений в культуре каллусных тканей листовых эксплантов и пыльников*, поскольку решение задач надежного получения

растений в таких системах позволит манипулировать с ploидностью, вести отбор соматклональных и гаметоклональных вариантов по определенным признакам на селективных питательных средах, заниматься клеточной и генной инженерией, используя прямой перенос генов.

Регенерация растений из культуры тканей достигается путем соматического органогенеза или адвентивного органогенеза. Соматический эмбриогенез представляет собой процесс формирования зародышеподобных структур из соматических клеток [3, 6].

Такие зародыши в дальнейшем могут развиваться и прорасти в регенераты через стадии (глобулярного эмбриоида, сердцевидного зародыша, «Торпедо»), соответствующие тем, что встречаются при развитии зиготы.

Формирование растений путем органогенеза состоит в появлении и росте адвентивных (т.е. возникающих не из эмбриональных тканей) органов из каллуса (непрямая регенерация) или прямо из клеток экспланта (прямая регенерация) [7, 8].

В настоящее время проводятся исследования по получению растений-регенерантов из клеток каллуса. Каллусные культуры получали, используя в качестве эксплантов стеблевые кусочки персика, пыльники персика, миндаля и абрикоса (Merhra A., Merhra P.V., 1974).

Были регенерированы целые растения миндаля (*Prunus amygdalus* L.) из листьев и семядолей через стадию каллусообразования. Лучшие результаты достигнуты по регенерации растений из каллусов корневого происхождения *Prunus* Sp., *P.davychensis*, *P.canescus*, *P.avium* и межвидового гибрида *P.incisa* × *P.serrulata*.

Осуществлена также регенерация из каллуса корневого и листового происхождения ряда подвойных форм вишни и сорта Владимирская. Отбор форм с высоким морфогенетическим потенциалом и использование двухступенчатой методики получения растений через корнеобразование

позволило существенно повысить частоту регенерации из листовых дисков ряда сортов вишни (до 35-40%) и вишене-черешневых гибридов (до 65-70%) (Высоцкий и др., 1993). Кроме того, выполнена серия работ по регенерации целых растений из протопластов подвоя вишни «Golt» (*Prunus avium* x *pseudocerasus*) и ряда клонов кислой вишни (*Prunus cerasus*).

В последние годы основная часть исследований по регенерации плодовых косточковых культур сосредоточена на разработке методик регенерации из соматических тканей, в первую очередь листовых, путем адвентивного органогенеза. Получена регенерация из листьев *P.canescens*, абрикоса и нескольких клонов сливы, *P.serotina* и *P.avium* (S.J. Ochatl, 1992).

Близки к практическому применению в селекции плодовых культур *методы мутагенеза, селекции на клеточном уровне и гибридизации соматических клеток путем слияния изолированных протопластов*. Мутагенез и селекция на клеточном уровне позволяют вовлечь в процесс селекции большое число клеток и создать жесткие селективные условия для отбора мутантных клеток с желательными признаками.

Феномен соматической изменчивости служит базой и для тканевой селекции ягодных культур, в том числе культуры земляники. Сомаклональная изменчивость репродуктивных органов растений-регенерантов земляники, полученных из каллусных тканей, позволяет проводить селекцию на такие признаки, как урожайность, количество цветоносов, окраска околоцветника и др.

Так, в результате сомаклональной изменчивости растений земляники, полученных из каллусов пыльников, были отобраны линии, отличающиеся по скороспелости, с опадающей чашечкой и устойчивые к фитофторозу (Simon Jstvonetal, 1987). В исследованиях Jones O.P. eal (1988) были получены сомаклональные варианты с повышенной урожайностью и устойчивостью к вертициллезу из каллусных тканей ряда сортов земляники.

Во ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина проводились исследования по тканевой селекции земляники ананасной (*Fragaria ananasa* Duch) на устойчивость к грибным патогенам *Ph.cactorum* и *B.cinerea*, а также на устойчивость к засухе и засолению. В процессе тканевой селекции были отобраны каллусы сортов земляники Урожайная ЦГЛ, Золушка, Фейерверк и Куйбышевская, сохраняющие способность к росту на средах с высокими (15-20%) концентрациями культуральных фильтратов фитопатогенных грибов. Были отобраны также каллусы земляники (Золушка, Куйбышевская, Урожайная ЦГЛ), сохраняющие способность к пролиферации в присутствии 0,6% хлорида натрия (Тюленев и др., 2005).

В результате индукции морфогенеза были получены растения-регенераты, среди которых выделены генотипы с повышенной устойчивостью к патогенам *Ph. Cactorum* и *B. cinerea*, а также растения с повышенной засухоустойчивостью и устойчивостью к засолению.

Перспективным приемом, ускоряющим селективный процесс плодовых культур, является *получение гаплоидных растений*.

Использование гаплоидов ускоряет создание высокогомозиготных чистых линий, отбор стабильных нерасщепляющихся форм, обнаружение рецессивных мутаций. Кроме того, использование гаплоидов способствует созданию селекционных форм плодовых растений, в которых гетерозис будет направлен и контролируем. Путем скрещивания гаплоидов с диплоидами можно получать триплоиды – наиболее продуктивный уровень плоидности для семечковых культур.

Гаплоиды могут быть получены спонтанно, методами направленного мутагенеза и в культуре *in vitro* из пыльников и микроспор. Образующаяся при этом каллусная ткань может содержать не только гаплоидные клетки, но и анеуплоиды, ди-, три- и полиплоидные, что служит дополнительным источником генетической изменчивости.

Использование методов клеточной и генной инженерии открывает большие возможности для генетической реконструкции организмов в нужных для исследований направлениях. Но гены, необходимые для таких инженерных манипуляций, должны быть надежно сохранены в банке генов. В связи с этим в практической селекции особое значение имеет сохранение генетически ценных образцов.

Для сохранения разнообразия плодовых растений наряду с традиционными способами в последнее время все шире привлекаются методы биотехнологии, в основу которых положена возможность поддержания жизнеспособности пробирочных растений и их отдельных органов в течение длительного времени в условиях *in vitro*. Для некоторых видов культура ткани является единственно возможным способом сохранения генетического разнообразия.

Существуют три основных способа хранения растительного материала *in vitro*:

- хранение постоянно растущих культур при нормальной скорости роста;
- хранение культур в условиях минимального роста;
- хранение в условиях сверхнизких температур (криоконсервирование). Каждый из этих способов отличается своими особенностями и выбор осуществляется для конкретных видов растений, целей и наличия условий.

Процесс размножения полученных селекционерами сортов плодовых культур вегетативным размножением растений занимает много времени.

Этот период можно сократить, используя *метод клонального микроразмножения* [2]. При клональном микроразмножении используют два принципиально различных подхода. При первом из них развитие растений вызывают из стеблевых апексов, пазушных и спящих почек, при втором –

вызывают развитие адвентивных побегов *de novo*, либо из специализированных клеток тканевого экспланта.

Технология такого типа размножения может быть разбита на несколько этапов, оптимизация условий на каждом из них зависит от вида растений и исходного материала, взятого для размножения.

На первом этапе основной целью является получение максимального количества меристематических верхушек, прижившихся в условиях *in vitro*. Цель второго этапа – собственно микроразмножение, то есть получение максимального количества мериклонов путем последовательного субкультивирования уже имеющихся побегов в условиях *in vitro*. Третьим этапом клонального микроразмножения является получение корнесобственных растений *in vitro*.

Высокие коэффициенты размножения (в сотни и даже тысячи раз превышающие традиционные способы) позволяют сократить сроки получения товарной продукции в 4-5 раз. Одним из преимуществ этого метода также является повышение качества продукции в результате оздоровления от инфекционных заболеваний.

Кроме того, метод клонального микроразмножения позволяет преодолеть плохую укореняемость ряда сортов и гибридов плодовых культур при их вегетативном размножении. Неоспоримым преимуществом этого метода является миниатюризация процесса размножения (экономятся производственные площади, затраты на содержание насаждений и т.п.) и возможность производства необходимого количества материала к назначенному сроку.

Заключение. Способы культуры зародышей и семяпочек в условиях *in vitro* и другие представленные биотехнологические методы являются надежными для постоянного практического применения в селекционной работе с целью расширения и обогащения генофонда садовых (плодовых,

ягодных и цветочно-декоративных) растений. Разработанные приемы преодоления геномной несовместимости при межвидовых и разноплоидных скрещиваниях дают возможность управления селекционным процессом и его ускорением.

В целом, несмотря на обширный материал, накопленный современной наукой, описанные направления биотехнологии изучены ещё недостаточно как с точки зрения глубинных механизмов, так и в плане воплощения научных результатов в селекционную практику.

Литература

1. Митрофанова, И.В. Соматический эмбриогенез как система *in vitro* размножения культурных растений / И.В. Митрофанов // Физиология и биохимия культурных растений. – Т.41.– №6.– 2009. – С. 496-508.
2. Высоцкий, В.А. Использование методов культуры изолированных тканей и органов для оздоровления и ускоренного размножения плодовых и ягодных растений / В.А. Высоцкий // Селекция плодовых и ягодных культур: сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ Сибирское отделение НИИСС.– Новосибирск, 1989.– С. 132-138.
3. Токин, Б.П. Общая эмбриология / Б.П. Токин // Биологический каталог. – С.87. – <http://www.bio-cat.ru/ebook.php?file=tokin.djvu&page=87>.
4. Dunstan D.I., Tautorus T.E., Thorpe T.A. Somatic embryogenesis in woody plants // *In vitro Embryogenesis in Plants* / Ed. T.A. Thorpe. – Netherlands, Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. – P. 471-538.
5. Garin E, Grenier E., Grenier-De March Gh. Somatic embryogenesis in wild cherry (*Prunus avium*) // *Plant Cell, Tissue, Organ Cult.* – 1997. – 48, N 2. – P. 83-91.
6. Merkle S.A. Somatic embryogenesis in ornamentals // *Biotechnology of Ornamental Plants* / Eds. R.L. Geneve, J.E. Preece, S.A. Merkle. – Wallingford: CAB International, 1997. – P. 13-33.
7. Gutierrez P.P., Rugini E. Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclic secondary somatic embryogenesis and plant regeneration of transgenic cherry rootstock 'Colt' (*Prunus avium* x *Prunus pseudocerasus*) // *Abstracts 5th Intl. Symp. «Plant Biotechnology: Progress and Development, Stara Lesna, Slovak Republic, Sep. 7-13, 2003.– Stara Lesna, 2003.* – P. 52.
8. Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Marraffa S.B. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis // *Hort. Rev.* – 1980. – 2. – P. 268-310.