

ПРОИЗВОДСТВО ПОСАДОЧНОГО МАТЕРИАЛА ЯГОДНЫХ И ДЕКОРАТИВНЫХ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ *IN VITRO* И КОНТРОЛЬ ИХ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЧИСТОТЫ
Н.В. Водчиц, М.А. Трейлиб

Полесский государственный университет, vodchits.n@polessu.by, trejlib.m@polessu.by

Аннотация. Основными направлениями деятельности лаборатории являются: получение методом клонального микроразмножения *in vitro* генетически однородного и чистого посадочного материала растений и ДНК-паспортизация сортов и гибридов.

Ключевые слова: микроклональное размножение, растение-регенерант, *in vitro*, адаптация, молекулярные маркеры.

Отраслевая лаборатория "ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве" является структурным подразделением биотехнологического факультета учреждения образования "Полесский государственный университет", аккредитованного в качестве научной организации в Государственном комитете по науке и технологиям Республики Беларусь Национальной академии наук Беларуси.

Основными направлениями деятельности лаборатории являются: получение методом клонального микроразмножения *in vitro* генетически однородного и чистого посадочного материала ценных сельскохозяйственных растений; ДНК-паспортизация сортов и гибридов; разработка генетических основ создания новых перспективных форм и линий животных, характеризующихся высокой устойчивостью, продуктивностью и качеством.

На сегодняшний день в соответствии с разработанными технологическими регламентами производства, в культуре *in vitro* лаборатория успешно размножает ягодные и декоративные растения, в том числе краснокнижные [1, с. 182].

Преимущества микроклонального размножения растений *in vitro* перед традиционным способом очевидно: выращивание оздоровленного от патогенов генетически однородного материала и получение высокоурожайных сортов независимо от времени года [2, с. 10].

Производство саженцев ягодных и декоративных культур в промышленных объемах включает разработку ряда технологий, повышающих эффективность различных этапов клонального микроразмножения: подбор оптимальных сред на этапе культивирования первичных эксплантов, для высокого коэффициента размножения и укореняемости регенерантов. А система идентификации и паспортизации растений на основе ДНК-маркеров позволит исключить фальсификацию сортов и связанных с этим экономических потерь [1, с. 183].

Растения-регенеранты могут быть получены путем активации существующих апикальных и пазушных меристем надземных и подземных органов, соматического эмбриоидогенеза и образования растений *de novo* из каллусной ткани [3, с. 28].

Использование одревесневших черенков с еще не распустившимися почками позволяет получить сильные, жизнеспособные экспланты, которые быстро переходят к активному размножению. Однако доля зараженного грибами и бактериями материала из-за высокой инфицированности исходных растений в этом случае может быть весьма значительна.

Первичный растительный эксплант полностью освобождают от всех патогенов, так как инфекция ингибирует рост клеток и приводит культуру к гибели.

В нашем случае мы проводили стерилизацию растворами фунгицидов и гипохлоритом натрия, так как опыты предыдущих исследований показали, что данным методом образуется наибольшее количество здорового посадочного материала у разных культур.

После стерилизации материал высаживали на агаризованные питательные среды Мурасиге-Скуга с добавлением 0,25–1 мг/л 6-бензиламинопурина (6-БАП) [2, с. 12].

Со 2–3 пассажа начинается собственно микроразмножение, на эффективность которого влияет видовая и сортовая специфика растений. На данном этапе очень важно подобрать оптимальный состав питательной среды. На стандартной среде MS и MS с добавлением Na в присутствии БАП в качестве индуктора побегообразования с концентрацией 0,5 мг/л в первом случае и 1,0 мг/л – во втором, а также универсального регулятора роста ауксиновой природы индолилмасляной кислоты

(ИМК) в концентрации 1,0 мг/л увеличивается показатель коэффициента размножения и формируются хорошо развитые побеги винограда, земляники садовой, павловнии и сирени [2, с. 14].

Культивирование голубики на стадии микроразмножения регенерантов *in vitro* на питательной агаризованной среде WPM (Woody Plant Medium) с фитогормональным составом 0,1–0,5 мг/л ИМК, как самостоятельно, так и в комбинации с 3-индолилуксусной кислотой (ИУК) привело к увеличению значений всех показателей роста и развития [3, с. 130].

Для этапа укоренения брали регенеранты со средней длиной побега 15–20 мм, и со средним количеством листьев 2–3 штуки. Применяли среды MS и WPM в присутствии гормонов: 3-индолилуксусная кислота, индолилмасляная кислота, нафтилуксусная кислота с разными концентрациями для разных культур.

Наилучший результат укоренения винограда наблюдался на среде MS в присутствии гормонов ИУК с концентрацией 2,0 мг/л и ИМК+ИУК с концентрацией 1,0 мг/л каждого [2, с. 14]. Для увеличения коэффициента жизнеспособности и укореняемости регенерантов сортовой голубики высокорослой *in vitro* оптимальным был гормональный состав агаризованной питательной среды WPM, с применением низких концентраций ауксинов, в пределах: 0,1–0,5 мг/л ИМК, 0,1–1,0 мг/л ИУК [3, с. 130].

Укоренение микропобегов в грунте *ex vitro* – является завершающим наиболее трудоемким и ответственным этапом, от которого зависит успех клонального микроразмножения.

Исследованиями многих авторов показана эффективность использования для адаптации ягодных растений субстратов, основными компонентами которых являются торф, перлит, песок в разных соотношениях. Торф применяется как стандартный субстрат при посадке в грунт при микроклональном размножении. Песок необходим для обеспечения влаго- и воздухопроницаемости; хорошо удерживает тепло. Перлит также поддерживает нужный уровень влаги в почве, так как впитывает лишнюю воду, к тому же препятствует ее слеживанию [2, с. 14].

Сравнительный анализ результатов развития корней и побегов на разных субстратах для растений жимолости и ежевики показал, что регенеранты лучше всего адаптировались на субстрате смеси торфа с перлитом [2, с. 15].

Максимальная высота, пророст и приживаемость стерильного материала голубики значительно лучше в торфо-грунте, а павловния хорошо адаптируется на искусственных субстратах: перлит, вермикулит, смесь из вермикулита и ионообменного субстрата [11, с. 128].

Наиболее точным и эффективным методом определения сортопринадлежности образцов является идентификация по молекулярным маркерам [4, с. 132].

Работа с некоторыми представителями показала биохимическую «проблемность» рода *Vaccinium* как носителя большого количества веществ, ингибирующих ПЦР в недостаточно очищенных экстрактах [5, с. 30].

Для растений родов *Vaccinium*, *Rubus*, *Rhododendron*, *Syringa* модифицирован протокол выделения ДНК. Адаптированная методика дает возможность эффективно использовать для выделения нуклеиновых кислот не только зеленые листья, которые не всегда доступны, но и стебли растений.

Созданы эталонные генетические паспорта для сортов и видов растений рода *Vaccinium* с применением ISSR-подхода, CAPS- и SSR-маркеров [1, с. 184].

Используя четыре межмикросателлитных праймера (UBC 808, UBC 818, UBC 824, UBC 867), а также три пары SSR-праймеров нам удалось получить воспроизводимые профили, обладающие высоким уровнем полиморфизма, позволяющие провести идентификацию сортов].

CAPS-метод применяли для изучения полиморфизма 10 ISSR-участков генома голубики по наличию сайтов рестрикции. Были получены результаты гидролиза трех ISSR-фрагментов, элюированных из агарозных гелей, двумя эндонуклеазами рестрикции, характеризующимися повышенной частотой расщепления геномной ДНК [4, с. 132].

Список использованных источников

1. Водчиц, Н. В. Результаты и перспективы научной деятельности ОЛ “ДНК и клеточных технологий в растениеводстве и животноводстве” УО “Полесский государственный университет” / Н. В. Водчиц // Пинские чтения : матер. I международной научно-практической конференции, УО “Полесский государственный университет”, г. Пинск, 15–16 сентября 2022 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.] ; редкол. : В.И. Дунай [и др.]. – Пинск : ПолесГУ, 2022. – С. 182–185.

2. Лозицкая, А. А. Зеленое производство : методические разработки / А. А. Лозицкая, Н. В. Водчиц, И. О. Беда, Т. В. Герасимович. – Пинск : УВО "Полесский государственный университет", 2021. – 17 с.
3. Кудряшова, О. А. Физиолого-биохимические особенности действия брассиностероидов на процессы микроклонального размножения голубики высокорослой *Vaccinium corymbosum* L. : дис. ... канд. биол. наук : 03.01.05 / О. А. Кудряшова. – Минск, 2015. – 176 л.
4. Водчиц, Н. В. Применение CAPS-анализа ISSR-маркеров при типировании сортов голубики высокой / Н. В. Водчиц [и др.] // Веснік ГрГУ .Серыя 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія. – 2016. – Т. 6. – № 3.– С. 132–139.
5. Водчиц, Н. В. Сравнительный анализ методов экстракции общей геномной ДНК голубики высокорослой / Н. В. Водчиц [и др.] // Веснік Палескага дзяржаўнага ўніверсітэта. Серыя прыродазнаўчых навук. – 2014. – №. 2 – С. 25–30.