

Список литературы

1. Белоруссова А.С., Третьякова И.Н. Особенности формирования соматических зародышей у лиственницы сибирской: эмбриологические аспекты // Онтогенез. – 2008. – Т. 39, № 2. – С. 1-10.
2. Перспективы применения методов биотехнологии для размножения генетически ценных форм лесных древесных видов / Третьякова И.Н., Белоруссова А.С., Носкова Н.Е., Савельев С.С., Лукина А.В., Барсукова А.В., Ижболдина М.В., Череповский Ю.А. // Хвойные boreальной зоны. – 2007. – Т. 24, № 2-3. – С. 309-318.
3. Klimaszewska K., Cyr D. R. Conifer somatic embryogenesis: I. Development // Dendrobiology. – 2002. – V. 48. – P. 31-39.
4. An improved method for somatic plantlet production in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*): Part 2. Control for germination and plantlet development / Lelu M.A., Bastien C., Klimaszewska K., Charest P.J. // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. – 1994. – V. 36. – P. 117-127.
5. Lelu-Walter M-A., Bernier-Cardou M., Klimaszewska K. Clonal plant production from self- and cross-pollinated seed families of *Pinus sylvestris* (L.) through somatic embryogenesis // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. – 2008. – V. 92. – P. 31-45.
6. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. – 1962. – V. 15, N 4. – P. 473-497.
7. Park Y-S. Implementation in conifers somatic embryogenesis in clonal forestry: technical requirement and development considerations // Ann. For. Sci. – 2002. – V. 59. – P. 651-656.
8. Plant cell, tissue and organ culture: fundamental methods / Eds. O.L. Gamborg, G.C. Phillips. – Berlin: Springer-Velag, 1995. – 358 p.

СОМАТИЧЕСКИЙ ЭМБРИОГЕНЕЗ И ОРГАНОГЕНЕЗ КАК ОСНОВА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМ ПОЛУЧЕНИЯ И СОХРАНЕНИЯ ДЕКОРАТИВНЫХ И ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР

И.В. МИТРОФАНОВА, *доктор биологических наук*
Никитский ботанический сад – Национальный научный центр

Введение

Биотехнологические подходы, основанные на культивировании органов и тканей многолетних садовых растений вне организма, на искусственных питательных средах в регулируемых асептических условиях, открывают принципиально новые возможности для фундаментальных и прикладных исследований. Растительные системы *in vitro* являются удобными моделями для исследования сложных механизмов, лежащих в основе пролиферации, клеточной дифференцировки, гистогенеза, органогенеза, соматического эмбриогенеза и регенерации целого организма из культивируемых клеток, обладающих totipotентностью [1-3, 6, 7, 15, 16, 18, 22, 32]. В прикладном аспекте на основе знаний о биологии клетки *in vitro* разрабатываются меристемные технологии, эмбриокультура, гаплоидные технологии, клеточная селекция, генная и клеточная инженерия [4, 5, 8, 10, 20].

Экспериментально созданные системы *in vitro* весьма многообразны. Используя системы *in vitro*, реализацию totipotентности клетки высшего растения можно направить как по пути соматического эмбриогенеза, так и органогенеза. Количество компетентных клеток зависит от вида, подвида, сорта и типа исходного экспланта. Сохранение проэмбриогенных клеток при субкультивировании находится также в зависимости от трофических и гормональных факторов среды [1, 3, 4, 7, 9, 20, 24].

Тотипотентность клеток растений является фундаментальной основой биологии высших растений. При этом соматический эмбриогенез – наиболее яркое свидетельство тотипотентности растительной клетки. В отличие от зиготического эмбриогенеза соматический можно разделить на две стадии: 1) начальная клеточная фаза; 2) переход к эмбриогенезу и развитию зародыша *in vitro* начиная с глобулярной стадии, через стадии сердечка и торпеды к семядольной фазе и развитию проростка. Изучение самых ранних этапов процесса эмбриогенеза *in vitro* является одним из важных моментов исследований в области соматического эмбриогенеза. Ученые могут выявить не только сигналы и индукторы этого процесса, но и механизмы переключения дедифференцированной клетки на другой путь развития.

Первые результаты по индукции соматического эмбриогенеза были получены в суспензионной культуре моркови [29, 31]. В 1980 г. были описаны два пути соматического эмбриогенеза [30]. Первый путь – прямой соматический эмбриогенез, когда зародыши образуются непосредственно из клеток экспланта без этапа каллусообразования. В этом случае соматические зародыши формируются из «проэмбриогенных детерминированных клеток», которые уже работают на развитие эмбриоида и нуждаются только в освобождении. Второй – непрямой или косвенный эмбриогенез, когда пролиферация каллуса является необходимым этапом. В непрямом соматическом эмбриогенезе задействованы «индуцированные эмбриогенные детерминированные клетки». Наряду с первичным соматическим эмбриогенезом встречается вторичный эмбриогенез, когда на поверхности сформировавшихся соматических зародышей образуются добавочные эмбриоиды.

Т.Б. Батыгиной в 1978 г. в качестве новой категории вегетативного размножения было введено понятие «эмбриоидогения» [1]. Ею при выделении эмбриоидогении в особый тип репродукции и размножения были использованы два критерия: онтогенетический и морфологический. Кроме того, в зависимости от происхождения и положения соматических зародышей на материнском растении были выделены две основные формы «эмбриоидогении»: репродуктивная или флоральная (образование проэмбрио в цветке и семени) и вегетативная (формирование адвентивных зародышей на листьях, побегах и корнях).

В настоящее время известно, что соматические зародыши образуются у растений, относящихся к разным таксонам и произрастающих в разных экологических зонах. За последние десятилетия у ряда древесных растений, таких как *Acacia koa* Gray, *Aesculus hippocastanum* L., *Albizia richardiana* King., *Camellia japonica* L., *Camellia sinensis* L., *Castanea sativa* Mill., *Citrus* sp., *Cocos nucifera* L., *Coffea arabica*, *Eucalyptus* sp., *Feijoa sellowiana* Berg., *Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Agr., *Juglans cinerea* L., *Juglans regia* L., *Liriodendron tulipifera* L., *Pistacia vera* L., *Prunus subhirtella* Miq., *Robinia pseudoacacia* L., *Theobroma cacao*, *Zizyphus jujuba* Mill. разработаны способы регенерации растений *in vitro* через соматический эмбриогенез.

Развитие соматических зародышей очень пластично и подвержено влиянию таких факторов, как генотип растения-донора и его физиологическое состояние, тип исходного экспланта, степень его целостности и время отбора. Различные культуры и генотипы исследуемых видов имеют очень широкий спектр морфогенетических реакций по отношению к условиям культивирования. Основными индукторами дифференциации соматических эмбриоидов и дальнейшей регенерации растений из них являются специфически необходимые регуляторы роста растений, осмотрики, консистенция и pH среды, интенсивность освещения, фотопериод, температура и влажность [9, 17, 19, 21, 27].

Объекты и методы исследования

Несмотря на многосторонние биотехнологические исследования, проведенные на многолетних культурах, главным образом соматические эмбриоиды были получены из

незрелых зиготических зародышей и инициация образования эмбриогенных культур из неэмбриогенных тканей еще не разработана у многих экономически важных растений. До сих пор практически не изучены вопросы индукции и прохождения этапов соматического эмбриогенеза, не определены подходы к выбору эффективных индукторов включения разных путей морфогенеза и недостаточно исследованы механизмы, ответственные за эффективную регенерацию у отдельных декоративных, субтропических и плодовых культур. Отсутствие достаточных знаний об этом также во многом сдерживает и появление новых эффективных биотехнологий, направленных на развитие систем получения, размножения и сохранения важных садовых растений.

Коллекционный генофонд Никитского ботанического сада – Национального научного центра включает в себя разнообразные виды и сорта декоративных, субтропических и косточковых плодовых, эфиромасличных растений, имеющие как эстетическое, так и народнохозяйственное значение. Вместе с тем, возникающие трудности при традиционном размножении, в процессе селекции и сохранения многолетних садовых культур, заставляют ученых обращаться к современным методам биотехнологии растений.

Поэтому целью наших исследований было выявление особенностей соматического эмбриогенеза и органогенеза в условиях *in vitro*, позволяющее не только пополнить знания о морфогенезе растений в целом, но и разработать биотехнологическую методологию получения и сохранения ценных видов и сортов декоративных, субтропических и косточковых плодовых культур.

Результаты и обсуждение

Клематис. При разработке системы прямого и непрямого соматического эмбриогенеза клематиса было выявлено, что инициация развития экспланта (вегетативной почки) зависела от сроков отбора растительного материала. Так, 90-100% вегетативных почек образовывали микропобеги и соматические зародыши в период с февраля по апрель [12].

Проведено изучение компонентного состава индукционной питательной среды как фактора, не только выявляющего, но и поддерживающего качественные характеристики морфогенетических событий, происходящих в развивающихся вегетативных почках клематиса в процессе культивирования *in vitro*. Для эксплантов клематиса экспериментально подобрана солевая основа среды МС и определена необходимость присутствия в ней для индукции процесса непрямого соматического эмбриогенеза зеатина в концентрации 1,8 мкМ [14, 23, 26]. Установлено, что в течение 30 суток культивирования каллуса отмечали появление эмбриогенных зон, меристематических бугорков и эмбриоидов. Гистологический анализ показал, что в эмбриогенной массе имеются как эмбриогенные, так и неэмбриогенные клетки. Выявлено, что на 3 сутки культивирования активизировались процессы митотической и меристематической активности в эмбриогенной массе клеток. Проэмбрио начинал формироваться в результате асимметричных делений, чаще всего непосредственно внутри каллуса (рис. 1 а). Соматические зародыши появлялись на поверхности каллуса только на 35-40 сутки культивирования (рис. 1 б). В условиях *in vitro* отмечали образование глобулярных, сердечковидных и торпедовидных эмбриоидов клематиса подобно развитию зиготических зародышей. Из выявленных 7 морфологических типов соматических зародышей только 4 обладали регенерационным потенциалом: 1 – односемядольный, 2 – двусемядольный, 3 – полисемядольный, 4 – трубоподобный.

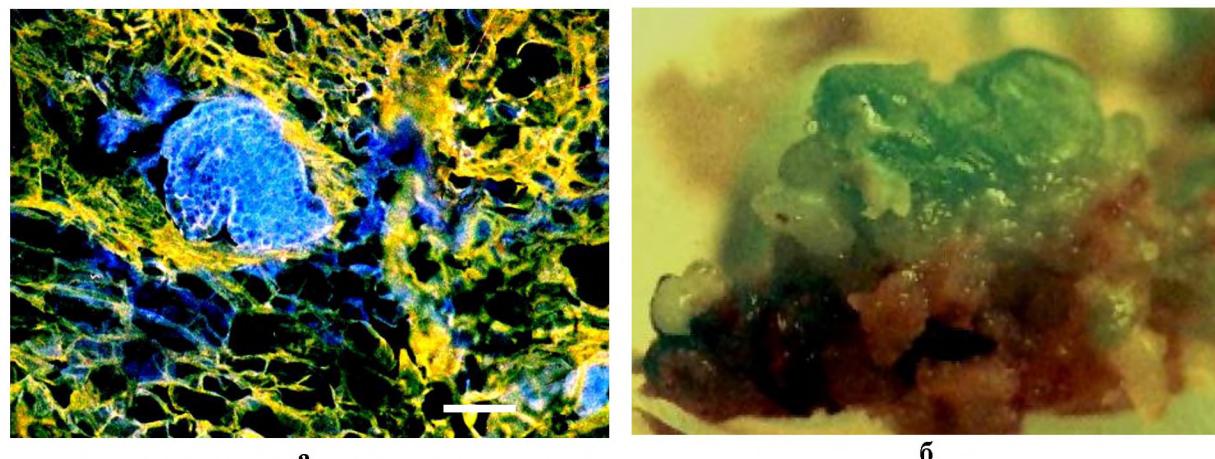


Рис. 1. Формирование соматических зародышей в каллусе клематиса (а) и последующее образование эмбриоидов на поверхности каллуса (б) сорта Серенада Крыма

Прорастание соматических зародышей происходило в течение 30-40 суток культивирования.

Использование в качестве эффекторов соматического эмбриогенеза физических факторов позволило установить оптимальные значения температуры (26°C) и интенсивности освещения ($40 \text{ мкМ} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), при которых количество развивающихся эмбриоидов достигало 25-30 штук на экспланте.

Наряду с этим изучены особенности образования микропобегов из каллуса клематиса. Показано, что каллус листового происхождения диаметром 7-10 мм является компетентным эксплантом, способным формировать максимальное количество адвентивных почек на питательной среде МС, содержащей 2,3 мкМ зеатина (рис. 2).

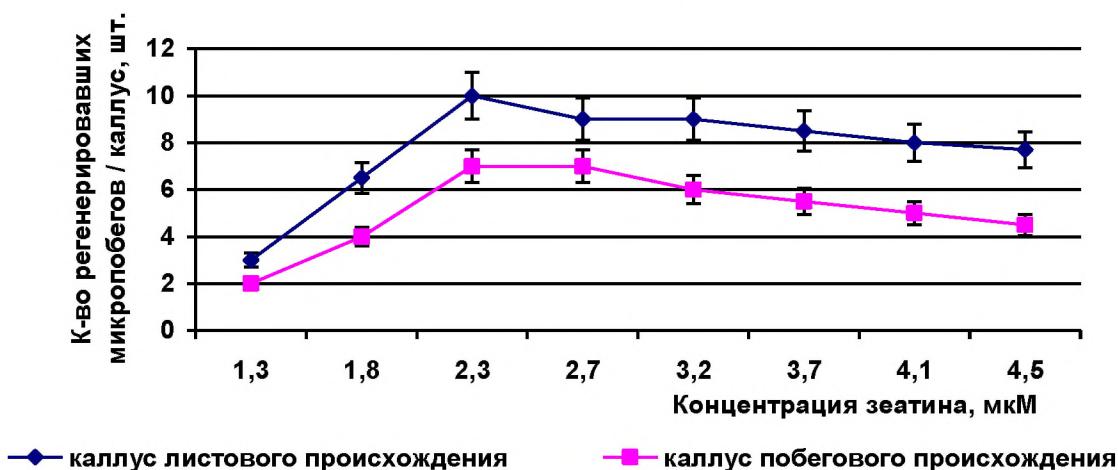


Рис. 2. Зависимость регенерации микропобегов клематиса из каллуса разного происхождения от концентрации зеатина в питательной среде

Проведен молекулярно-генетический анализ донорного растения и сомаклонов клематиса сорта Серенада Крыма, полученных путем органогенеза и соматического эмбриогенеза. Установлены особенности изменчивости генома при различных способах регенерации *in vitro*. С помощью ISSR-праймеров обнаружено 105 ампликонов, из которых полиморфными оказались шесть. Средний показатель гетерогенности растений клематиса составил 5,7% [11]. Наиболее генетически дифференцированным от остальных оказался контроль (материнское растение, не вошедшее не в один из двух

клластеров). Вместе с тем все растения, полученные из соматических зародышей и доведенные до цветения, не отличались по фенотипу от исходного. Таким образом, результаты анализа еще раз показали, что для получения точной генетической картины необходим тщательный подбор или синтез видоспецифичных праймеров.

На основе сравнительного изучения морфогенетических потенций вегетативных почек 8 сортов клематиса (Серенада Крыма, Юность, Невеста, Crimson Star, Космическая Мелодия, Вечный Зов, Ай-Нор, Лесная Опера) разработана система прямого соматического эмбриогенеза. Установлена зависимость формирования соматических зародышей от генотипа и концентрации БАП в питательной среде МС. Вместе с тем система прямого соматического эмбриогенеза работала эффективней за счет индукции вторичного эмбриогенеза (рис. 3). Отмечено, что как в случае первичного, так и вторичного эмбриогенеза более высоким эмбриогенным потенциалом обладали почки сортов клематиса, относящихся к группам Ланугиноза и Жакмана.

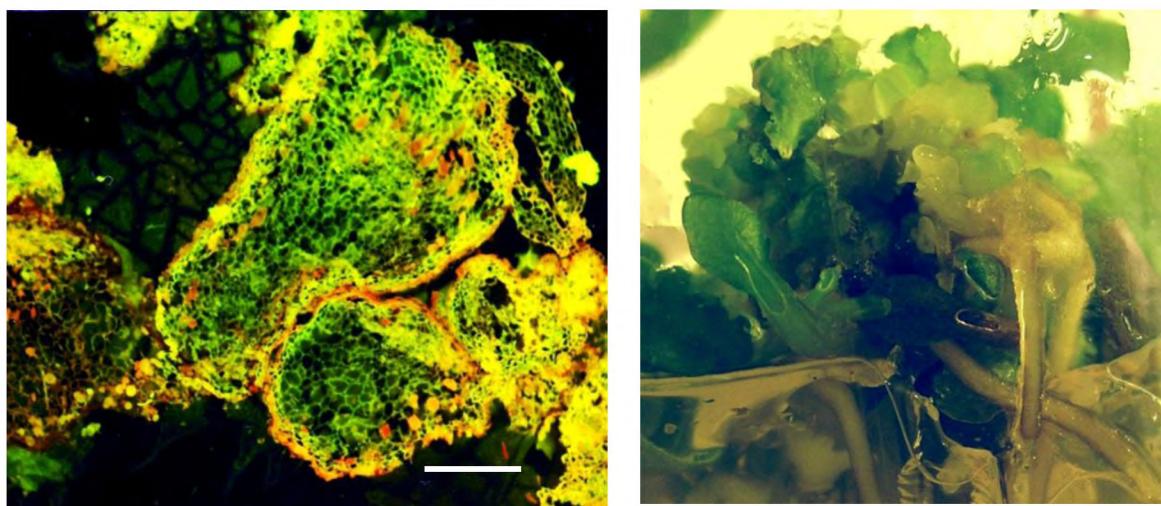


Рис. 3. Образование вторичных эмбриоидов на поверхности первичных соматических зародышей клематиса сорта Юность

В процессе исследований впервые было выявлено, что существовала зона активизации образования соматических зародышей клематиса, то есть существовали эмбриоид или группа эмбриоидов, которые были способны индуцировать соматический эмбриогенез как первичный, так и вторичный. Этот эксплант был назван «индуктором». Воздействие «индуктора» на соматический эмбриогенез проявлялось в активном образовании дополнительных зародышей на эксплантах, помещенных на питательную среду и это отмечали у всех сортов клематиса, за исключением сорта Космическая Мелодия. Наша гипотеза относительно воздействия «индуктора» на соседние экспланты клематиса через питательную среду, в которую выделялись индуцирующие вещества (метаболиты, гормоны и др.), не подтвердилась. Наряду с этим было установлено, что «индуктор» мог работать достаточно продолжительный отрезок времени (до 2-3 лет). Положительной стороной приостановления процесса соматического эмбриогенеза за счет удаления «индуктора» была возможность разделения соматических зародышей на отдельные фракции, сгруппировав их по размеру и стадии развития.

На основании проведенных исследований определены основные факторы, работающие в биотехнологической системе прямого соматического эмбриогенеза клематиса: концентрация экзогенного цитокинина БАП, температура, интенсивность освещения, «индуктор» соматического эмбриогенеза и генотип. При этом доля влияния «индуктора» в среднем составила 50%.

Таким образом, нами впервые разработаны способы непрямого и прямого соматического эмбриогенеза клематиса и предложена биотехнологическая система размножения растений *in vitro* (рис. 4).

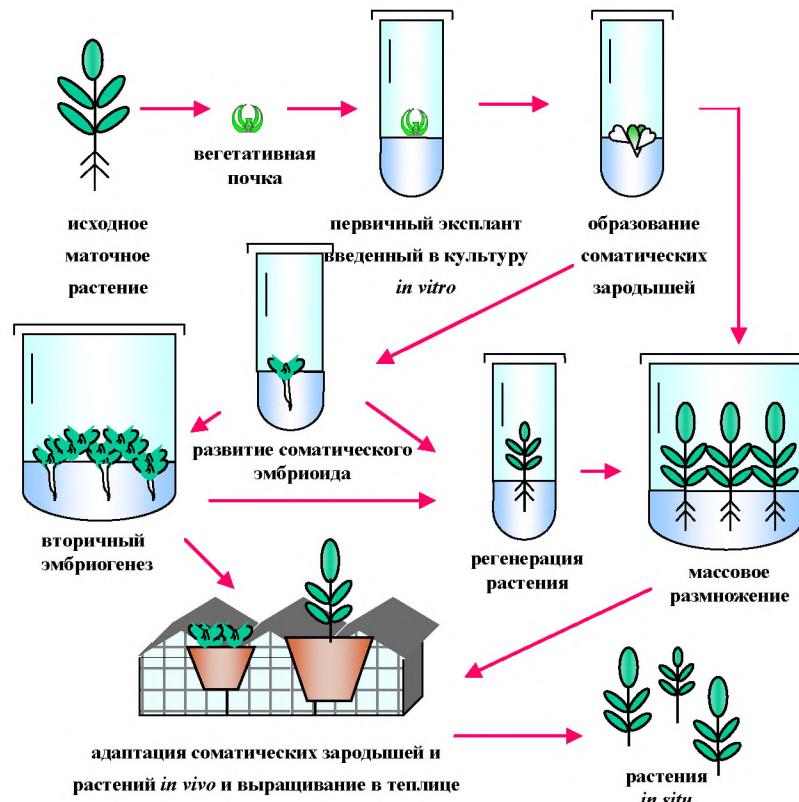


Рис. 4. Биотехнологическая схема получения растений клематиса через прямой соматический эмбриогенез

Все полученные в условиях *in vitro* растения клематиса адаптированы *in vivo* и высажены *in situ*.

В отличие от клематиса, у каладиума и фикуса лировидного именно лист оказался компетентным эксплантом, способным к образованию как соматических зародышей, так и микропобегов.

Каладиум. В процессе исследования был модифицирован состав питательной среды МС (C1) и подобраны оптимальные концентрации цитокинина для индукции морфогенетических процессов в тканях листа двух сортов каладиума, приводящих к соматическому эмбриогенезу. Наряду с этим удалось определить наиболее морфогенные зоны, способные к прямому и непрямому соматическому эмбриогенезу. Такими оказались зона соединения листовой пластинки с черешком и край высечки листа. Период развития от введения первичных эксплантов каладиума в культуру до появления глобуллярных структур по краю высечки листа без этапа каллусообразования составил 30 суток.

Пути реализации морфогенетического потенциала эксплантов каладиума зависели от условий культивирования. В отсутствии освещения формировались только соматические зародыши. На свету происходило три морфогенетических процесса: органогенез в морфогенном каллусе, непрямой и прямой соматический эмбриогенез. В зоне соединения листовой пластинки с черешком эмбриогенные структуры появлялись непосредственно в эпидермальной и субэпидермальной зоне высечки листа. В течение последующих 30 суток наблюдали развитие полноценных соматических зародышей. Последующие пассажи соматических зародышей на питательную среду С1

индуцировали вторичный эмбриогенез. Весь процесс от введения эксплантов до регенерации растений составил 3 месяца (рис. 5 а, б). Присутствие в среде 2,22 мкМ БАП и 2,69 мкМ НУК индуцировало образование максимального количества микропобегов и эмбриоидов через непрямой соматический эмбриогенез и прямую регенерацию микропобегов из высечек листа каладиума [15].

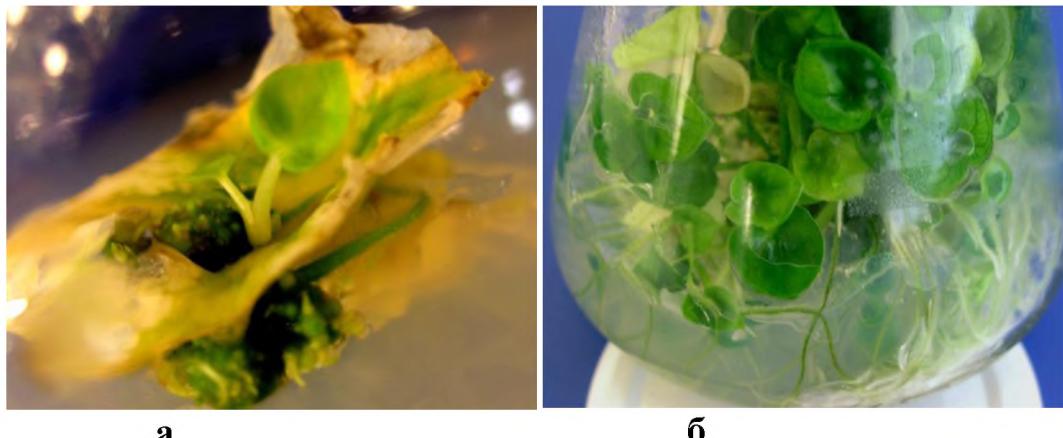


Рис. 5. Развитие соматических зародышей каладиума (а) и их прорастание (б) на питательной среде С1

В результате непрямой регенерации микропобегов и непрямого соматического эмбриогенеза у сорта Pink Gem были получены новые формы с различными соматическими мутациями. У выделенных растений соматические мутации проявлялись в виде различных форм листовой пластинки, ее окраски и жилкования (рис. 6).

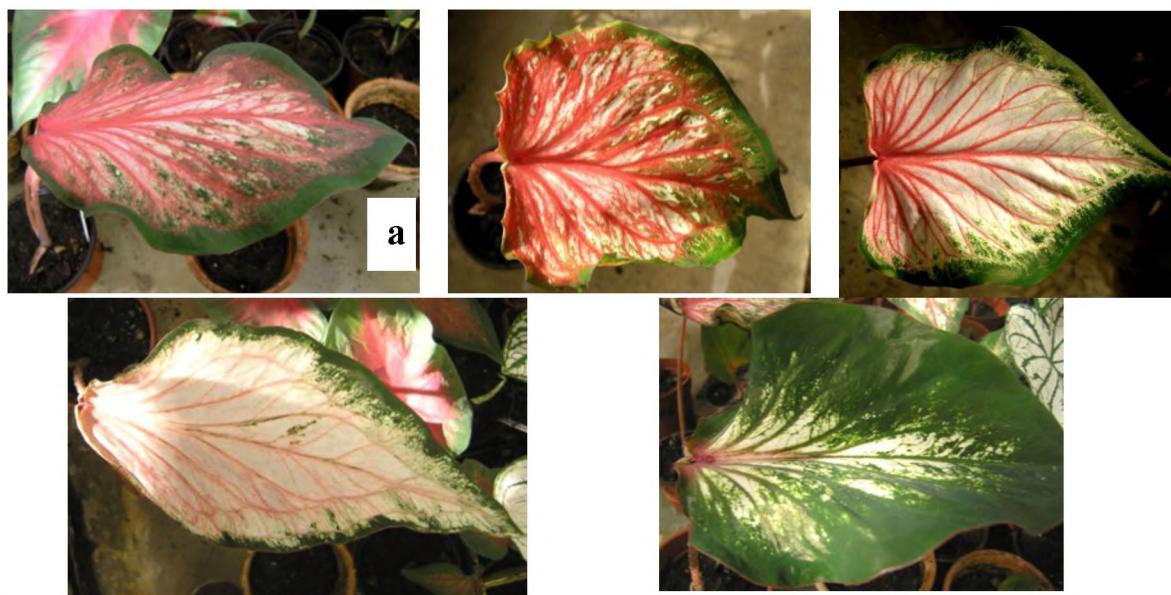


Рис. 6. Новые формы каладиума сорта Pink Gem, полученные в результате непрямой регенерации микропобегов и непрямого соматического эмбриогенеза: а) исходный сорт; справа и внизу – формы, отличающиеся по форме и окраске листовой пластинки

Фикус лировидный. Эффективность индукции соматического эмбриогенеза фикуса лировидного зависела от концентрации 6-бензиламинопурина (БАП) в питательной среде QL [28]. Изучение регенерационной способности зон листа фикуса лировидного показало, что все они имели высокий морфогенетический потенциал, который

реализовался через соматический эмбриогенез и прямую регенерацию микропобегов. Отмечено, что край листовой пластиинки оказался наиболее компетентным к образованию соматических эмбриоидов. В зоне вдоль основной жилки и у черешка чаше всего индуцировали процесс прямой регенерации микропобегов. Соматические зародыши проходили все стадии развития и были уже четко видны на 30 сутки культивирования (рис. 7).

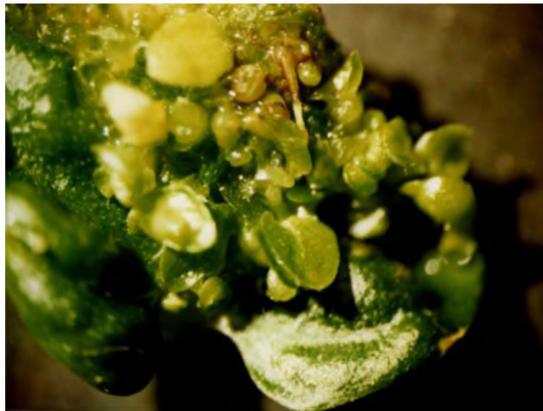


Рис. 7. Образование соматических зародышей по краю листовой пластиинки фикуса лировидного на среде КЛ с 0,89 мкМ БАП и 0,05 мкМ НУК

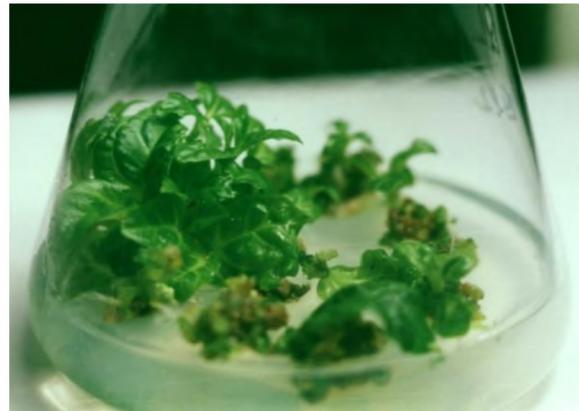


Рис. 8. Прямая регенерация микропобегов фикуса лировидного на среде КЛ с 1,78 мкМ БАП и 0,05 мкМ НУК

Как и в случае с культурами клематиса и каладиума, вторичный соматический эмбриогенез фикуса лировидного происходил на индукционной питательной среде. Увеличение количества субкультивирований значительно повышало частоту вторичного соматического эмбриогенеза. Непрерывный процесс соматического эмбриогенеза фикуса лировидного происходил в течение 2 лет, при этом частота эмбриогенеза оставалась на одном уровне и достигала 95-100%. Полноценные растенчица из эмбриоидов фикуса формировались на 40-60 сутки от начала индукции формирования соматических зародышей.

Повышение концентрации БАП до 1,78 мкМ индуцировало процесс прямой регенерации адвентивных микропобегов из листовых эксплантов фикуса лировидного (рис. 8). Максимальное количество корней ($5,8 \pm 0,1$ штук на микропобег) образовалось на $\frac{1}{4}$ нормы среды МС, дополненной 0,98 мкМ ИМК [13].

Изучены условия адаптации *in vivo* укорененных микропобегов и проростков каладиума и фикуса лировидного.

На представленной биотехнологической схеме показано получение растений фикуса через соматический эмбриогенез и органогенез (рис. 9). Разработанные биотехнологические системы размножения растений дают возможность получать до 40.000000 регенерантов каладиума и 4.000000 регенерантов фикуса лировидного в год.

Субтропические плодовые культуры. Другая биотехнологическая система создавалась на основе сравнительного изучения прямой регенерации растений из зиготических зародышей и листовых эксплантов зизифуса, киви, фейхоа и хурмы и была направлена на разработку реципиентной системы этих культур в условиях *in vitro*.

На этапе введения первичных эксплантов в условия *in vitro* было выявлено, что способность изолированных почек фейхоа, киви, хурмы и зизифуса регенерировать микропобеги зависела от генотипа и концентрации цитокининов в питательной среде [24].



Рис. 9. Биотехнологическая схема микроразмножения фикуса лировидного (температура $24\pm1^{\circ}\text{C}$, интенсивность освещения $40 \text{ мкМ} \text{ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, 16-часовой фотопериод)

Наряду с этим в процессе исследований установлены оптимальные сроки предобработки зиготических зародышей зизифуса, киви, фейхоа и хурмы, введенных в культуру *in vitro*. Проведенное сравнительное изучение компетентности зиготических зародышей 4 субтропических культур к прорастанию под воздействием низких положительных температур показало, что частота прорастания зародышей достигала 100% при предобработке фейхоа и киви в течение 15 суток. Однако для развития зародышей хурмы и зизифуса продолжительность предобработки увеличивали до 30 суток.

При изучении морфогенетических потенций семядолей, листьев и сегментов микропобегов киви, зизифуса, фейхоа и хурмы было установлено, что регенерационный потенциал зависел от генотипа, типа экспланта и концентрации ТДЗ. В дальнейшем, индуцируя процесс ризогенеза микропобегов зизифуса, киви, фейхоа и хурмы, их помещали на питательные среды с половинным набором макро- и микросолей по МС, дополненные ИМК и НУК (рис. 10). Активный ризогенез у всех субтропических культур удалось индуцировать только после 7-8 пассажей. Полноценные растения киви, фейхоа, зизифуса и хурмы для последующей высадки на адаптацию были получены через 2, 3, 4 и 5 месяцев культивирования, соответственно.

На рис. 11 представлена биотехнологическая система получения растений киви, зизифуса, фейхоа и хурмы через прямую регенерацию микропобегов из вегетативных почек, семядолей и листьев, прямой соматический эмбриогенез из семядолей, органогенез и непрямой соматический эмбриогенез в морфогенном каллусе. По результатам исследований получен патент Украины на способ прямой регенерации микропобегов *Actinidia deliciosa* (Chev.) Liang, Fergusson в культуре *in vitro*.

Генобанк *in vitro*. Наряду с изучением особенностей соматического эмбриогенеза, органогенеза и разработкой реципиентных систем декоративных и субтропических плодовых культур, одним из важных направлений в биотехнологии растений является сохранение растительных объектов в условиях *in vitro*, которое позволяет создать резервный банк генетической плазмы ценных, редких, исчезающих, новых видов и сортов.

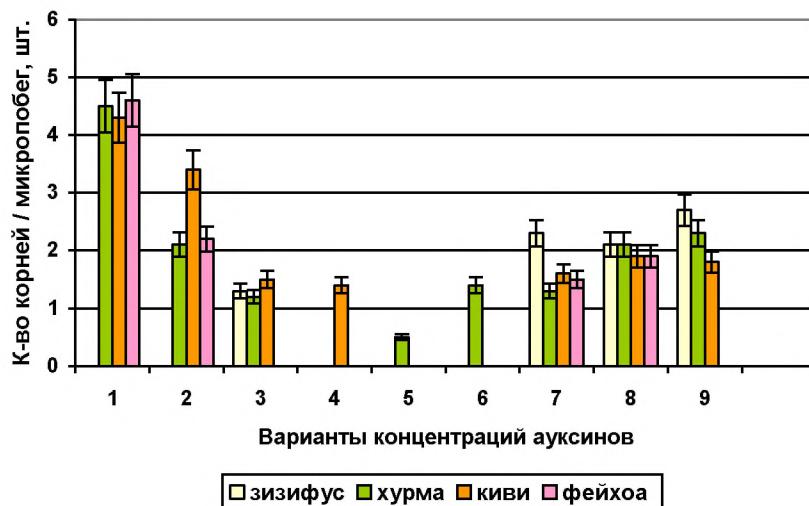


Рис. 10. Влияние концентраций и комбинаций ИМК и НУК в питательной среде $\frac{1}{2}$ МС на образование корней в основании микропобегов зизифуса, киви, фейхоа и хурмы:
1 – 0,98 мКМ ИМК; 2 – 1,97 мКМ ИМК; 3 – 4,90 мКМ ИМК; 4 – 1,07 мКМ НУК; 5 – 2,15 мКМ НУК; 6 – 5,37 мКМ НУК; 7 – 4,90 мКМ ИМК + 1,07 мКМ НУК; 8 – 4,90 мКМ ИМК + 2,15 мКМ НУК; 9 – 4,90 мКМ ИМК + 5,37 мКМ НУК (после 7-8 субкультивирований)

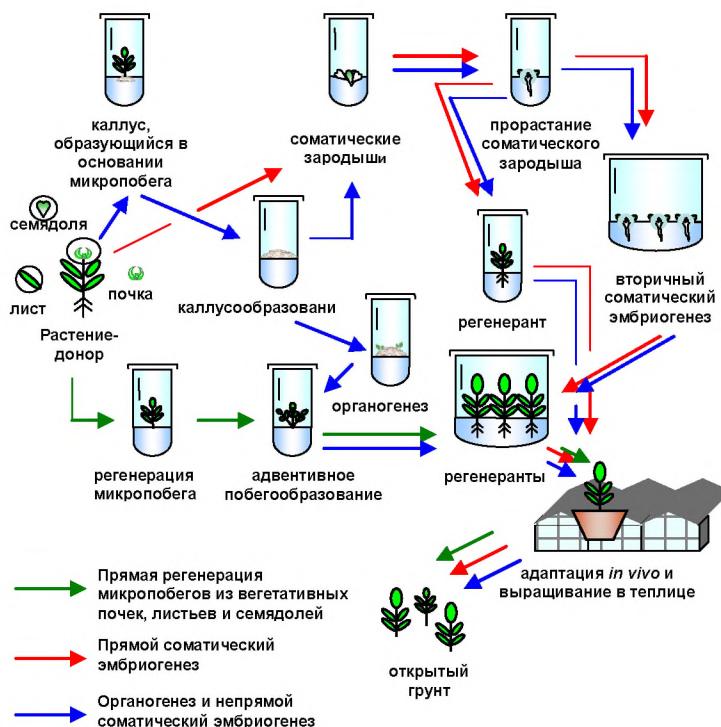


Рис. 11. Биотехнологическая схема размножения и получения растений субтропических плодовых культур

Впервые определены оптимальные экспланты декоративных, субтропических и косточковых плодовых культур для депонирования в условиях *in vitro* на основе ростового индекса, частоты регенерации и органогенетического индекса [25].

Предварительные результаты наших исследований по депонированию *in vitro* ряда садовых культур показали, что воздействие только двух факторов – низкой положительной температуры и интенсивности освещения, позволяет сохранять отдельные экспланты до 3 лет, однако их дальнейшая регенерация не была столь активна и большая часть эксплантов погибала при переводе в стандартные условия

культивирования. Поэтому было изучено влияние каждого из эффекторов и сопоставлены полученные оптимальные показатели, что позволило выработать правильную стратегию в сохранении *in vitro* эксплантов роз, клематиса, юкки, орхидей, фейхоа, киви, алычи, сливы и абрикоса. На питательных средах, содержащих 90 г/л сахарозы, жизнеспособность эксплантов роз, орхидей, клематиса, юкки, фейхоа и киви достигала 50-90%. Среди исследуемых культур высокой жизнеспособностью обладали протокормы цимбидиума и соматические зародыши клематиса. Наряду с этим при добавлении в среды 90 г/л сахарозы кинетика роста эксплантов снижалась в 2-3 раза по сравнению с контролем в зависимости от вида и сорта растения. Снижение кинетики роста уменьшало количество пассажей и способствовало увеличению периода депонирования эксплантов.

Как показали дальнейшие исследования по разработке способа длительного сохранения растительных объектов в условиях *in vitro*, введение в питательную среду ретарданта – хлор холин хлорида (ССС) значительно повышало жизнеспособность эксплантов по сравнению с контролем. Проведенный скрининг исследуемых культур, подвергшихся воздействию низких положительных температур и ретарданта ССС в течение 12 месяцев, позволил выделить наиболее жизнеспособные культуры. Установлено, что при концентрации ССС 0,2-0,4 г/л количество жизнеспособных эксплантов у таких растений, как роза, клематис, орхидеи, юкка, алыча, слива, абрикос достигало 100%. Наряду с ингибированием роста эксплантов, ССС индуцировал рост корней у таких культур, как роза, клематис, юкка, фейхоа и слива. Частота укоренения микропобегов клематиса у таких сортов, как Серенада Крыма и Юность через 24 месяца депонирования достигала 100% (рис. 12 а).



а



б

Рис. 12. Экспланты клематиса сорта Серенада Крыма на средах с ССС (а) и микропобеги розы садовой, киви и сливы в генобанке *in vitro* (б)



Рис. 13. Биотехнологический процесс депонирования ценных видов и сортов декоративных, косточковых плодовых и субтропических плодовых культур

Совместное использование оптимальных концентраций ССС и сахарозы, показателей интенсивности освещения и температуры значительно увеличило как период сохранения в беспересадочной культуре, так и жизнеспособность эксплантов исследуемых культур (рис. 12 б). Это позволило впервые разработать способ минимизации роста декоративных, субтропических и косточковых плодовых культур в условиях *in vitro* и создать генобанк ценной растительной плазмы. Данная биотехнологическая система сохранения растений, состоящая из нескольких этапов, представлена на рис. 13.

Выводы

На основании комплексного изучения процессов соматического эмбриогенеза и органогенеза предложена биотехнологическая схема получения и сохранения ценных видов и сортов декоративных, субтропических, косточковых плодовых и эфиромасличных растений (рис. 14). Представленная на рисунке схема состоит из нескольких системных блоков, в которых удалось раскрыть регенерационный потенциал изученных культур и продемонстрировать основные факторы (индуктор, генотип, тип экспланта и его происхождение, питательная среда, фитогормоны и их концентрации, интенсивность освещения и температура), показать степень их влияния на процессы соматического эмбриогенеза и органогенеза и отразить конечный продукт – биотехнологические системы размножения, реципиентные системы и системы сохранения многолетних растений в условиях *in vitro*.

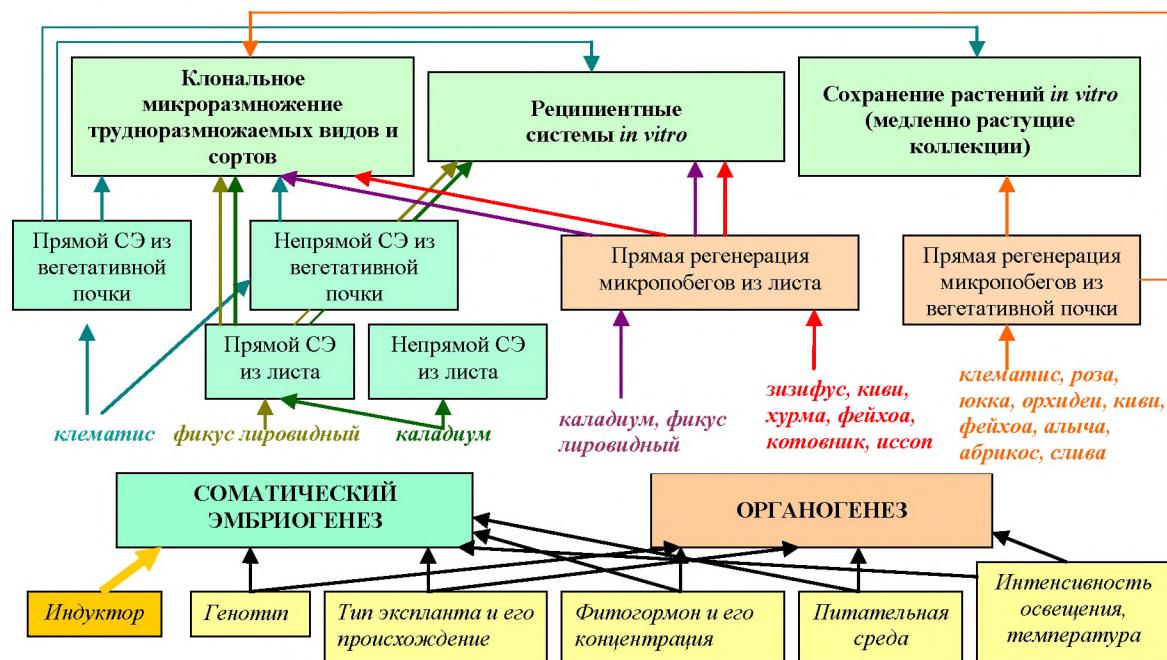


Рис. 14. Биотехнологическая схема получения и сохранения ценных видов и сортов декоративных, субтропических, косточковых плодовых и эфиромасличных растений (СЭ – соматический эмбриогенез)

Список литературы

- Батыгина Т.Б., Васильева В.Е. Размножение растений: Учебник. – СПб.: Изд-во С.-Петербург. ун-та, 2002. – 232 с.
- Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964. – 272 с.
- Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: Учебное пособие. – М.: ФГК-ПРЕСС, 1999. – 160 с.

4. Здрийковская-Рихтер А.И. Эмбриокультура изолированных зародышей, генеративных структур и получение новых форм растений. – Симферополь: Крым-Фарм-Трейдинг, 2003. – 368 с.
5. Ігнатова С.О. Реалізація totipotentності мікроспор в культурі *in vitro* та її використання в селекційно-генетичних експериментах // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть. – К.: Логос, 2001. – С. 562-572.
6. Кунах В.А. Геномная изменчивость соматических клеток растений. 2. Изменчивость в природе // Биополимеры и клетка. – 1995. – Т. 11, № 6. – С. 5-40.
7. Кунах В.А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіологічно-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с.
8. Мельничук М.Д., Новак Т.В., Кунах В.А. Біотехнологія рослин: Підручник. – К.: ПоліграфКонсалтинг, 2003. – 250 с.
9. Митрофанова И.В. Микроклональное размножение субтропических и тропических плодовых культур (обзор литературы) // Труды Никит. ботан. сада. – 1997. – Т. 119. – С. 63-95.
10. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Пандей Д.К. Соматический эмбриогенез и регенерация растений *Zizyphus jujuba* Mill. *in vitro* // Физиология растений. – 1997. – Т. 44, № 1. – С. 108-114.
11. Митрофанова И.В., Галаев А.В., Сиволап Ю.М. Исследование молекулярно-генетической гетерогенности растений клематиса (*Clematis* L.), полученных путем органогенеза и соматического эмбриогенеза *in vitro* // Цитология и генетика. – 2003. – № 6. – С. 12-16.
12. Митрофанова И.В., Зубкова Н.В., Соколова М.К. Сравнительное изучение особенностей прямого соматического эмбриогенеза 8 сортов клематиса (*Clematis* sp.) // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 128. – С. 12-24.
13. Митрофанова И.В., Митрофанова О.В., Челомбит С.В. Соматический эмбриогенез и органогенез фикуса лировидного (*Ficus lyrata* Warb.) в условиях *in vitro* как основа биотехнологической системы микроразмножения // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: Сб. науч. тр. III Междунар. науч. конф., 14-16 мая 2008 г., Минск. – Минск: Издательский центр БГУ, 2008. – С. 291-295.
14. Митрофанова И.В., Соколов О.И., Ежов В.Н. Непрямой соматический эмбриогенез клематиса (*Clematis* sp.) // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 9-20.
15. Биотехнологическая система получения растений каладиума (*Caladium hortulanum* Birdsley.) через соматический эмбриогенез и органогенез / Митрофанова И.В., Соколова М.К., Митрофанова О.В., Иванова Н.Н., Челомбит С.В. // Труды Никит. ботан. сада. – 2007. – Т. 127. – С. 50-60.
16. Deverno L.L. An evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis // Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Vol. 1. / Eds. S.M. Jain, P.K. Gupta, R.J. Newton. – Netherlands, Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. – P. 361-377.
17. Dodeman V.L., Ducreux G., Kreis M. Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis // J. Exp. Bot. – 1997. – Vol. 48, N 313. – P. 1493-1509.
18. Engels J.M.M., Visser L. A guide to effective management of germplasm collections: IPGRI Handbooks for Genebanks. – Rome, Italy: IPGRI, 2003. – N 6. – 174 p.
19. Gray D.J. Nonzygotic embryogenesis // Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises / Eds. R.H. Trigiano, D.J. Gray. – Tokyo: CRC Press, 1996. – P. 133-147.
20. Jain S.M., Ishii K. Microppropagation of Woody Trees and Fruits. – Netherlands: Dordrecht: Kluwer Acad. Publishers, 2003. – 852 p.
21. Litz R.E. Somatic embryogenesis in tropical fruit trees // Tissue Culture in Forestry and Agriculture / Eds. R.R. Henke, K.W. Hughes, M.P. Constantin, A. Hollaender. – New York:

- Plenum Press, 1985. – P. 179-193.
22. 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.
23. Mitrofanova I., Mitrofanova O. Special features of somatic embryogenesis and plant regeneration of *Clematis* *in vitro* // Propagation of Ornamental Plants - IPPS / Eds. Iv. Iliev, P. Zelev, I. Tzvetkov. – Sofia: SEEK & SHARE: Balkanpress. – 2000. – P. 70-75.
24. Mitrofanova I.V., Mitrofanova O.V. Development of recipient system of woody subtropical plants *in vitro* // Acta Universitatis Latveiensis. Biology. – 2004. – Vol. 676. – P. 189-196.
25. Gene-pool collection in Nikitsky Botanical Gardens – National Scientific Center / Mitrofanova I.V., Movchan O.P., Shishkin V.A., Mitrofanov V.I. // Bull. State Nikitsky Bot. Gardens. – 2002. – N 85. – P. 30-33.
26. Mitrofanova I.V., Yezhov V.N. Plant regeneration of *Clematis* L. through somatic embryogenesis *in vitro* // Bull. State Nikitsky Bot. Gardens. – 2002. – N 86. – P. 16-19.
27. Nomura K., Komamine A.I. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis // *In vitro* Embryogenesis in Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture / Ed. T.A. Thorpe. – Vol. 20. – Dordrecht: Boston: London: Kluwer Academic Publishers, 1995. – P. 417-470.
28. Quoirin M., Lepoivre P. Etude de milieux adaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus* // Acta Hort. – 1977. – N 78. – P. 437-442.
29. Reinert J. Morphogenese und ihre Kontrolle and Gewenbekulturen aus Carotten // Naturwissenschaften. – 1958. – Bd. 45. – S. 344-345.
30. Sharp W.R., Sondahl M.R., Caldas L.S., Marraffa S.B. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis // Hort. Rev. – 1980. – Vol. 2. – P. 268-310.
31. Steward F.C. Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell to carrot plant // Amer. J. Bot. – 1958. – Vol. 45. – P. 709-713.
32. Thorpe T.A., Harry I.S. Application of tissue culture to horticulture // Acta Hort. – 1997. – N 447. – P. 39-49.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ БАНКИ РАСТЕНИЙ В БОТАНИЧЕСКИХ САДАХ РОССИИ

О.И. МОЛКАНОВА, кандидат сельскохозяйственных наук
 Учреждение Российской академии наук Главный ботанический сад
 им. Н.В. Цицина РАН, Москва, Россия

Введение

Основной задачей ботанических садов в сохранении биологического разнообразия является комплексное изучение и сохранение генетических ресурсов природной флоры путем пополнения и поддержания коллекций живых растений, а также разработка оптимальных режимов долговременного хранения семян и меристем, обеспечивающих их жизнеспособность и стабильность. Особый интерес представляет изучение возможностей сохранения в генетических банках видов, естественное возобновление которых в природе ослаблено или затруднено. Для таких видов от устойчивости воспроизведения *ex situ* зависит сохранность их генофонда в целом [1, 3].

Эффективность сохранения генофонда растений *ex situ* может быть резко повышена путем создания генетических банков. По классификации Международного центра генетических ресурсов различают следующие их виды: 1) генетические банки семян; 2) банки растительного материала, сохраняемого *in vitro* (культуры меристем,