

АНДРОГЕНЕЗ *IN VITRO* ЗЕМЛЯНИКИ

**Е.С. Туровцева, Мичуринский государственный педагогический институт,
О.Я. Олейникова, Всероссийский НИИ генетики и селекции
плодовых растений им. И.В. Мичурина**

В настоящее время весьма актуальным является создание нового, ценного для селекции исходного материала, совмещающего высокую продуктивность, устойчивость к болезням и вредителям, генетическую стабильность. Большую помощь в успешном решении этой задачи могут оказать широко используемые в современных исследованиях биотехнологические методы, к которым относится культивирование *in vitro* пыльников, содержащих микроспоры на определенной стадии развития (метод андрогенеза). Основной интерес к культуре пыльников связан с тем, что это эффективный и быстрый способ получения гаплоидных и гомозиготных растений и линий. Использование таких растений в селекции позволяет сократить срок создания сорта на 3–4 самоопыленных поколения [2].

Метод культуры пыльников детально разработан для получения гаплоидных сельскохозяйственных растений, в основном однолетних и двулетних [1, 5, 6]. Однако для ягодных культур, таких как земляника, андрогенез *in vitro* пока широко не применяется, поскольку технологии массового получения гаплоидных и гомозиготных растений на его основе не разработаны. Это обусловлено большой трудностью индукции у них как первичных андрогенных образований (каллусов, эмбриоидов), так и морфогенетических регенерационных процессов, отличающихся к тому же нестабильностью и трудной воспроизводимостью. В то же время, несмотря на указанные трудности, имеются определенные успехи по культивированию пыльников различных сортов земляники.

Для отдельных сортов были разработаны условия получения с различной частотой (не всегда высокой), каллусов и растений-регенерантов [3, 7]. Китайские исследователи среди каллусов, полученных из пыльников земляники, выделили наиболее ценный — эмбриогенный тип, и на определенных средах ими были индуцированы эмбриоиды [8]. Однако разработанные на этих сортах условия получения гаплоидов часто оказываются неэффективными для других сортов, поэтому требуются дополнительные исследования в этом направлении.

Цель нашей работы — изучение возможностей индукции процессов андрогенеза *in vitro* у ряда селекционно и хозяйственно ценных генотипов земляники для создания нового исходного материала на основе гаплоидии.

Исследования проводили в 2005–2009 гг. Материалом для эксперимента послужили пыльники земляники садовой (*Fragaria ananassa* Duch.) сортов Золушка, Редгонтлит, Фестивальная ромашка, Кама, Десертная, Львовская ранняя, а также Фейерверк, Урожайная ЦГЛ, Привлекательная селекции ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина.

При культивировании пыльников использовали методику, разработанную во ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина [4]. Пробирки с пыльниками выдерживали в темноте при температуре +25...+27°C и относительной влажности воздуха 60–70%. После каллусообразования их переносили в условия 16-час. фотопериода с интенсивностью освещения 1000–1500 лк. В дальнейшем полученные каллусы пассировали на среды для морфогенеза, минеральной основой которых служила среда Мурасиге-Скуга (МС), дополненная различными фитогормонами. В культуре пыльников земляники изучали разные комбинации цитокининов (6-бензиламинопурина — БАП, кинетина, зеатина), ауксинов (индолилуксусной — ИУК, 2,4-дихлорфеноксиук-

сусной — 2,4-Д, нафтилуксусной — НУК, индолилмасляной — ИМК и гибберелловой — ГБ кислот).

Для культивирования пыльников земляники указанных сортов использовали 8 вариантов питательных сред, содержащих минеральные соли по МС (мг/л): З₁ — БАП (2,0), НУК (0,5); З₂ — БАП (2,0), 2,4-Д (1,0); З₃ — кинетин (2,0), НУК (0,5); З₄ — кинетин (2,0), 2,4-Д (1,0); З₅ — НУК (0,5), зеатин (2,0); З₆ — 2,4-Д (1,0), зеатин (2,0); С₁ — БАП (1,0), ИУК (2,0); С₂ — БАП (1,0), 2,4-Д (2,0). Продолжительность холодовой предобработки пыльников составила 0, 3, 6, 9 и 12 сут. при температуре +3...+5°C. Учитывали количество пыльников, введенных в культуру *in vitro*, процент каллусов.

Установлено, что развитие пыльников всех изученных сортов земляники идет по пути образования каллусных тканей, индукция эмбриоидов не отмечена. Появление первых каллусов наблюдалось после трех недель культивирования, а массовое их образование через 1,5 мес. Реакция пыльников разных сортов на указанные выше среды была неодинаковой. Наибольшей частотой каллусогенеза характеризовался сорт Золушка (34,6%). Высокие показатели этого процесса отмечены у сортов Урожайная ЦГЛ (33,5%), Фейерверк (26,8%), Привлекательная (24,4%). Промежуточное положение по активности этого процесса заняли сорта Фестивальная ромашка (13,8%), Десертная (9,1%) и Кама (7,8%). Самым низким каллусогенез был у сортов земляники Львовская ранняя (2,6%) и Редгонтлит (2,1%).

Отмечены различия в реакции пыльников на состав инициальных сред. У сортов Урожайная ЦГЛ и Фейерверк наиболее продуктивной по выходу каллусов (50% и выше) была среда З₅, немного ниже этот показатель был на среде З₃. Для сорта Привлекательная лучшими были среды З₃ и З₁. Для сорта Золушка высокое каллусообразование отмечалось на средах З₂ (60,0%) и З₃ (63,5%). У Фестивальной ромашки лучшей средой для каллусообразования оказалась З₁ (45,2%), а у сортов Кама (23,3%) и Десертная (18,5%) — З₆. Для сорта Львовская ранняя каллусы получены только на среде З₂. Сорт Редгонтлит показал также невысокую каллусогенную активность на испытанных средах — каллусы получены на средах З₂ (8,3%) и З₅ (8,8%). Выделена одна среда (З₃), на которой с разной активностью, но у всех испытанных генотипов земляники образовывались каллусы. Наиболее продуктивной она оказалась для сортов Львовская ранняя, Золушка, Фейерверк. Это указывает на то, что в реакции пыльников на состав культуральной среды имеет место влияние генотипа.

В результате проведенных исследований по холодовой предобработке пыльников установлен оптимальный диапазон ее продолжительности, он составляет 1–3 сут.

Проведен морфологический анализ полученных андрогенных каллусов, который позволил выявить две их основные группы: первая — плотные, молочного цвета, легко зеленеющие на свету, часто с опущением (у таких каллусов можно ожидать регенерации и получения зеленых растений, это так называемые морфогенные; такие каллусы преобладали практически у всех сортов). Вторая — рыхлые, коричневого цвета, не зеленеющие на свету каллусы, лишь небольшая часть у них может со временем зеленеть на свету (такие каллусы также могут образовывать морфогенные структуры, но в меньшей степени, чем каллусы первого типа). В целом отмечено, что у сортов Урожайная ЦГЛ, Фейерверк, Привлекательная, Золушка,

Львовская ранняя и Десертная преобладали каллусы первого типа, т.е. плотные, со светлой окраской, которые зеленели на свету. У сортов Фестивальная ромашка, Редгонтлит и Кама преобладали плотные, но темноокрашенные каллусы. Рыхлые каллусы отмечены в небольшом количестве у сортов Десертная, Фестивальная ромашка, Золушка, Привлекательная.

Кариологические исследования андрогенных каллусов показали, что они характеризуются генетической гетерогенностью. Выявлены гаплоидные, диплоидные, полиплоидные, анеуплоидные каллусные клетки. Считается, что изменение числа хромосом может происходить в результате эндомитоза, эндоредупликации или слияния микроспориальных клеток, а также возможного мутагенного, в частности полиплоидного, действия гормонов (ауксинов и цитокининов) питательных сред. Наличие диплоидных клеток указывает также на то, что андрогенный каллус может брать начало не только от микроспор, но и от клеток соматических тканей стенки пыльника и, кроме того, из тканей тычиночных нитей или связника, имеющих диплоидный набор хромосом. Установлено, что количество как гаплоидных, так и клеток других уровней ploidyности в каллусах неодинаково у разных генотипов и может колебаться в широких пределах: гаплоидных от 19 до 60%, полиплоидных от 4 до 21%, диплоидных от 7 до 62%.

Важный этап в осуществлении андрогенеза *in vitro* — индукция процессов регенерации. У сорта Фейерверк

Андрогенез *in vitro* земляники In vitro androgenesis of strawberry

Е.С. Туровцева, О.Я. Олейникова
Ye.S. Turovtseva, O.Ya. Oleynikova

Резюме

Изучались особенности каллусогенеза и регенерации растений при культивировании *in vitro* пыльников земляники садовой (*Fragaria ananassa* Duch.). Определены благоприятные условия культивирования, найдены оптимальные сочетания фитогормонов в питательных средах, обеспечивающие высокий процент выхода каллусов, а также получение регенерантов.

Summary

Callusogenesis and plant regeneration characteristics were studied in the course of *in vitro* cultivation of anthers in *Fragaria ananassa* Duch. Favourable conditions for cultivation were determined, optimal correlation of phytohormones in nutrient media were discovered, these provide high yield of calluses and the obtaining of regenerants as well.

Ключевые слова: земляника, андрогенез *in vitro*, пыльники, каллусы, растения-регенеранты
Key words: strawberry, *in vitro* androgenesis, anthers, calluses, regenerants

Литература

1. Атанасов, А. Биотехнология в растениеводстве. Новосибирск : ИЦиГ СО РАН, 1993. 241с.
2. Батыгина, Т.Б., Круглова Н.И., Горбунова В.Ю. Андрогенез *in vitro* у злаков: анализ с эмбриологических позиций / Цитология. 1994. Т.36. № 9. С. 993-996.
3. Высоцкий, В.А., Алексеев Л.В. Регенерация растений земляники нейтральнодневных и ремонтантных сортов в культуре листовых дисков и пыльников [Текст] // Плодоводство и ягодоводство : Сб. научных работ. М., 2005. Т.ХII. С. 330-336.
4. Жуков О.С., Олейникова О.Я., Савельев Н.И. / Методические рекомендации по получению растений – регенерантов плодовых пород в культуре пыльников. Мичуринск: изд. ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина, 1994. 36 с.
5. Муравлев, А.А. Культура пыльников в селекции ярового рапса : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 2007. 24 с.
6. Шмыкова, Н.А. Разработка системы биотехнологических методов, направленных на ускорение селекционного процесса овощных культур : автореф. дис. ... д. с.-х. наук. М., 2006. 47 с.
7. Хамукова, Ф.Н. Регенерация растений земляники и малины из эксплантов различного происхождения : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. М., 1994. 22 с.
8. Li Wei – dong. Hebei nongye daxue xuebao / Li Wei – dong, Ge Hui – bo, Zhou Chun – jiang, Zhang Jie. // J. Agr. Univ. Hebei. 2004. Т. 27. №2. P. 59-63.

уже на инициальной среде Z_1 были получены растения-регенеранты с частотой 12,7% от числа образовавшихся каллусов. Один регенерант образовался также на среде Z_5 . У сорта Урожайная ЦГЛ на инициальных средах Z_1 и Z_5 также получены регенеранты с частотой 7,2 и 6,7% соответственно. У сорта Золушка один побег был отмечен на инициальной среде Z_1 , а образование корней с частотой 21,3% и индукция побегов (44,7%) отмечалось во втором пассаже на среде, в состав которой входили БАП (2,0 мг/л) и ИУК (1,0 мг/л).

Полученные регенеранты успешно размножались на среде МС с добавлением 1,0 и 2,0 мг/л БАП + 1,0 мг/л ИУК, а их укоренение достигалось в присутствии 1,0— 2,0 мг/л ИМК.

Таким образом, отмечено, что для сортов Золушка, Фейерверк, Привлекательная наилучшие результаты дает наличие в среде 6-бензиламинопурина и кинетина. Для сортов Урожайная ЦГЛ, Десертная, Кама, Редгонтлит лучше использовать в инициальных питательных средах в качестве цитокинина зеатин. Присутствие 6-бензиламинопурина в среде оказалось наиболее благоприятным для сортов Львовская ранняя и Фестивальная ромашка. В наибольшей степени свой андрогенетический потенциал проявили сорта земляники отечественной селекции, в первую очередь полученные во ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина (Урожайная ЦГЛ, Фейерверк), а также сорт Золушка селекции ВСТИСП. Это связано с их высоким адаптационным потенциалом к абиотическим и биотическим стрессорам. 