

УДК 575.222.73:582.734.4:581.143.6

Е.В. АМБРОС, кандидат биологических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ *FRAGARIA ANANASSA* X *POTENTILLA NEPALENSIS* МЕТОДОМ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ

Показана перспективность применения эмбриокультуры для получения межродовых гибридов *Fragaria ananassa* x *Potentilla nepalensis*. Определен оптимальный срок изоляции зародышей. Формирование растений-регенерантов происходило как путем прямой регенерации на безгормональной среде МС, так и через стадию каллусогенеза при культивировании на модифицированной среде МС с добавлением 0,2 мг/л БАП и 1,0 мг/л 2,4-Д. Жизнеспособные образцы получены путем регенерации из каллусной ткани на питательных средах МС с добавлением 0,75 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГК₃.

Ключевые слова: *Fragaria* x *ananassa* Duch., *Potentilla nepalensis* Hook., межродовая гибридизация, розовоцветковые сорта, селекция, эмбриокультура.

Введение

Получение новых форм культурных растений с заданными признаками – одна из актуальных проблем биологии. Земляника занимает лидирующее место в мире среди ягодных культур по площадям и урожаю. До сих пор сортимент этой культуры, представленный более 5 тысячами сортов, создан на базе одного вида – земляники крупноплодной (*Fragaria* x *ananassa* Duch., $2n=8x=56$). Этот вид обладает высокой экологической и репродуктивной пластичностью благодаря высокому уровню пloidности и гетерозиготности, обусловленной спонтанной гибридизацией между двумя октоплоидными американскими видами *F. virginiana* Mill. и *F. chiloensis* Mill. [6]. Тем не менее, интрогрессия в фонд садовой земляники ценного генетического материала дикорастущих видов (например, *Potentilla* L.) приобретает все большую значимость. Создание розовоцветковых сортов *F.* x *ananassa* с ремонтантным типом плодоношения является перспективным направлением селекции. С этой целью в межродовые скрещивания с представителями рода *Fragaria* L. вовлекались различные роды семейства Rosaceae L.: *Rosa* L., *Padus* Mill., *Potentilla*, *Comarum* L. и др. [3, 7]. В большинстве случаев межродовая гибридизация приводит к оплодотворению, однако процент жизнеспособных проростков невелик, что обусловлено межгеномной несовместимостью [5]. Культивирование зародышей *in vitro* снижает риск потери ценных генотипов, так как их развитие протекает в контролируемых условиях [2]. В связи с этим целью данной работы было получение межродовых гибридов *Fragaria ananassa* x *Potentilla nepalensis* Hook. с использованием метода эмбриокультуры.

Объекты и методы исследования

Исходным материалом послужили семянки, полученные от скрещивания *F. ananassa* x *P. nepalensis*. В качестве эксплантов для культивирования *in vitro* использовали незрелые зародыши и семядоли незрелых зародышей. Для получения асептического материала семянки обрабатывали 70%-ным спиртом в течение 5 мин, стерилизовали 30%-ным раствором перекиси водорода в течение 15 мин с последующим четырехкратным промыванием в стерильной дистиллированной воде. Зародыши в условиях ламинарного бокса извлекали из семянок, разрезанных поперек в апикальной части [9]. Экспланты переносили на модифицированную среду Мурасиге-Скуга - МС [10], содержащую 0,5-1,0 г/л гидролизата казеина, 1,0 мг/л тиамина, 5,0 мг/л пиридоксина, 5 мг/л никотиновой

кислоты, 3-5% сахарозы и различные варианты регуляторов роста: 1) 0,5 мг/л БАП (6-бензиламинопурина) + 2,0 мг/л 2,4-Д (2,4- дихлорфеноксиуксусную кислоту); 2) 0,2 мг/л БАП + 1,0 мг/л 2,4-Д; 3) 0,2 мг/л БАП + 2,0 мг/л 2,4-Д; 4) 0,1 мг/л БАП + 5,0 мг/л 2,4-Д; 5) 5,0 мг/л БАП + 0,1 мг/л НУК (α- нафтилуксусную кислоту); 6) 1,0 мг/л БАП + 0,9 мг/л НУК; 7) без регуляторов роста (контроль). Изолированные экспланты выдерживали 4 недели в темноте при температуре 25°C. После каллусообразования их переносили в условия 16-ти часового фотопериода, при температуре днем 23-25°C, ночью 16-18°C, освещенности 4 клк. Эксперимент проводился в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Известно, что успех эмбриокультуры *in vitro* во многом зависит от срока изоляции зародыша и состава питательной среды. Всего было введено в культуру *in vitro* 1016 зародышей. Поскольку абортирование зародыша может происходить на ранних этапах развития, их извлекали из незрелых семян в несколько периодов: через 10-15 дней после опыления (ДПО), 15-20 ДПО, 20-25 ДПО, 25-30 ДПО. Зародыши, изолированные на 10-15 ДПО, находились в глобулярной стадии развития. Через 15-20 дней после опыления происходила дифференциация семядолей, и зародыш вступал в сердечковидную стадию развития, а к 20-25 дню по мере роста семядолей переходил в стадию торпеды. Зародыши, извлеченные на 25-30 ДПО, имели сформированные семядоли с первичным корешком и почечкой (рис. 1).

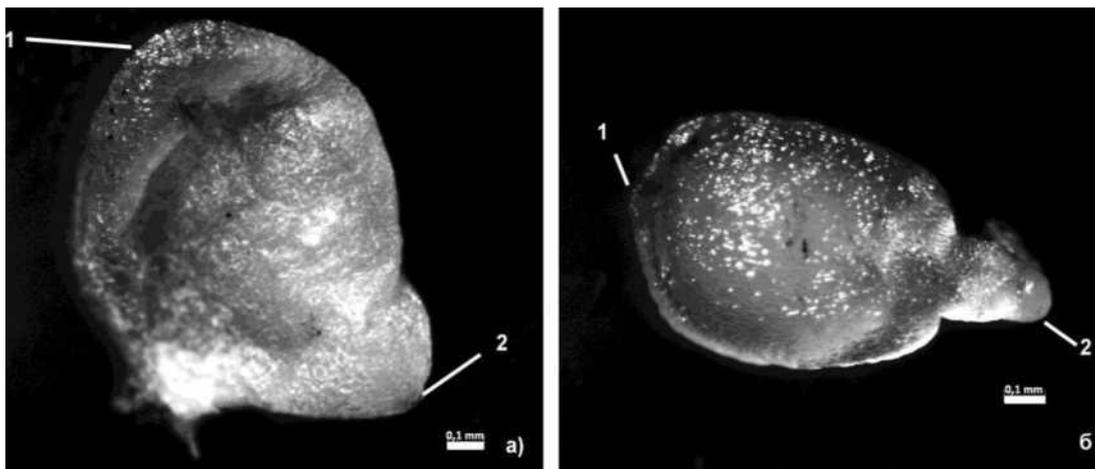


Рис. 1. Зародыши *F. ananassa* x *P. nepalensis*: а) 15-20 ДПО; б) 25-30 ДПО.

Условные обозначения: 1 – семядоли, 2 – первичный корешок.

При культивировании зародышей, изолированных на 15-20, 20-25, 25-30 ДПО, на безгормональной среде МС 4,5% зародышей формировали проростки. В основном прорастали зародыши, извлеченные на 25-30 ДПО (рис. 2 а). Через семь дней зародыши развивались в проростки и к концу четвертого месяца культивирования имели 5-7 настоящих листьев (рис. 2 б).

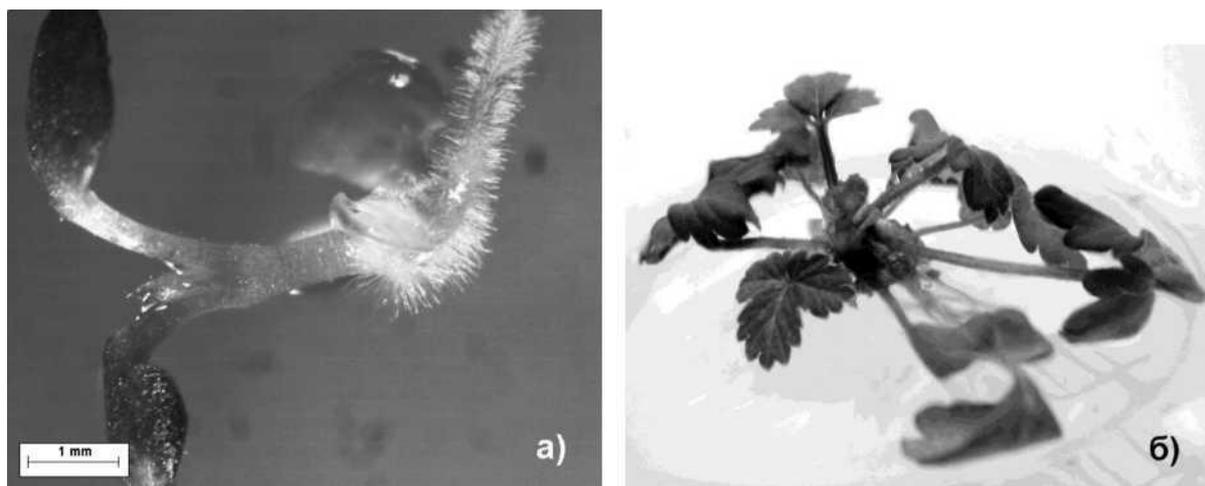


Рис. 2. Регенерант, полученный от скрещивания *F. ananassa* x *P. nepalensis*: а) через 7 дней культивирования; б) через 3 месяца культивирования на безгормональной среде МС.

Доля регенерантов составила 3,6%, так как на ювенильной стадии большинство всходов погибли. Известно, что при культивировании гибридного материала, полученного при отдаленных скрещиваниях, могут наблюдаться различные аномалии роста, затрагивающие надземную и корневую части [8]. В нашем эксперименте аномалии при формировании растений выражались в отсутствии или резком ослаблении ростовых процессов, отсутствии роста корня или роста корня без развития семядольного листа, нарушении полярности, образовании этиолированных листьев, возникновении некротических участков тканей при последующем усыхании. Выявленные аномалии, возможно, обусловлены генетической отдаленностью компонентов скрещивания, которые в силу межродовой несовместимости приводят к летальности проростков.

В качестве индуктора адвентивного побегообразования у гибридных проростков был выбран БАП, так как по сравнению с другими цитокининами (кинетином и изопентениладенозином) наилучшие показатели регенерационной способности земляники отмечены на среде при добавлении данного регулятора роста [4]. Введение БАП в концентрации 0,25 мг/л позволило получить жизнеспособные конгломераты с 10-15 микропочками, из которых удавалось получить от 3 до 6 микропобегов на один эксплант, способных к дальнейшему росту. Сформировавшиеся побеги переносили на среду МС с половинным содержанием макроэлементов, без регуляторов роста и с пониженным содержанием сахарозы (2%). Все микропобеги проявили способность к регенерации корней.

Для увеличения выхода растений при микроразмножении *F. ananassa* x *P. nepalensis*, кроме прямой регенерации растений из изолированных зародышей, использовали регенерацию адвентивных побегов из изолированных участков семядолей. Известно, что ткани семядолей у многих видов растений обладают высоким морфогенетическим потенциалом [11]. В качестве контроля использовали питательную среду МС без регуляторов роста, на которой отмечалась 100%-ная гибель эксплантов. При культивировании эксплантов на среде с регуляторами роста через 2-3 дня семядоли укрупнялись, а через 7 дней формировалась каллусная ткань. После 3 недель культивирования у 97% эксплантов, изолированных из семян на 20-25 и 25-30 ДПО, на средах № 2 и № 6 образовался морфогенный каллус – плотный, молочного цвета, зеленеющий на свету (табл. 1, рис. 3).

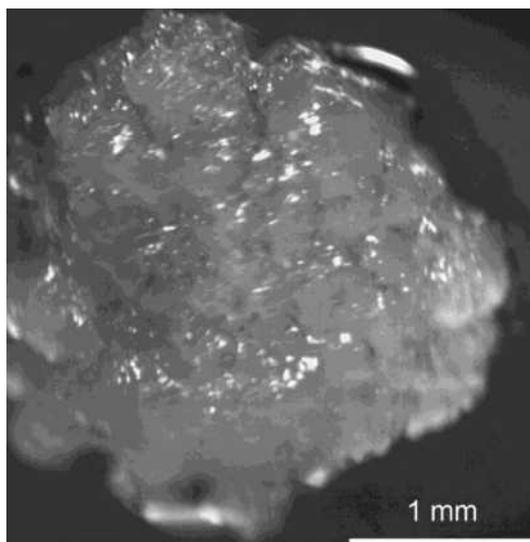


Рис. 3. Морфогенный каллус, полученный из семядоли зародыша, изолированного через 28 ДПО (среда МС с 0,2 мг/л БАП и 1,0 мг/л 2,4-Д, 2 недели культивирования *in vitro*).

Таблица 1

Влияние стадии развития зародыша, комбинаций и концентраций регуляторов роста на отзывчивость эксплантов в культуре *in vitro* (n=20)

Возраст эксплантов (ДПО)	Концентрация регуляторов роста, мг/л			Отзывчивость эксплантов
	БАП	2,4-Д	НУК	
10-15	0,5	2,0	-	НМК
	0,2	1,0	-	Д
	0,2	2,0	-	Д
	0,1	5	-	Д
15-20	5,0	-	0,1	НМК
	1,0	-	0,9	НМК
	0,5	2,0	-	НМК
	0,2	1,0	-	НМК
20-25	1,13	-	0,93	МК
	0,1	5	-	НМК
	0,2	1,0	-	МК
	0,5	2,0	-	НМК
25-30	0,2	1,0	-	МК
	0,5	2,0	-	НМК
	5	-	0,1	НМК

Условные обозначения: Д – дегенерация экспланта, НМК – неморфогенная каллусная ткань, МК – морфогенная каллусная ткань.

На семядолях зародышей, изолированных из семян через 15-20 ДПО, формировалась неморфогенная каллусная ткань рыхлой консистенции, сильно обводненная, бесструктурная, желто-кремового цвета, не зеленеющая на свету, а также плотная, зернистая, краснеющая на свету ткань (рис. 4).

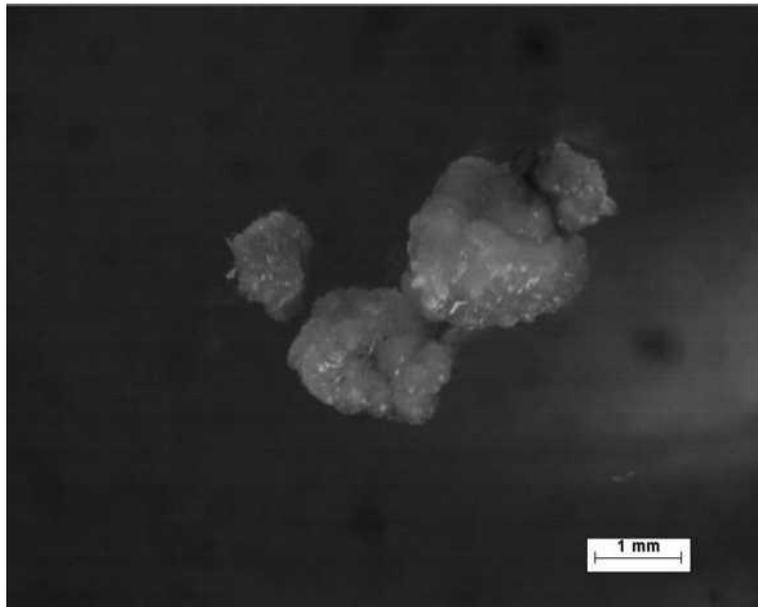


Рис. 4. Неморфогенный каллус, полученный из семядоли зародыша, изолированного через 15 ДПО (среда МС с 0,2 мг/л БАП и 1,0 мг/л 2,4-Д, 3 недели культивирования *in vitro*).

Неморфогенный каллус впоследствии некротизировался. Семядоли зародышей, извлеченные на 10-15 ДПО, в основном дегенерировали, почти не образуя каллусной ткани.

Для регенерации растений морфогенные каллусы были перенесены на среду с БАП в концентрации 0,75 мг/л, на которой происходило формирование микропочек с образованием конгломерата коротких побегов (рис. 5).

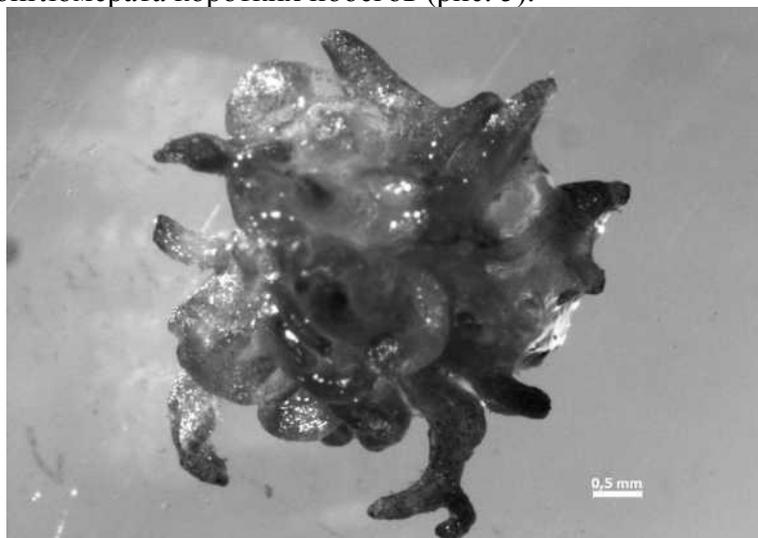


Рис. 5. Адвентивное побегообразование через 5 недель культивирования на среде МС с 0,75 мг/л БАП.

Причем доля каллусов, образовавших побеги у эксплантов, изолированных на 25-30 ДПО, была в 2 раза больше по сравнению с эксплантами, изолированными на 2025 ДПО (табл. 2).

Таблица 2

Способность к образованию каллусной ткани и последующая индукция органогенеза из семядоли зародыша (n=20)

Возраст экспланта (ДПО)	Доля эксплантов, образовавших каллусную ткань, %	Доля каллусов, образовавших побеги, %
10-15	2,2	0,0
15-20	92,0	0,0
20-25	97,1	1,9
25-30	92,1	3,8

При последующем субкультивировании конгломератов с микропобегами на среде МС с добавлением гибберелловой кислоты (ГК₃) в концентрации 0,1 мг/л происходила их элонгация [1], и к концу шестого месяца культивирования регенеранты имели 5-7 настоящих листьев. Максимальный коэффициент размножения составил 1729 новых побегов за пассаж через 6 месяцев после введения в культуру (рис. 6).



Рис. 6. Кластеры микропобегов *F. ananassa* x *P. nepalensis*, полученные на среде МС с 0,1 мг/л ГК₃.

Для укоренения регенерантов использовали безгормональную среду МС с половинным содержанием макроэлементов и пониженным содержанием сахарозы (2%). Корнеобразование наблюдали через 3-4 недели. Всего с помощью эмбриокультуры было получено 29 образцов предположительно гибридного происхождения, т.е. проявляющих морфологические признаки *Fragaria ananassa* и *Potentilla nepalensis*. Дальнейший цитологический анализ числа хромосом в соматических тканях внесет окончательную ясность в их происхождение. Основные трудности возникли при адаптации регенерантов к условиям *ex vitro*, часть из них в процессе адаптации погибла. В настоящий момент адаптировано 6% растений, которые могут быть включены в селекционный процесс.

Выводы

1. Наиболее компетентными к развитию оказались зародыши, выделенные из семян через 25-30 ДПО. Этот период изоляции экспланта обеспечил максимальный выход растений – регенерантов.

2. Получение морфогенного каллуса оказалось возможным только при использовании в качестве исходного материала эксплантов, изолированных из семян на 20-25 и 25-30 ДПО при культивировании на модифицированной среде МС с добавлением 0,2 мг/л БАП и 1,0 мг/л 2,4-Д.

3. Регенерация *in vitro* проходила по пути как прямого, так и непрямого геммогенеза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития», проект №9.

Список литературы

1. Амброс Е.В. Перспективы использования межродовых гибридов *Fragaria ananassa* x *Potentilla nepalensis* в интродукции и селекции / Е.В.Амброс, Т.И.Новикова // Вестник ИрГСХА. – 2011. – Вып. 44, №4. – С. 7-13.

2. Расторгуев С.Л. Культура изолированных тканей и органов в селекции плодовых растений: Научное издание/С.Л.Расторгуев. – Мичуринск: МичГАУ, 2009. – 203 с.

3. Asker S. Some viewpoints on *Fragaria* x *Potentilla* intergeneric hybridization / S. Asker // Hereditas. – 1971. – № 67. – P. 181-190.

4. Bhatt I.D. Micropropagation of Indian wild strawberry /I.D.Bhatt, U.Dhar// Plant Cell, Tissue and Organ Cult. – 2000. – V. 60, №2. – P. 83-88.

5. Chen Z. J., Ni Z. Mechanisms of genomic rearrangements and gene expression changes in plant polyploids /Z.J. Chen, Z. Ni. // BioEssays. – 2006. – V. 28, № 3. – P. 240-252.

6. Darrow G.M. The strawberry – history, breeding and physiology/G.M.Darrow. – New York: Holt, Rinehart and Winston, 1966. – 447 p.

7. Ellis J.R. *Fragaria-Potentilla* intergeneric hybridization and evolution in *Fragaria* /J.R. Ellis // Proc. Linnean Society of London. – 1962. – V.173. – P. 99-106.

8. Mangelsdorf A.J. Studies on the genetics of *Fragaria* / A.J. Mangelsdorf // Genetics. – 1927. – V. 12. – P. 307-339.

9. Miller A.R. Enhanced strawberry seed germination through in vitro culture of cut achenes / A.R. Miller//J. Am. Soc. Hortic. Sci. – 1992. – Vol. 117, № 2. – P. 313-316.

10. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures / T. Murashige, F. Skoog // Physiol Plant. – 1962. – V.15, № 3. – P. 473-497.

11. Silva T. In vitro production and propagation of *Fragaria vesca* x *Potentilla fruticosa* hybrids / Plant Cell Tissue and Organ Culture. – 1996. – V. 46. – P. 51-58.

Статья поступила в редакцию 06.03.2013 г.

E.V. AMBROS, *PhD in Biology*

Central Siberian Botanical Garden of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia

OBTAINING OF INTERSPECIFIC *FRAGARIA ANANASSA* X *POTENTILLA NEPALENSIS* HYBRIDS BY EMBRYO CULTURE

An application of embryo culture for obtaining of *Fragaria ananassa* x *Potentilla nepalensis* hybrids has been studied. Optimum period of embryo isolation has been determined. Formation of microplants was occurred both by direct regeneration on hormoneless MS medium and by callusogenesis on modified MS medium with 0,2 mg l⁻¹ BA and 1,0 mg l⁻¹ 2,4-D. Viable samples were obtained by regeneration from a callus tissue on modified MS media supplemented with 0,75 mg l⁻¹ BA and 0,1 mg l⁻¹ GA₃.

Є.В. АМБРОС, кандидат біологічних наук

Федеральна державна бюджетна установа науки «Центральний сибірський ботанічний сад Сибірського відділення РАН», м. Новосибірськ, Росія

ОТРИМАННЯ МІЖРОДОВИХ ГІБРИДІВ *FRAGARIA ANANASSA* X *POTENTILLA NEPALENSIS* МЕТОДОМ ЕМБРІОКУЛЬТУРИ

Показано перспективність застосування ембріокультури для отримання міжродових гібридів *Fragaria ananassa* x *Potentilla nepalensis*. Визначено оптимальний строк ізоляції зародків. Формування рослин-регенерантів відбувалося як шляхом прямої регенерації на безгормональному середовищі МС, так і через стадію калюсогенезу при культивуванні на модифікованому середовищі МС з додаванням 0,2 мг/л БАП 1,0 мг/л 2,4-Д. Життєздатні зразки отримані шляхом регенерації з калюсної тканини на поживних середовищах МС з додаванням 0,75 мг/л БАП і 0,1 мг/л ГК₃.

Е.В. АМБРОС, кандидат биологических наук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Центральный сибирский ботанический сад Сибирского отделения РАН», г. Новосибирск, Россия

ПОЛУЧЕНИЕ МЕЖРОДОВЫХ ГИБРИДОВ *FRAGARIA ANANASSA* X *POTENTILLA NEPALENSIS* МЕТОДОМ ЭМБРИОКУЛЬТУРЫ

Показана перспективность применения эмбриокультуры для получения межродовых гибридов *Fragaria ananassa* x *Potentilla nepalensis*. Определен оптимальный срок изоляции зародышей. Формирование растений-регенерантов происходило как путем прямой регенерации на безгормональной среде МС, так и через стадию каллусогенеза при культивировании на модифицированной среде МС с добавлением 0,2 мг/л БАП и 1,0 мг/л 2,4-Д. Жизнеспособные образцы получены путем регенерации из каллусной ткани на питательных средах МС с добавлением 0,75 мг/л БАП и 0,1 мг/л ГК₃.