

## КОЛЛЕКЦИИ ПЛОДОВЫХ И ЯГОДНЫХ КУЛЬТУР *IN VITRO* (СТРАТЕГИЯ СОЗДАНИЯ И ХРАНЕНИЕ)

В настоящее время сохраняемые в генетических банках коллекции генетических ресурсов растений принято подразделять на три типа: базовые, активные и дублетные. Базовые коллекции сохраняют в условиях, обеспечивающих их длительное хранение (*long-term conservation*), доступ к ним предельно ограничен. Активные коллекции служат для восстановления, размножения, рассылки и изучения образцов и сохраняются в условиях, обеспечивающих среднесрочное хранение (*medium-term conservation*). Дублетные коллекции хранят отдельно от базовой коллекции с целью увеличения надежности хранения [17].

Применительно к коллекциям вегетативно размножаемых культурных растений в базовые коллекции включаются все образцы, сохраняемые в полевых условиях [6] и образцы, заложенные на хранение при температуре  $-196^{\circ}\text{C}$  (при развитии методов надежного криосохранения). Коллекции *in vitro* создаются как часть активной и дублетной коллекций. Состав и размер *in vitro* коллекций определяется структурой *core-collections* генофонда каждой культуры, требованиями международного обмена, необходимостью оздоровления, размножения и дублирования наиболее ценных экземпляров полевой коллекции. Коллекции *in vitro* обеспечивают сохранение оздоровленных от патогенов образцов вегетативно размножаемых растений в контролируемых условиях среды.

В крупных мировых генбанках присутствуют все три системы хранения генетического материала культурных растений, размножаемых вегетативно (полевые, *in vitro* и криоколлекции), поскольку каждая из перечисленных выше систем хранения имеет свои преимущества и недостатки (табл. 1).

Генофонд плодовых и ягодных культур умеренного климата представлен преимущественно полевыми коллекциями и сосредоточен в генбанках и научно-исследовательских институтах. Наиболее трудоемкие и дорогие криоколлекции и коллекции *in vitro*, как правило, немногочисленны (табл. 2) по сравнению с полевыми коллекциями и поддерживаются не во всех подразделениях, сохраняющих генофонд ягодных и плодовых культур.

## Стратегия создания *in vitro* коллекций. Получение свободных от фитопатогенов растений.

Коллекции *in vitro* формируются из меристемных клонов, свободных от патогенов, и сохраняются в контролируемых условиях среды. Наиболее вредоносными патогенами как полевых, так и *in vitro* коллекций ягодных и плодовых культур, являются бактерии, вирусы и микоплазмы.

Большинство бактерий, ассоциированных с растениями принадлежат к следующим родам: *Acetobacter*, *Acetobacterium*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azotomonas*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Citrobacter*, *Chromobacterium*, *Clavibacter*, *Curtobacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Kurthia*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Oerskovia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sarcinia*, *Serratia*, *Staphylococcus*, и *Xanthomonas* [13]. Некоторые из указанных родов бактерий, например *Enterobacter*, *Bacillus* являются патогенными исключительно в культуре *in vitro* (vitroparts). Бактерии могут вызывать быструю гибель пробирочных растений, снижать их способность к микроклональному размножению и хранению или находиться в латентном состоянии, пока не возникнут условия, благоприятные для их интенсивного размножения. Например, *Lactobacillus plantarum* переходит к интенсивному размножению в условиях повышенной температуры, а виды *Agrobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* и *Erwinia* активизируются в условиях *ex vitro*, приводя к потере образцов [28].

Степень поражения полевых коллекций вирусными и микоплазменными инфекциями (МПО) зависит от генотипа растений, штамма вирусов, зоны произрастания культуры и условий среды. Наиболее распространенные и экономически значимые вирусные и микоплазменные болезни для *Fragaria*, *Rubus* и *Ribes* приведены в табл. 3.

Для создания коллекций *in vitro* отбирают внешне здоровые клоны образцов. Растения выращивают в оранжереях в условиях, недоступных для переносчиков вирусов и тестируют на наличие вирусных, микоплазменных и бактериальных инфекций. Для выявления этих патогенов применяют методы ПЦР-диагностики, молекулярной гибридизации, иммуноферментного анализа (ИФА); для обнаружения бактериальных инфекций дополнительно используют микробиологические методы.

Зараженные вирусами растения подвергают суховоздушной термотерапии для освобождения от термолабильных вирусов. Отросшие после термообработки молодые побеги используют для повторного тестирования на вирусы и вычленения меристем. В том

случае, если растения свободны от вирусной инфекции, в культуру *in vitro* вводят почки (размер 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) [24].

Мериклоны (микрорастения, полученные из меристем в культуре *in vitro*), повторно тестируют на присутствие различных патогенов, прежде чем переходить к их микроразмножению. Если освободиться от тестируемых вирусов не удастся с помощью культуры изолированных апикальных меристем, используют методы хемотерапии, основанные на введении в питательные среды химических веществ, ингибирующих развитие вирусной инфекции в растениях *in vitro*. Наиболее часто с этой целью употребляют химический рибаверин (вирозол, 1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), который предотвращает репликацию вирусов в растениях [24]. В последнее время появились данные об ингибирующем влиянии на ряд вирусов груши, рябины, ежевики и малинно-ежевичных гибридов фенолкарбоновых кислот – салициловой, сиреневой, кофейной, галловой, феруловой и кумаровой [5].

Методы микроразмножения основаны на подавлении апикального доминирования, которое достигается либо удалением верхушечной почки, либо повышением содержания цитокининов в питательных средах. Размножение мериклонов проводят методом черенкования (если растения имеют удлиненные междоузлия) или методом активации формирования новых пазушных почек. Второй способ обеспечивает более высокий коэффициент размножения клонов.

При клональном микроразмножении растений часто возникает опасность появления в них внутренних бактериальных инфекций. В таком случае проводят антибактериальную хемотерапию, основанную на применении антибиотиков. К сожалению, ткани растений чувствительны к различным антибиотикам, и эта реакция зависит от генотипа растений. Повреждения касаются главным образом хлоропластов и митохондрий. Длительное пребывание клеток и тканей на питательной среде с антибиотиками может привести к развитию устойчивости к ним, обусловленной цитоплазматическими мутациями. Состав культуральной среды может снижать активность антибиотиков. Рекомендуют проводить идентификацию бактериальных инфекций, что позволит выбрать наиболее эффективные антибиотики: широкого действия или комбинации специфических антибиотиков. В последнем случае снижается риск возникновения устойчивости к антибиотикам, особенно в случае их синергичного действия. Однако при этом следует учитывать, что некоторые

сочетания антибиотиков могут быть химически несовместимы и нейтрализовывать действие друг друга [16].

Размноженные и свободные от фитопатогенов пробирочные растения переносят на питательные среды для индукции корнеобразования, после чего закладывают на длительное хранение на питательной среде, не содержащей гормонов [26].

Если цикл «введение в культуру *in vitro* – микроразмножение» не включал каллусной стадии и был основан на развитии микрорастений из меристем (организованных тканей), то полученные мериклоны, как правило, сохраняют все генотипические характеристики исходного образца. Поэтому этот способ получения *in vitro* растений для последующего сохранения генотипов в условиях *in vitro* является общепринятым.

### **Хранение образцов ягодных и плодовых культур в условиях *in vitro*.**

Развитие методов хранения ягодных и плодовых культур в условиях *in vitro* началось с середины 70-х годов. Несмотря на то, что методы *in vitro* хранения нашли широкое применение, число публикаций на эту тему сравнительно невелико.

При хранении коллекций *in vitro* в оптимальных условиях роста растений ( $t = 20\text{--}23^{\circ}\text{C}$ ), возникает необходимость частого переноса микрорастений на свежую питательную среду, что повышает стоимость хранения образца и увеличивает риск его инфицирования различными микроорганизмами, особенно когда в работу вовлечены растения, не прошедшие тестирования на патогены. Кроме того, частое пассирование микропобегов стимулирует активное деление клеток, что может способствовать возникновению соматональных вариантов. Для увеличения интервала между пассажами используют различные методы и приемы, основанные на замедлении роста пробирочных растений.

Успешное хранение в культуре *in vitro* растений ягодных и плодовых культур определяется многими факторами, из которых влияние температуры является наиболее изученным. Так, в качестве фактора, замедляющего рост растений, может выступать пониженная температура в интервале от  $-1^{\circ}\text{C}$  до  $+8^{\circ}\text{C}$ . Следует учитывать, что виды растений различаются по своим потребностям в отношении температуре, освещенности, фотопериода. Так, например, тропические растения *in vitro* при температуре хранения от  $-1^{\circ}\text{C}$  до  $+8^{\circ}\text{C}$  быстро теряют жизнеспособность, поэтому для хранения этих культур используют температуру в интервале от  $+14^{\circ}\text{C}$  до  $+18^{\circ}\text{C}$  [25].

Увеличение длительности беспересадочного хранения пробирочных растений достигается при повышении их устойчивости к холоду. Для этого проводят закалку пробирочных растений, воздействуя на них каждые сутки попеременно положительной и отрицательной температурами (+22°C 8 часов на свету / –1°C 16 часов в темноте) на протяжении одной недели. Такая процедура дает хорошие результаты при последующем хранении *in vitro* коллекций *Ribes*, *Fragaria*, *Rubus*, *Corylus*, *Pyrus*, *Vaccinium* [26].

Для замедления роста растений в культуре *in vitro* некоторые исследователи модифицируют состав питательной среды [1, 26], сокращают фотопериод [26], используют разные материалы для закрытия пробирок [2] или хранят образцы в полиэтиленовых запаянных пакетах вместо стеклянных пробирок [27]. К снижению скорости роста пробирочных растений приводит также их хранение в условиях низкого парциального давления кислорода [9] или под слоем минерального масла [10].

Повышенная концентрация сахарозы (4–5%) в питательной среде задерживает рост клеток, не вызывая токсического эффекта, и поэтому также может быть использована для поддержания культур в состоянии покоя в течение длительного периода. Кроме того, высокий уровень сахарозы, аналогично действию пролина, обеспечивает растительным клеткам возможность без повреждения переносить температуру ниже 0°C [24].

Отмечают также и другие, не менее важные факторы. Так, одиночные верхушки побегов, междоузлия и культуры с множественными побегами различаются по длительности хранения [23]. Жизнеспособность микрорастений при длительном хранении зависит также от условий при последнем субкультивировании [11], а также от наличия в микрорастениях латентной инфекции [30]. В табл. 4 приведены данные по *in vitro* хранению образцов некоторых ягодных культур в генбанке США. Хранение микрорастений осуществлялось в газопроницаемых полиэтиленовых пакетиках при температуре +4°C в темноте после закалки в течение одной недели (+22°C 8 часов на свету / –1°C 16 часов в темноте). Максимальные сроки *in vitro* хранения – более 2,5 лет были отмечены для представителей *Ribes*, сохраняемых в темноте при –1°C [29].

### **Идентификация образцов растений в культуре *in vitro***

Ювенильное состояние микрорастений в коллекциях *in vitro* не позволяет идентифицировать сорта по морфологическим признакам пробирочных растений.

Использование белковых (изоферментных) [19, 22] и ДНК-овых [12, 15] маркеров является эффективным широко используемым подходом для идентификации и регистрации образцов в коллекциях *in vitro*. Молекулярные маркеры используют также и для контроля генетической стабильности *in vitro* образцов, длительно сохраняемых в контролируемых условиях среды. Следует отметить небольшое число исследований, направленных на изучение генетической стабильности, что, вероятно, связано с неоднозначностью трактовки этой проблемы, а также со сложностью интерпретации полученных результатов. Результаты немногочисленных работ по оценке генетической стабильности образцов после хранения в культуре *in vitro* (микрорастения) или после криохранения (меристемы, пыльца) не выявили генетических изменений по сравнению с контрольными растениями, представленными полевыми аналогами данных образцов [20, 24, 29].

Для поддержания генетической стабильности *in vitro* растений необходимо уменьшить риск образования адвентивных побегов, для чего рекомендуется ограничить, насколько это возможно, использование регуляторов роста в питательных средах и снизить частоту субкультивирований в цикле микроразмножения растений [21, 29].

### **Коллекции *in vitro* ягодных и плодовых культур Всероссийского НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР)**

Основную долю в коллекциях *in vitro* ВИР составляют отечественные и стародавние сорта, а также доноры и источники ценных селекционных признаков (табл. 5). Коллекции *in vitro* ВИР, поддерживаемые в живом виде лабораторией биотехнологии совместно с отделом генетических ресурсов плодовых культур, сохраняются как вегетирующие растения в условиях ограниченного роста при температуре +2–5°C. В зависимости от генотипа, образцы земляники, малины, ежевики и вишни сохраняются в культуре *in vitro* от 6 до 24 месяцев, без переноса на свежую питательную среду.

В лаборатории биотехнологии ВИР проводятся исследования по оптимизации условий *in vitro* хранения для различных образцов земляники и малины. В этих работах была изучена жизнеспособность растений при длительном хранении в зависимости от освещенности, сортовых особенностей, состава и состояния питательной среды, условий герметизации пробирок. Жизнеспособность *in vitro* растений определяли по следующим

показателям: высота растений, число листьев (зеленых, желтых, сухих), в ряде вариантов – число корней (для земляники).

Так, изучение жизнеспособности двенадцати сортов земляники при длительном хранении *in vitro* позволило выявить лучшие условия (температура 1–4°C, слабая освещенность 500 люкс, фотопериод 16 час), дающая возможность сохранять мериклоны до 2–3 лет без переноса на свежую питательную среду. При этом отмечена сортоспецифичная реакция на разные варианты питательной среды. Однако состав испытанных сред не оказывал существенного влияния на жизнеспособность растений [7].

Жизнеспособность большинства изученных сортов малины и земляники была достоверно выше при хранении под полипропиленовой пленкой (толщина 40 микрометров) по сравнению с вариантами хранения тех же сортов в пробирках, закрытых алюминиевой фольгой. Уровень питательной среды в пробирках, закрытых фольгой, в течение 8 месяцев снижался, в то время как в пробирках под пленкой он практически не уменьшался, что, вероятно, отражает более оптимальные условия влажности, обеспечивающие лучшую жизнеспособность растений, сохраняемых под полипропиленовой пленкой [4].

Диагностика вирусных инфекций в коллекциях *in vitro* ягодных культур ВИР проведена с использованием метода ИФА для вируса кустовой карликовости малины и ежевики (RBDV) и метода ПЦР для вируса желтой сетчатости малины и ежевики (RYNV). Из 72 тестированных *in vitro* растений малины и ежевики вирус RBDV был отмечен у 6 сортов малины. В полевой коллекции из 85 проверенных на наличие вируса RBDV образцов рода *Rubus* положительный результат показали 28 образцов (Иванова М. Н., не опубликованные данные).

Важным этапом работы с *in vitro* коллекциями являлась идентификация генотипов, которая была проведена для коллекции малины и ежевики с помощью полиморфных изоэнзимных систем. Изоферментный анализ позволил однозначно идентифицировать все 45 изученных генотипов рода *Rubus*. При этом наиболее информативными и экономичными для дифференциации сортов оказались три ферментные системы из двенадцати исследованных: эстераза (Est), пероксидаза (Px) и лейцинаминопептидаза (LAP). На основе зимограмм LAP и Px изученные образцы были разделены соответственно на 17 и 40 групп, включавших от одного до восьми образцов. По системе эстеразы каждый образец имел уникальный тип спектра, образованный разнообразными сочетаниями 20 различных изоформ. Таким образом, уровень изменчивости изоферментов в роде *Rubus* позволил с высокой достоверностью идентифицировать образцы в *in vitro* коллекции ВИР [19].

В заключение следует отметить, что рассмотренная выше стратегия получения мериклонов и их хранения *in vitro* является на сегодняшний день практически единственным надежным способом, используемым в мировой практике для оздоровления вегетативно размножаемых растений и сохранения свободных от фитопатогенов образцов в контролируемых условиях среды. Дальнейшая разработка теории и методов длительного и надежного хранения генетического разнообразия вегетативно размножаемых растений в условиях *in vitro* или при сверхнизких температурах необходима для сохранения уникального генофонда ягодных и плодовых культур ВИР.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Высоцкая О. Н.* Длительное сохранение *in vitro* коллекции растений земляники. //Физ. растений. 1994. Т. 41. №6. С. 935–941.
2. *Высоцкая О. Н.* Длительное сохранение растений картофеля (*Solanum tuberosum*) в коллекциях *in vitro* без обновления питательной среды. //Генетические ресурсы культурных растений. Международная научно-практическая конференция. СПб. 2001. С. 20–21.
3. *Высоцкий В. А., Высоцкая О. Н.* Культура *in vitro* для длительного хранения ценных генотипов. //Материалы Мичуринских чтений. Мичуринск. 2002 г. С. 12–13.
4. *Пазова З. Х., Луньшева Ю. В.* Оптимизация условий длительного хранения малины и земляники в культуре *in vitro*. //Сборник молодых специалистов ВИР (в печати).
5. *Петрова А. Д., Унадышев М. Т.* Оздоровление и размножение садовых культур *in vitro*. //Садоводство и виноградарство, №4, 2002. С. 12-13.
6. *Плеханова М. Н.* Коллекции генетических ресурсов плодовых и ягодных культур: структура и проблемы сохранения в живом виде. //Материалы Мичуринских чтений. Мичуринск. 2002. С. 4.
7. *Романова Н. П., Ульянова Е. К.* К вопросу о хранении мериклонов земляники *in vitro*. //Научно-технический бюллетень ВИР. 1990. Выпуск 204. С. 75–79.
8. *Технологический процесс получения безвирусного посадочного материала плодовых и ягодных культур. (Методические указания) /Сост.: Кашин В. И., Борисова Ю. И. и др., 2001. С. 108.*
9. *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.
10. *Calpin S. M.* Mineral Oil Overlay for Conservation of Plant Tissue Cultures. //Am. J. Bot. 1959. V. 46. №5. P. 324.
11. *Caο, Z., Qi Y., Wang J., Li, W.* Grape Germplasm in Vitro Conservation at Room Temperature. //Int. Symp. Hortic. Germplasm Cultivated and Wild. Chinese Society for Horticultural Sciences. Beijing, China. 1988. P. 12.
12. *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. 121. №1. P. 76-80.
13. *Cassels A. S.* Problems in Tissue Culture: Culture Contamination. P. 31-44. In: P. C. Debergh and R. H. Zimmerman (eds.). Micropropagation Technology and Application. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. Netherlands. 1991.
14. *Directory of European Institutions Holding Crop Genetic Resources Collections.* 1995. Ed. E. A. Frison, J. Serwinski. IPGRI.
15. *Dougl G., Savage, Mendum Mary Lou Prins Bernard H., Walker M. Andreu, Meredith Carole P., Simon Charles J.* Simple Sequence Repeat Analysis of a Clonally Propagated Species: A Tool for Managing a Grape Germplasm Collection. //Genome. 2001. V. 44. №3. P. 432-438.



16. *Falkiner F. R.* Antibiotics and Antibiotic Resistance Associated Witch Plants, Fruits and Vegetables.// Proc. Int. Symp. on Merth. and Marks. for Qual. Assur. in Micropropagation Eds. A. C. Cassels, B. M. Doyle, R. F. Curry. Acta Hort. 2000. V. 530. P. 83-91.
17. *Genebank standards.* FAO/IPGRI. 1994.
18. <http://www.ars-grin.gov/ars/PacWest/Corvallis/ncgr>
19. *Kudryakova N. V., Dunaeva S. E.* 2001. Prospects for the of Isozyme Markers in Identification of *Rubus* Samples Propagated in Vitro. //Scientific Works of the Lithuanian Institute of Horticulture and Lithuanian University of Agriculture, Horticulture and Vegetable Groving. V. 20 (3). P. 79-83.
20. *Kumar M. B.* Genetic Stability of Micropropagated and in vitro cold-stored strawberries. //MSc Thesis, Oregon State University, USA. 1995.
21. *Management of Field and in Vitro Germplasm Collection.* //Proceeding of a Consultation Meeting. Colombia. 1996. P. 163.
22. *Nehra N. S., Kartha K. K., Stushnoff C.* Isozymes as Markers for Identification of Tissue Culture and Greenhouse-Grown Strawberry Cultivars. //Can. J. Plant Sci. 1991. V. 71. P. 1195-1201.
23. *Orlikowska T.* Effect of in Vitro Storage at 4° C on Survival and Proliferation of Apple Rootstocks. Acta Hort. 1991. V. 289. P. 251-253.
24. *Plant Propagation by Tissue Culture. Handbook and Directory of Commercial Laboratories.* Eds. Edwin F. Georg, Paul D. Sherrington. 1984. P. 695.
25. *Rao Ramantha V., Rile Kenneth W.* Review. The Use of Biotechnology for Conservation and Utilization of Plant Genetic Resources. //Plant Genetic Resources Nesletter. 1994. № 97.
26. *Reed B.* In Vitro Culture and Cryogenic Preservation. An Operation Manual for the National Clonal Germplasm Repository. Corvallis. Or. 1999. P. 46.
27. *Reed B. M.* Cold Storage of Strawberries In Vitro: A Comparison of Three Storage Systems. //Fruit Varieties Journal. 1992. V. 46(2). P. 98-102.
28. *Reed B. M., Buckley P. M.* Bacteriology Handbook. 1999. NCGR. Corvallis, Or. USA. P. 39.
29. *Reed B. M., Chang Y.* Medium-and Long- term Storage of In Vitro Cultures of Temperate Fruit and Nut Crops. In: Conservation of Plant Genetic Resources In Vitro. Vol. 1: General Aspects. Eds. M. K. Razdan, E.C.Cocking, d. sc., M/S. Science Publishers, Inc. U. S. A. 1997. P. 67-105.
30. *Wanas W. H., Collow J. A., Lindsey A. W.* Growth Limitation for the Conservation of Pea Genotypes. //Plant Tissue Culture and its Agricultural Application. London: Butterworths. 1986. P. 285.