

ISSN 0202-3628

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
РАСТЕНИЕВОДСТВА имени Н.И. ВАВИЛОВА (ГНЦ РФ ВИР)

**ТРУДЫ
ПО ПРИКЛАДНОЙ БОТАНИКЕ, ГЕНЕТИКЕ
И СЕЛЕКЦИИ, том 164**

(основаны Р.Э. Регелем в 1908 г.)

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ
2007

**BULLETIN
OF APPLIED BOTANY, OF GENETICS
AND PLANT BREEDING, vol. 164**

(founded by Robert Regel in 1908)

ST.-PETERSBURG
2007

СТРАТЕГИЯ ДОЛГОСРОЧНОГО СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА ВЕГЕТАТИВНО РАЗМНОЖАЕМЫХ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ В КОНТРОЛИРУЕМЫХ УСЛОВИЯХ СРЕДЫ

Т.А. Гавриленко, С.Е. Дунаева, Э.В. Трускинов, О.Ю. Антонова, Г.И.
Пендиин, Ю.В. Лупышева; В.В. Роговая, Н.А. Швачко

В настоящее время генбанки сохраняют генетическое разнообразие вегетативно размножаемых растений (в естественных условиях (полевые коллекции), при сверхнизких температурах (криоколлекции) и в условиях *in vitro*). В крупных генбанках имеются все три системы хранения, поскольку каждая из них имеет свои преимущества и недостатки, и только их совместное использование может обеспечить надежное долгосрочное хранение генофонда вегетативно размножаемых культур. Долгосрочное хранение обеспечивают базовые коллекции, включающие полевые и криоколлекции. Наряду с полевыми, коллекции *in vitro* создаются как часть активных и дублетных коллекций и служат основой для создания криоколлекций. Активные коллекции вегетативно размножаемых растений включают полевые и *in vitro* коллекции которые сохраняются в условиях среднесрочного хранения. Современная стратегия хранения образцов вегетативно размножаемых растений в контролируемых условиях среды включает следующие этапы: оздоровление, введение в культуру *in vitro*, индексацию наличия фитопатогенов в микрорастениях, микроразмножение, генотипирование образцов, среднесрочное хранение активных *in vitro* коллекций и закладку образцов на долгосрочное криохранилище. Необходимо отметить, что круг культур, для которых разработан весь комплекс перечисленных выше методов, достаточно ограничен. Для долгосрочного и надежного сохранения агробиоразнообразия вегетативно размножаемых растений необходима дальнейшая разработка теории и методов *in vitro* и криохранения. В статье анализируется опыт сохранения генетического разнообразия вегетативно размножаемых культур в различных генбанках мира, включая ГНУ ГНЦ РФ ВИР им. Н.И. Вавилова.

A STRATEGY OF LONG-TERM CONSERVATION OF VEGETATIVELY PROPAGATED CROPS UNDER CONTROLLED CONDITIONS

Gavrilenko T.A., Dunayeva S.E., Truskinov E.V., Antonova O.Y., Pendinen G.I.,
Lupyshcheva J.V., Rogovaya V.V., N.A. Shvachko

Germplasm of vegetatively propagated crops is maintained at modern genebanks in the field, *in vitro* and cryocollections. Each method (field-, *in vitro*- and cryopreservation) has both advantages and disadvantages. By combining these preservation methods, safe long-term conservation of vegetatively propagated plants could be ensured. Base collections (which include field and cryocollections) provide long-term conservation of clonal plant germplasm. Active collections (which include field and *in vitro* collections) provide medium-term conservation. The modern strategy of clonally propagated crops conservation under the controlled conditions includes: elimination of viral and bacterial diseases, establishment of *in vitro* culture, virus indexing, micropropagation, genotyping, medium-term *in vitro* storage and long-term storage of cryocollections. However, protocols for all these methods have been elaborated for a limited number of plant species. Long-term conservation of agrobiodiversity of vegetatively propagated plants needs the theory and methods of *in vitro* and cryopreservation to be further developed. The experience of germplasm conservation by a range of genebanks in the world, including the N.I. Vavilov Institute of Plant Industry, is discussed.

Впервые идея необходимости сбора и сохранения генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей была выдвинута в начале XX века Н.И. Вавиловым, 120-летие которого мировая научная общественность отмечает в 2007 г. К концу XX века коллекции генбанков, превратившихся в центры сохранения агробиоразнообразия насчитывали более чем 1,5 млн образцов. В настоящее время масштаб мировой экспедиционной деятельности существенно ограничен в связи со вступлением в силу международной Конвенции о биоразнообразии, согласно которой страны мира обладают суверенными правами на свои генетические ресурсы и соответственно имеют право на компенсацию при их сборе и использовании представителями другой страны. Кроме того, проблема сбора и сохранения генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей приобретает особую актуальность на фоне ускорения их генетической эрозии по причине деградации окружающей среды, стихийных бедствий, вытеснения сортов народной селекции. В связи с этим возрастает роль коллекций, сосредоточенных в национальных и международных генбанках.

Структура коллекций в генетических банках растений

В настоящее время коллекции генетических ресурсов растений принято подразделять на три типа: базовые, активные и дублетные. Базовые коллекции сохраняют в условиях, обеспечивающих их долгосрочное хранение (*long-term conservation*); доступ к ним предельно ограничен. Активные (рабочие) коллекции служат для восстановления, размножения, рассылки, изучения образцов и сохраняются в условиях среднесрочного хранения (*medium-term conservation*). Дублетные коллекции хранят отдельно от базовой коллекции с целью повышения надежности хранения.

Применительно к коллекциям вегетативно размножаемых растений различают базовые коллекции, включающие образцы, сохраняемые в естественных условиях (полевые коллекции) и образцы, заложенные на долгосрочное хранение при сверхнизких температурах (-196°C) (криоколлекции) [53]. Кривоколлекции создаются на основе двух подходов: (а) для криоконсервации используют непосредственно образцы полевых коллекций (методы апробированы для небольшого числа видов) и (б) для криоконсервации используют экспланты образцов *in vitro* коллекций. В последнем случае создаются базовые *in vitro* коллекции - IVBG (the *in vitro* base genebank) [26, 57]. Преимуществом IVBG является возможность долгосрочного хранения эксплантов оздоровленных растений. Активные (рабочие) коллекции вегетативно размножаемых растений включают полевые и *in vitro* коллекции IVAG (the *in vitro* active genebank). IVAG поддерживают при низких положительных температурах, обеспечивающих среднесрочное хранение (*medium-term conservation*). Наряду с полевыми, коллекции *in vitro* создаются как часть активных и дублетных коллекций [53].

Состав и размер *in vitro* и криоколлекций определяются необходимостью оздоровления, размножения и дублирования наиболее ценных образцов полевой коллекции, а также запросами по международному обмену. При формировании *in vitro* коллекций приоритет отдается генофонду аборигенных и стародавних сортов, селекционно-ценным образцам диких родичей, уникальным экземплярам, а также образцам полевой коллекции, пораженным фитопатогенами. Образцы стержневых коллекций (core-collections), в которых максимально представлено генетическое разнообразие вида при минимизации числа образцов, обязательно сохраняются с использованием всех трех систем хранения - в естественных условиях, *in vitro* и при сверхнизких температурах.

В крупных мировых генбанках имеются все три системы хранения вегетативно размножаемых растений, поскольку каждая из них имеет свои преимущества и недостатки (табл. 1). Методы сохранения генофонда в полевых, *in vitro* и криоколлекциях взаимно дополняют друг друга, и только их совместное использование может обеспечить надежное долгосрочное хранение генетического разнообразия вегетативно размножаемых культур. По сравнению с полевыми коллекциями, *in vitro* и криоколлекции, как правило, более малочисленны (табл. 2). По данным ФАО, образцы вегетативно размножаемых культур составляют не более 10% от общего объема сохраняемых в генбанках образцов. При этом в коллекциях *in vitro* к концу 90-х годов сохранялось около 38000 образцов [50]. Следует отметить, что в настоящее время пересылку образцов рекомендуется проводить только семенами или в культуре *in vitro* [51, 52], так как особая компактность и изолированность пробирочных растений очень удобна для интродукции и обмена материала в любое время года, и удовлетворяет карантинным допускам, поскольку предотвращает перенос карантинных объектов с пересылаемым растительным материалом.

Создание активных *in vitro* коллекций (IVAG)

Для создания *in vitro* коллекций отбирают внешне здоровые растения полевых коллекций, которые являются источником эксплантов, вводимых в культуру *in vitro* (апексы побегов или меристемы). Отобранные растения тестируют на наличие вирусных, виroidных, микоплазменных и бактериальных инфекций. Для выявления этих патогенов применяют методы ПЦР-диагностики, молекулярной гибридизации, иммуноферментного анализа [5, 10]. Для обнаружения и идентификации бактериальных инфекций дополнительно используют микробиологические методы [42, 43]. Введение в культуру *in vitro* образцов полевых коллекций, представленных свободными от патогенов растениями, является наиболее эффективным и низкзатратным способом создания IVAG. Для образцов, пораженных вирусными или бактериальными инфекциями, рекомендуется

проводить оздоровление. Растения, зараженные вириодами, невозможно оздоровить, их элиминируют из коллекций.

Таблица 1. Способы сохранения генетического разнообразия вегетативно размножаемых растений – преимущества и недостатки

Способ	Преимущества	Недостатки
Естественные условия - полевые коллекции	1. Возможность изучения коллекций и возможность использования генофонда в селекционных и генетических программах.	1. Высокая вероятность потери образцов в результате накопления фитопатогенов, воздействия стрессовых абиотических факторов, урбанизации. 2. Требуют больших площадей. Высокая стоимость поддержания полевых коллекций; достаточно трудоемкие методы.
Хранение <i>in vitro</i>	1. Изоляция от патогенов и стрессовых факторов среды. 2. Компактность коллекции. 3. Освобождение от инфекций и оздоровление. 4. Удобная форма обмена. 5. Возможность массового и ускоренного размножения независимо от времени года. 6. Коллекции сохраняются в контролируемых условиях среды.	1. Относительно ограниченные сроки беспересадочного хранения. 2. Необходимо достаточно дорогостоящее оборудование. 3. Не исключена возможность генетических изменений при длительном хранении (необходимы дополнительные исследования). Риск утраты образцов в результате инфекции достаточно высок.
Крио-хранение	1. Изоляция от патогенов и стрессовых факторов среды. 2. Компактность коллекции. 3. Теоретически неограниченно долгий период хранения. 4. Теоретически минимальный уровень генетических изменений (необходимы дополнительные исследования). 5. Коллекции поддерживаются в контролируемых условиях среды. Низкая стоимость хранения образцов при сверхнизких температурах.	1. Узкий круг культур, для которых разработаны методы надежного криохранения. 2. Необходимо достаточно дорогостоящее оборудование. 3. Риск потери образцов в результате нарушения условий хранения достаточно высок. 4. Высокая стоимость закладки образцов на криогенное хранение.

Растения, пораженные вирусными инфекциями, подвергают суховоздушной термотерапии для освобождения от термоллабильных вирусов. Отросшие после термообработки молодые побеги используют для повторного тестирования на наличие вирусов. В том случае, если растения свободны от вирусной инфекции, в культуру *in vitro* вводят почки размером около 1 мм. Если растительный материал несет в себе вирусы, то для освобождения от них используют культуру изолированных апикальных меристем, уменьшая размер экспланта до 0,3 – 0,2 мм (меристема с одной парой листовых зачатков-примордиев) [39]. Мериклоны (микрорастения, полученные из меристем в культуре *in vitro*) повторно тестируют на присутствие различных патогенов, прежде чем переходить к их микроразмножению. Если не удастся освободиться от тестируемых вирусов с помощью культуры изолированных апикальных меристем, используют методы химиотерапии, основанные на введении в питательные среды химических веществ, ингибирующих развитие вирусов в растениях. Наиболее часто с этой целью употребляют химический рибавирин (виразол) (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide) [39]. В литературе имеются данные об антивирусных эффектах фенолкарбоновых кислот [8] и стероидных гликозидов [11].

Бактерии, ассоциированные с растениями, принадлежат более чем к 30 родам. Некоторые из них, например бактерии родов *Enterobacter* и *Bacillus*, являются патогенными исключительно в культуре *in vitro* (vitro parts) [6, 17]. Бактерии могут вызывать быструю гибель пробирочных растений, снижать их способность к микроразмножению и длительному хранению или находиться в латентном состоянии, пока не возникнут условия, благоприятные для их интенсивного размножения. При клональном микроразмножении растений часто возникает опасность появления в них внутренних бактериальных инфекций. В таком случае проводят антибактериальную химиотерапию, основанную на применении различных антибиотиков. Наиболее часто используются антибиотики: гентамицин, рифампицин, ампициллин, стрептомицин [38]. Длительное пребывание микрорастений на питательной среде с антибиотиками является нецелесообразным. Это может повысить вероятность возникновения генетических изменений, например, привести к появлению устойчивых к антибиотикам цитоплазматических мутантов. При длительном воздействии антибиотиков на бактерии также могут отбираться устойчивые штаммы, что снижает эффективность антибактериальной химиотерапии. Поэтому рекомендуется проводить предварительную идентификацию бактериальных инфекций, что позволяет выбирать наиболее эффективные антибиотики: широкого действия или комбинации специфических антибиотиков [17, 38, 42,]. Отсутствие бактериальных инфекций в микрорастениях проверяют методом отпечатков срезов стеблей на бактериальных средах. Свободные от бактериальных инфекций пробирочные растения являются основой для формирования IVAG и IVBG.

Основным методом поддержания *in vitro* коллекций является микроклональное размножение. Из известных способов микроклонального размножения растений (стимуляция развития пазушных почек, адвентивная регенерация, прямой соматический эмбриогенез и непрямой морфогенез) наиболее предпочтителен первый способ, поскольку главным требованием поддержания *in vitro* коллекций является генетическая идентичность размноженного материала. Стимуляция развития пазушных почек достигается либо удалением верхушечной почки (для растений с апикальным доминированием), либо введением цитокининов в питательные среды. Полученные микропобеги используют для дальнейшего микроразмножения, либо для укоренения. Для индукции корнеобразования микропобеги переносят на питательные среды с обедненным составом минеральных солей, либо на среды с добавлением ауксинов.

При хранении *in vitro* коллекций в оптимальных условиях роста (+20°C – +23°C) возникает необходимость частого переноса микрорастений на свежую питательную среду, что повышает стоимость хранения образцов и увеличивает риск инфицирования коллекций, особенно когда в работу вовлечены растения, не прошедшие тестирования на патогены. Для увеличения интервала между пассажами используют различные методы и приемы, основанные на замедлении роста пробирочных растений [4, 6]. Наиболее часто в качестве фактора, замедляющего рост растений, выступает пониженная температура в интервале от -1°C до +8°C (в зависимости от культуры) [38, 40, 53]. Для замедления роста *in vitro* растений некоторые исследователи изменяют фотопериод [45], снижают освещенность [9], снижают парциальное давление кислорода [15], модифицируют состав питательной среды [3, 40], используют разные материалы для закрытия пробирок или хранят образцы в полиэтиленовых запаянных пакетах вместо стеклянных пробирок [41].

Важным фактором продления срока беспересадочного хранения *in vitro* коллекций картофеля является способность растений образовывать микроклубни. Для стимулирования процесса клубнеобразования пробирочные растения переносят в условия укороченного светового дня (с 16-ти-часового светового режима - на 10-12-ти часовой). Кроме того, повышение концентрации сахарозы (40-60 г/л) в питательной среде также способствует стимуляции процесса клубнеобразования [12]. Учитывая естественный физиологический период покоя микроклубней, который искусственно продлевается за счет постоянного хранения образцов при низких положительных температурах (+2°- +5°C), а затем замедленное прорастание микроклубней в этих условиях, беспересадочный цикл хранения образцов можно продлить до 2-х- 3-х лет.

Выявлены видо- и сортоспецифичные эффекты, влияющие на способность микрорастений к среднесрочному хранению [9, 45]. По данным генбанка США, средняя продолжительность беспересадочного *in vitro* хранения образцов различных ягодных культур колеблется от 1,2 до 2,8 лет [45].

Таблица 2. In vitro и криоколлекции основных вегетативно размножаемых сельскохозяйственных культур умеренного климата

Род	Страна и место хранения коллекции	Число образцов	Литература
In vitro коллекции			
<i>Solanum</i>	Перу (CIP)	7168	[25]
<i>Solanum</i>	Германия (IPK)	1350	[32]
<i>Solanum</i>	Россия (ВИР)	350	
<i>Allium</i>	Россия (ВИР)	20	
<i>Allium</i>	Германия (IPK)	372	[46]
<i>Fragaria</i>	США (NCGR)	более 300 (core-коллекция 153)	[30]
	Россия (ИФР)	50	[4]
	Россия (ВИР)	44	
<i>Rubus</i>	США (NCGR)	более 250 (core-коллекция 94)	[30]
	Франция (Beaucouze)	118	[21]
	Россия (ВИР)	110	
	Румыния (Pitesti-Maracineni)	56	[21]
	Словения (Ljubljana)	30	[21]
	Швейцария (Wadenswil)	20	[21]
	Англия (West Malling)	12	[21]
<i>Ribes</i>	США (NCGR)	101 (core-коллекция 53)	[30],[44]
<i>Vaccinium</i>	США (NCGR)	94	[44]
<i>Malus</i>	China (ChIP)	более 150	[44]
<i>Pyrus</i>	США (NCGR)	175	[44]
<i>Cerasus,</i> <i>Prunus</i>	Россия (ВИР)	63	
<i>Corylus</i>	США (NCGR)	33	[44]
Криоколлекции			
<i>Solanum,</i> <i>Allium</i>	Германия (IPK)	~1000 (IVBG)	[32]
<i>Solanum</i>	Перу (CIP)	355 (IVBG)	[31]
<i>Malus</i>	США (NSSL, Fort Collins)	2100, спящие почки	[37]
<i>Pyrus</i>	США (NCGR, Corvalis)	106, апексы побегов	[37]
<i>Morus</i>	NIAR, Япония	50, спящие почки	[37]

Аббревиатура в скобках:

(ВИР) – Всероссийский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова (Россия)

(ИФР) – Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева (Россия)

(ChIP) – Changli Institute of Pomology (Китай)

(CIP) – International Potato Center, Lima, Perú (Перу)

(IPK) – Institut für Pflanzengenetik und Pflanzenforschung (Германия)

(NCGR) – National Clonal Germplasm Repository (США)

(NSSL) – National Seed Storage Laboratory (США)

Согласно современной стратегии, долгосрочное хранение *in vitro* коллекций возможно на основе использования технологий криогенного хранения. Поскольку при температуре жидкого азота (-196°C) останавливаются все биохимические и физические процессы в клетках, криогенные технологии обеспечивают теоретически неограниченно долгое хранение растений. Свободные от патогенов образцы активных коллекций (IVAG) служат для создания базовых *in vitro* коллекции (IVBG). Процесс создания IVBG включает следующие этапы: замораживание, собственно хранение в жидком азоте, размораживание и контроль жизнеспособности образцов после хранения. При создании IVBG для криоконсервации используют экспланты, полученные из *in vitro* растений (меристемы; апексы побегов; конгломераты почек, полученные на средах с высоким содержанием цитокининов) [14, 37]. В настоящее время существует достаточно широкий набор методов для криоконсервации растительного материала: медленное замораживание (slow freezing), витрификация, инкапсуляция-дегидратация, «droplet-method» [23, 27, 37, 43, 49, 55]. Наиболее высокие показатели жизнеспособности криосохраняемого материала получены для ряда плодовых и ягодных культур при использовании методов витрификации и инкапсуляции-дегидратации [18, 27, 43, 55]; для картофеля, мяты, луков, чеснока – при использовании «droplet-method» [32, 49]. Кроме того, принадлежность образцов к определенному роду, виду и/или сорту также оказывает влияние на жизнеспособность криосохраняемого материала. Для ряда культур, например, малины, выживаемость апексов после криохранения достигает 90% [18, 27, 55].

Методы криоконсервации используются и для оздоровления растений от вирусных инфекций (криотерапия) поскольку после размораживания выживает лишь небольшое число клеток в апексах побегов. Так, после криоконсервации апексов побегов инфицированных вирусами растений банана, сливы, винограда получен свободный от вирусных инфекций материал [29, 56].

Идентификация образцов *in vitro* коллекций; проблема генетической стабильности

При хранении больших коллекций неизменно возникает проблема контроля, идентификации и документации сохраняемого генофонда. Ювенильное состояние микрорастений в коллекциях *in vitro* не позволяет использовать морфологические признаки для идентификации образцов; для этих целей широко используются белковые (изоферментные) [7, 35, 36] и ДНК [1, 16, 35] маркеры. В настоящее время в целях генотипирования образцов *in vitro* коллекций наиболее часто используют ДНК-маркеры (SSR [1, 22], SSR и AFLP маркеры [31], RAPD [35]).

ДНК-маркеры используют также для контроля генетической стабильности образцов длительно сохраняемых в контролируемых условиях среды. В большинстве подобных работ при проведении оценки генетической стабильности образцов после хранения *in vitro* (микрорастения) или после криосохранения (меристемы, апексы, пыльца) не были выявлены генетические изменения при сравнении с контрольными растениями, представленными полевыми аналогами тех же самых образцов [33, 28, 48]. Результаты наших исследований также показали, что SSR- и RAPD-спектры пробирочных растений картофеля, длительное время сохраняемых в условиях *in vitro*, и спектры их полевых аналогов были идентичными [2]. Увеличение срока хранения микрорастений в условиях *in vitro* не вызывало изменений в спектрах ДНК. Несоответствия в ДНК-спектрах *in vivo* и *in vitro* растений одного и того же сорта, выявленные в нескольких случаях, были связаны с генетическим полиморфизмом сорта или с ошибками в поддержании образца [2]. В отдельных публикациях различия в спектрах *in vivo* и *in vitro* растений одного сорта авторы объясняли соматклональной изменчивостью, хотя эти различия могут быть связаны и с внутрисортным полиморфизмом [28, 34]. Так, гетерогенность отдельных сортов картофеля, поддерживаемых традиционным способом в полевых условиях, была продемонстрирована с помощью RFLP-, RAPD- и SSR-анализов [13, 20, 24]. В плане дальнейшего развития методологии изучения генетической стабильности растений *in vitro* коллекций, следует уделять серьезное внимание созданию контрольных вариантов. Для этого на первоначальном этапе введения образца в культуру *in vitro* необходимо отдельно выделить ДНК у исходного «полевого» растения, являющегося донором меристем. В дальнейшем спектры ДНК мериклонов должны сравниваться с ДНК исходного «полевого» растения (контроль соматклональных вариантов), а также с оригиналом сорта (контроль подлинности и чистоты сорта). В этом случае неоднозначность трактовки результатов генетического несоответствия *in vivo* и *in vitro* образцов может быть сведена к минимуму [2]. Следует отметить, что использование ДНК-маркеров позволяет изучить стабильность лишь отдельных локусов ДНК, однако не дает информации о стабильности всего генома. Данный подход следует рассматривать как один из этапов изучения генетической стабильности сохраняемых в условиях *in vitro* образцов. Окончательный вывод о генетической стабильности и подлинности образцов, сохраняемых в условиях *in vitro*, можно сделать после высадки материала в поле и проведения сравнительной оценки этих образцов с их полевыми аналогами по основным морфологическим признакам и агрономическим характеристикам [47, 53].

Если цикл «введение в культуру *in vitro* – микроразмножение – хранение» не включал каллусной стадии и был основан на развитии

микрорастений из почек или меристем (организованных тканей), то полученные клоны, как правило, сохраняют все генотипические характеристики исходного образца. Поэтому этот способ получения микрорастений является общепринятым для создания обоих типов *in vitro* коллекций - IVAG и IVBG.

***In vitro* коллекция в ВИРе** создается на основе изложенной выше стратегии, которая в настоящее время является общепринятой для долгосрочного хранения образцов вегетативно размножаемых растений в контролируемых условиях среды. Данная коллекция формируется преимущественно на основе образцов полевых коллекций ВИР, отсутствующих в других генбанках. В последние годы в культуру *in vitro* активно вводятся образцы разного географического и экологического происхождения, произрастающие на территории России. *In vitro* коллекция ВИР включает представителей родов: *Solanum* (~350 образцов), *Rubus* (~120 образцов), *Cerasus* (65 образцов), *Ribes* (~50 образцов), *Fragaria* (35 образцов), *Lonicera* (~30 образцов), *Sorbus* (10 образцов) – всего около 700 образцов. Проводится тестирование образцов полевых коллекций и пробирочных клонов на наличие соответствующих для каждой культуры вирусных инфекций (методами ИФА), эндофитных бактериальных инфекций (стандартными микробиологическими методами). Поддержание и хранение образцов в коллекции *in vitro* ВИР осуществляется на основе стандартных приемов, принятых в генетических банках растений с учетом разработанных в ВИРе модификаций. Генотипирование аборигенных и селекционных сортов картофеля проводится на основе ядерных микросателлитных маркеров [1, 13]. Наиболее информативными для генотипирования образцов малин и ежевик оказались 3 из 12 исследованных систем: эстеразы, пероксидазы и лейцинаминопептидазы. Изоферментный анализ позволил однозначно идентифицировать 45 изученных образцов рода *Rubus* из *in vitro* коллекции ВИР [7].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рассмотренная выше стратегия является в настоящее время общепринятой для долгосрочного хранения образцов вегетативно размножаемых растений в контролируемых условиях среды. Данная стратегия включает: оздоровление, введение в культуру *in vitro*, индексацию наличия фитопатогенов в микрорастениях, микроразмножение, генотипирование образцов, среднесрочное сохранение активных *in vitro* коллекций и закладку образцов на долгосрочное криохранилище. Необходимо отметить, что круг культур, для которых разработан весь

комплекс перечисленных выше методов достаточно ограничен. Для долгосрочного сохранения агробиоразнообразия вегетативно размножаемых растений необходима дальнейшая разработка теории и методов *in vitro* и криохранения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Костина Л.И., Мальшев Л.Л., Гавриленко Т.А. Генетическая дифференциация сортов картофеля с использованием SSR маркеров// Аграрная Россия. 2004. № 6. 2004. С.19-24.
2. Антонова О.Ю., Трускинов Э.В., Фролова Д.В., Гавриленко Т.А. Анализ генетической стабильности образцов картофеля, сохраняемых в условиях *in vitro*// Аграрная Россия. 2004. №6. С. 25-29.
3. Высоцкая О.Н. Длительное сохранение *in vitro* коллекции растений земляники// Физ. растений. 1994. Т.41. №6. С. 935-941.
4. Высоцкий В.А., Высоцкая О.Н. Культура *in vitro* для длительного хранения ценных генотипов// Материалы Мичуринских чтений. 2002. Мичуринск. С. 12-13.
5. Гавриленко Т.А., Антонова О.Ю., Rogozina E.B. Создание устойчивых к вирусам растений картофеля на основе традиционных подходов и методов биотехнологии //В кн. "Идентифицированный генофонд растений и селекция" (под. ред. Б.В. Ригина). 2005. СПб. ВИР. С. 644-662.
6. Дунаева С.Е., Гавриленко Т.А. Коллекции *in vitro* плодовых и ягодных культур: стратегия создания и хранение// Том трудов ВИР. 2007. Т. 61 (в печати)
7. Дунаева С.Е., Кудрякова Н.В., Мальшев Л.Л., Лупышева Ю.В., Гавриленко Т.А. *In vitro* коллекция малин и ежевик и идентификация образцов по изоферментным спектрам//Аграрная Россия. 2005. № 2. С. 49-55
8. Петрова А.Д., Упадышев М.Т. Оздоровление и размножение садовых культур *in vitro*// Садоводство и виноградарство. 2002. №4 С.12-13.
9. Романова Н.П., Ульянова Е.К. К вопросу о хранении мериклонов земляники *in vitro*// Научно-технический бюллетень ВИР. 1990. Вып. 204. С. 75-79.
10. Технологический процесс получения безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур (Методические указания). 2001. Москва. 108 с.
11. Трускинов Э.В., Rogozina E.B. Оздоровление клоновой коллекции картофеля в культуре ткани// Физиология растений. 1997. Т.43. № 3. С.432-439.
12. Трускинов Э.В. Поддержание и хранение коллекционных образцов картофеля в условиях *in vitro*. 1987. Ленинград. 40 с.
13. Antonova O., Kostina L., Gavrilenko T., Schuler K., Thieme R. Proof of long-term stored potato germplasm by use of molecular markers.: Rudolf Mansfeld and Plant Genetic Resources. Schriften Genet. Ressourcen. 2003. V.18. P. 192-197.
14. Bajaj Y.P.S. Cryopreservation of plant cell, tissue and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity// Biotechnology in Agriculture and Forestry – Cryopreservation of Plant Germplasm I. 1995.V. 32.P. 3-18.
15. Brindgen M.P., Staby G.L. Low Pressure and Low Oxygen Storage of *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum morifolium* Tissue Cultures// Plant Sci. Lett. 1981. V.22. №1. P.177.
16. Carcia M.G., Ontivero M., Diaz Ricci J.C., Castanaro A. Morphological Traits and High Resolution RAPD Markers for the Identification of the Main Strawberry Varieties Cultivated in Argentina//Plant Breed. 2002. V.121. №1. P.76-80.
17. Cassels A.S. Problems in Tissue Culture: Culture Contamination. P.31-44.//In: Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. (P.C.Debergh and R.H.Zimmerman. eds.). Dordrecht. Netherlands.1991.