

УДК 635.92:581.522.4

О.И. Молканова, Е.В. Спиридович, Л.Н. Коновалова, Н.Г. Брель, Ю.М. Зинина, В.Н. Решетников

КОМПЛЕКСНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ВИДОВ И СОРТОВ РОДА *SYRINGA* L. В ГБС РАН И ЦБС НАН БЕЛАРУСИ

На основе репрезентативных коллекций ботанических садов России и Беларуси оптимизированы условия культивирования и сохранения *in vitro* представителей рода *Syringa* L. Показана возможность применения RAPD-анализа для контролирования аутентичности и генетической стабильности в процессе культивирования *in vitro*.

Ключевые слова: биологическое разнообразие, морфогенетический потенциал, верификация *in vitro*, рода *Syringa*.

Сирень – одно из наиболее популярных декоративных древесных растений. В течение нескольких столетий ее культивируют в умеренных широтах Евразии и Северной Америки. Практически все виды рода *Syringa* в большей или меньшей степени декоративны и устойчивы в культуре. Наиболее известна сирень обыкновенная (*Syringa vulgaris* L.), на основе которой получено подавляющее большинство сортов.

Целенаправленная работа по созданию сортов сирени была начата в середине XIX в. Большинство культиваров было выведено в первой половине XX в. В настоящее время Международный регистр сирени (International Register and Checklist of Cultivar Names in the Genus *Syringa* L.) насчитывает около 2000 сортов [1].

Наиболее репрезентативные коллекции этой культуры сосредоточены преимущественно в ботанических садах и интродукционных центрах.

В настоящее время для сохранения и воспроизводства видового и сортового разнообразия сирени используют современные методы культивирования *in vitro*.

Материалы и методика исследований

Объектами исследования были виды и сорта сирени из коллекций ГБС РАН и ЦБС НАН Беларуси.

Методика исследований основывалась на общепринятых классических приемах с культурами изолированных тканей и органов растений [2].

Для индукции культуры в качестве эксплантов использовали апикальные и латеральные почки зрелых и молодых побегов с небольшим участком стебля, а также фрагменты стебля с 1-2 пазушными почками в период активного роста.

В качестве стерилизаторов использовали 0,1%-й раствор диацета, 7%-й раствор гипохлорита кальция в сочетании с обработкой 70%-м этанолом.

В качестве питательной среды в эксперименте использовали среды с основой Мурасиге-Скуга (MS) [3], различающиеся по типу и концентрации цитокининов (БАП и 2iP – 0,5-3,0 мг/л), а также наличию или отсутствию ауксина (ИУК – 0,3 мг/л). Подсчитывали количество побегов на одном экспланте, количество междоузлий на каждом побеге и измеряли высоту растений-регенерантов. Полученные данные оценивали методом дисперсионного анализа.

В качестве гелеобразующего компонента питательной среды использовали агар (в концентрации 8 г/л) и гелерайт (в концентрации 3 г/л).

Препараты суммарной ДНК получали по методике из листьев растений [4]. В работе использовали 10 олигонуклеотидных десятичленных праймеров. Продукты ПЦР разделяли и визуализировали по стандартным методикам [5].

Результаты и их обсуждение

На основе данных по интродукции рода *Syringa* были отобраны высокодекоративные и устойчивые виды и сорта для проведения комплексных исследований с использованием анатомо-морфологических, биотехнологических и молекулярно-генетических методов.

Состав коллекций ГБС РАН и ЦБС НАН Беларуси достаточно полно отражает генотипическое разнообразие рода *Syringa* (рис. 1).

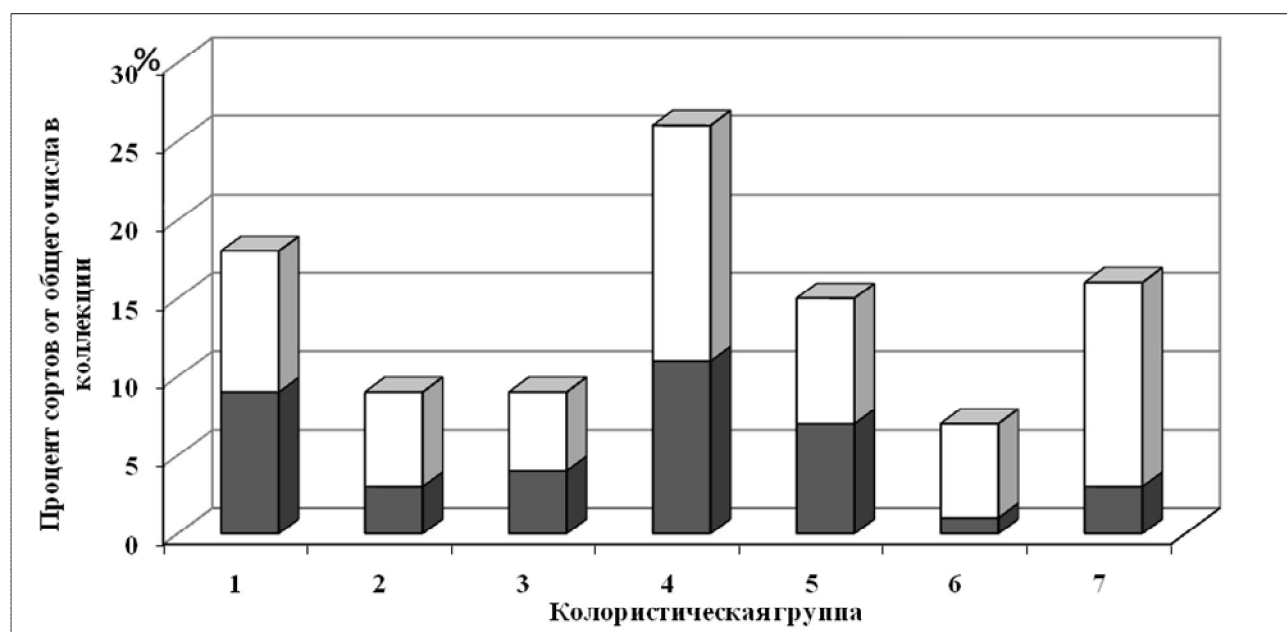


Рис. 1. Распределение сортов коллекций на группы по форме и окраске цветка (в соответствии с Международным регистром рода *Syringa*).

Условные обозначения: 1 – белый; 2 – фиолетовый; 3 – голубоватый; 4 – лиловый/сиреневый; 5 – розоватый; 6 – мажентовый; 7 – пурпурный.

□ – сорта с простыми цветками; ■ – сорта с махровыми цветками

В коллекции представлены сорта с простыми (60%) и махровыми (40%) цветками; с широкой цветовой гаммой: белой (17%), фиолетовой (9%), голубоватой (9%), лиловой/сиреневой (26%), розоватой (15%), мажентовой (8%), пурпурной (16%).

Морфолого-анатомический анализ эксплантов показал, что образующиеся *in vitro* побеги являются по происхождению аксиллярными, то есть развиваются из уже существующих на момент начала эксперимента пазушных меристем растений. Активизация деятельности клеток пазушных меристем происходит через прямой органогенез, минуя стадию каллусообразования. На основании изучения морфогенетических процессов в эксплантах сирени показано, что в культуре *in vitro* происходит реализация органогенного потенциала зачатков пазушных почек, так как у сирени имеется резерв спящих почек [6].

Известно, что существует комплекс факторов, каждый из которых в отдельности и в сочетании с другими оказывает заметное влияние на развитие меристем *in vitro*. Среди них наиболее важными являются тип экспланта, генотип растений, условия культивирования донорных растений, состав питательных сред и др.; в свою очередь, степень влияния каждого фактора зависит от генотипа [7].

Этап собственно микроразмножения является наиболее ответственным для биотехнологического цикла культивирования. Определение факторов, которые влияют на морфогенетический потенциал изучаемых представителей рода *Syringa*, является актуальной задачей.

На этапе размножения отчетливо проявлялись сортовые особенности, что выражалось в различном числе дополнительно заложенных почек и развивающихся из них впоследствии побегов. Из исследованных генотипов выделены сорта с высоким коэффициентом размножения. К ним относятся: Андрияша Громов, Валентина Гризодубова, Виргиния Беккер, Защитникам Бреста, Лиега, Минчанка, Никитская, Русь, Сумерки. Сорта: Леди Линдсней, Мулатка, Романс, Флора характеризовались низким морфогенетическим потенциалом.

В результате проведенных исследований установлено, что на характер развития растений сирени *in vitro* оказывает влияние как гормональный состав питательной среды и генотип экспланта, так и взаимодействие этих факторов ($P_{\text{факт}} > F_{\text{теор}}$) (табл. 1). При этом признак «длина побегов» зависел от гормонального состава питательной среды и взаимодействия изучаемых факторов. На число междоузлий влиял состав питательной среды и генотип, а на число побегов – генотип и взаимодействие вышеуказанных факторов.

Таблица 1

Влияние состава питательной среды, генотипических особенностей и их взаимодействия на морфометрические показатели регенерантов сирени

Признак	Источник изменчивости	F _{факт}	F _{табл}
Длина побега	Среда	13,45	1,85
	Генотип	1,89	2,46
	Взаимодействие	1,57	1,48
Число междоузлий	Среда	2,79	1,85
	Генотип	6,50	2,46
	Взаимодействие	1,46	1,48
Число побегов на экспланте	Среда	1,54	1,85
	Генотип	11,21	2,46
	Взаимодействие	1,51	1,48
Коэффициент размножения	Среда	8,85	1,85
	Генотип	18,06	2,46
	Взаимодействие	6,12	1,48

Исследования показали, что генотипические особенности видов и сортов сирени оказывают влияние на развитие растений в условиях *in vitro* (табл. 2). Генотипом определяются пределы изменчивости регенерационной способности эксплантов и количество формирующихся растений *in vitro*. Это согласуется с результатами, полученными и на других культурах [8; 9].

Таблица 2

Влияние генотипических особенностей на развитие микропобегов сирени на стадии размножения

Номер варианта	Сорт	Длина побега, см	Число		Коэффициент размножения
			междоузлий, шт.	побегов, шт.	
1 (st)	Экселлент	1,96	2,77	1,31	3,63
2	Моник Лемуан	1,83	2,87	1,43	4,10*
3	Примроз	2,27	3,04	1,19	3,62
4	Сенсация	2,62*	3,25	1,24	4,03
5	Мадам Казимир Перье	2,63*	3,28*	1,29	4,23*
НСР₀₅		0,51	0	0,19	0,47

Примечание. * Различие по вариантам существенно на 0,5%-м уровне значимости.

Следует отметить, что экспланты у сортов Моник Лемуан и Мадам Казимир Перье развивались более интенсивно, чем у других сортов. Это характерно и при росте интактных растений этих сортов. В целом прослеживается тесная взаимосвязь между динамикой роста сортов в коллекциях и темпами развития регенерантов в культуре *in vitro*. Подобная тенденция наблюдалась у представителей семейства *Actinidia* L. [10].

Многие исследователи отмечают, что большое значение на развитие эксплантов оказывают компоненты питательной среды, особенно фитогормоны [2; 9]. Для выявления условий, способствующих максимальной реализации морфогенетического потенциала у исследуемых сортов было определено варьирование морфометрических признаков на питательных средах с различным гормональным составом (табл. 3).

Согласно нашим наблюдениям, гормональный состав питательной среды оказывал влияние на развитие побегов в культуре *in vitro* и их морфометрические показатели: количество побегов, длину побега и количество междоузлий.

Таблица 3

Влияние регуляторов роста на развитие регенерантов на стадии размножения

Номер варианта	Содержание регуляторов роста, мг/л			Длина побега, см	Число		Коэффициент размножения
	ВАР	2iP	ИУК		Междоузлий, шт.	побегов, шт.	
1 (st)	0,5	–	0,3	2,35	2,99	1,23	3,68
2	0,5	–	–	2,06	3,15	1,25	3,94
3	1,0	–	–	2,24	2,83	1,20	3,40
4	1,0	–	0,3	2,23	2,78	1,31	3,64
5	2,0	–	–	1,97**	2,73	1,25	3,41
6	2,0	–	0,3	1,97**	3,12	1,23	3,84
7	3,0	–	–	2,14	3,16	1,20	3,79
8	3,0	–	0,3	2,14	2,93	1,44**	4,22**
9	–	0,5	–	2,18	3,40**	1,27	4,32
10	–	0,5	0,3	2,2	3,08	1,27	3,91
11	–	1,0	–	2,03	2,87	1,27	3,65
12	–	1,0	0,3	2,41	3,04	1,35*	4,10**
13	–	2,0	–	2,55	3,54**	1,42**	5,03**
14	–	2,	0,3	2,73**	3,37**	1,24	4,18**
15	–	3,0	–	2,62	3,28**	1,27	4,17**
16	–	3,0	0,3	2,58	2,63**	1,32	3,46
НСР₀₅				0,35	0,28	0,14	0,29

Примечание. ** Различие по вариантам существенно на 0,5%-м уровне значимости.

Из 16 исследуемых сред можно выделить 5, где коэффициент размножения был достоверно выше стандарта, и не происходило угнетения развития микропобегов. Было проведено сравнение коэффициентов размножения сортов, полученных на различных средах, со средним коэффициентом размножения по сортам. На среде, содержащей 2,0 мг/л 2iP, было отмечено достоверное увеличение коэффициента размножения и сохранение его на уровне среднего коэффициента размножения по каждому сорту. Данную среду можно рекомендовать использовать для ускоренного размножения сортов сирени в культуре *in vitro*.

Таким образом, способность к реализации морфогенетического потенциала сирени определяется генотипом и может варьироваться в определенных нормой реакции генотипа пределах, под воздействием экзогенных факторов.

Агар – наиболее часто используемый гелеобразующий материал в культуре ткани. Он – наиболее дорогой компонент среды. В связи с этим ведутся поиски заменителей агара, которые обладают гелирующими свойствами. В качестве гелеобразующего компонента питательной среды наряду с агаром, используется гелрайт. Гелрайт – самогеллирующий гидроколлоид, представляющий полисахарид, содержащий уроневою кислоту, рамнозу и глюкозу [11].

У всех изученных сортов выявлена тенденция увеличения коэффициента размножения и длины микропобега при культивировании на питательной среде, содержащей гелрайт (рис. 2, 3).

При создании коллекции *in vitro* представителей рода *Syringa* было необходимо оценить вариабельность растительного генома и провести молекулярное маркирование коллекции *Syringa*, а также молекулярную паспортизацию модельных видов и сортов.

Молекулярно-генетические методы анализа, основанные на проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР), за последние 20 лет стали одними из самых популярных и используются в настоящее время для изучения многих видов организмов.

Проведенная работа позволила перевести исследования растений сирени на качественно новый уровень, систематизировать по ряду биохимических показателей. В результате проведенных исследований отработан метод выделения высокоочищенной геномной ДНК из листьев сирени, подобраны эффективные праймеры и оптимизированы условия проведения ПЦР, адаптирован метод RAPD-анализа для идентификации видов и сортов сирени.

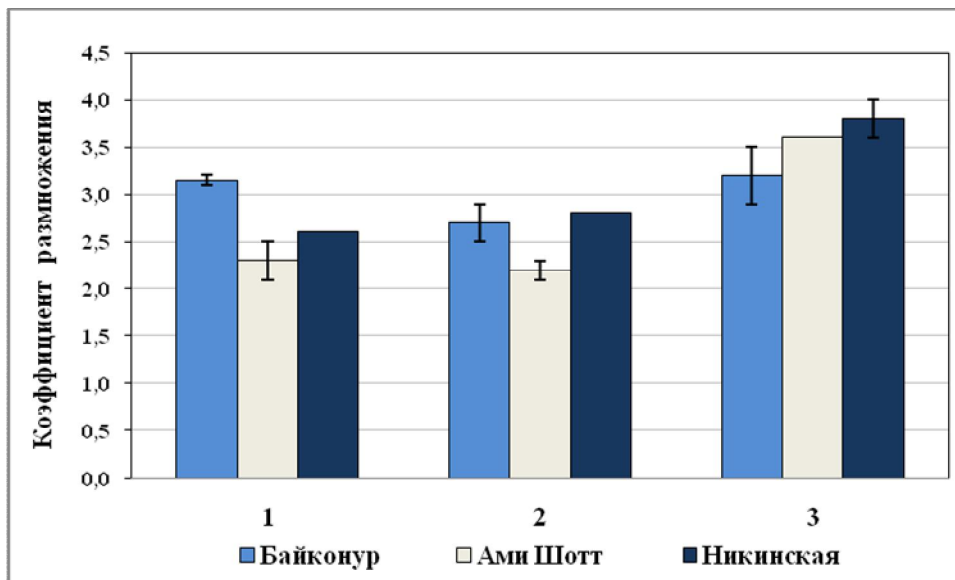


Рис.2. Коэффициент размножения сирени на агаре и гелльрайте.

Условные обозначения: 1 – агар-агар бактериологический, Испания (2010 г.), 2 – агар-агар бактериологический, Испания (2009 г.), 3 – гелльрайт

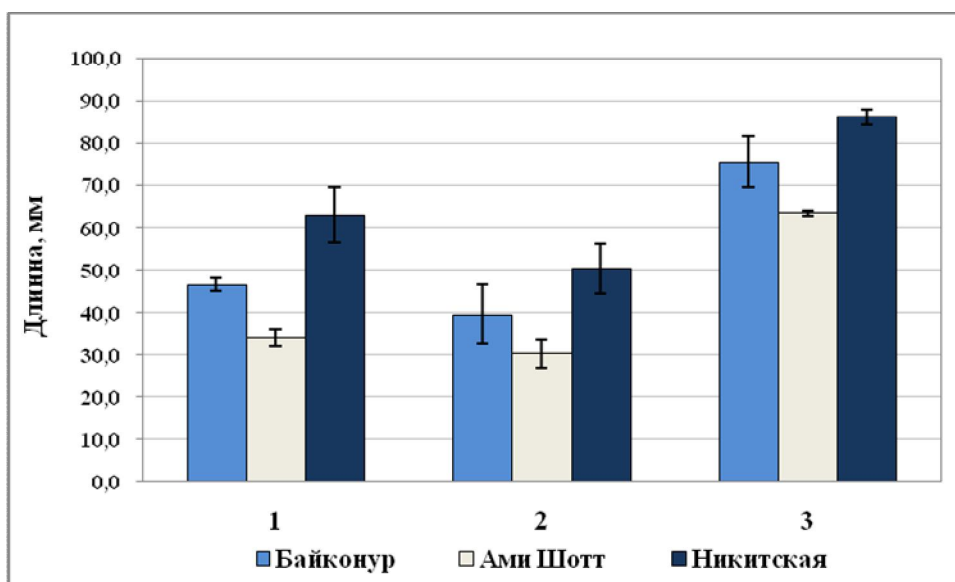


Рис. 3. Длина побегов сирени на агаре и гелльрайте.

Условные обозначения: 1 – агар-агар бактериологический, Испания (2010 г.), 2 – агар-агар бактериологический, Испания (2009 г.), 3 – гелльрайт

Для стабильного поддержания коллекции *in vitro* наряду с подбором оптимального состава питательных сред, используемого гормонального баланса немаловажным условием является сохранение стабильности генотипа полученных микропобегов. Изменчивость среди растений, регенерированных *in vitro*, бывает очень высокой. Наиболее вероятными источниками генетической вариабельности мо-

гут быть мутации, хромосомные нарушения, а также возникновение полиплоидных клеток. Эти нарушения накапливаются главным образом при культивировании каллусных тканей. Следует отметить, что в нашем случае микропобеги сирени получали прямым органогенезом из апикальных и аксиллярных почек, без образования каллуса. Таким образом, этап, при котором наблюдается накопление генетических отклонений, а именно – культивирование каллуса, отсутствует в разработанной нами технологии. Для подтверждения генетической идентичности полученных клонов с исходными генотипами проведено сравнение продуктов RAPD-PCR полученных клонов с продуктами RAPD-PCR исходных генотипов. Для анализа использовали праймеры, показавшие наибольший полиморфизм на различных генотипах сирени (рис.4).

При сравнении продуктов RAPD-PCR полученных клонов с продуктами RAPD-PCR исходных сортов различий не обнаружено, что может служить доказательством генетической идентичности полученных клонов и исходных коллекционных сортов. Таким образом, разработанная система микроклонального размножения сирени может быть использована для получения генетически однородных растений широкого спектра генотипов сирени.

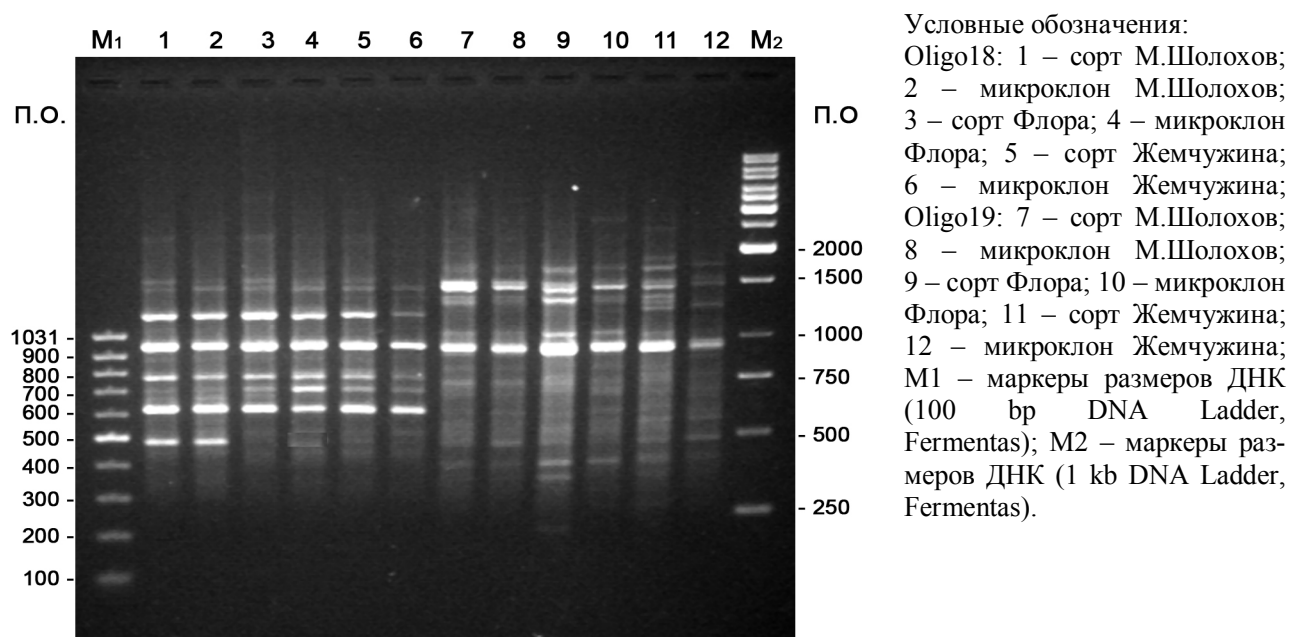


Рис. 4. RAPD-анализ ДНК исходных сортов и микроклонов сирени

На наш взгляд, наличие репрезентативных коллекций в ботанических учреждениях создает предпосылки как для широкого спектра научных исследований и реализации образовательных программ, так и для сохранения биологического разнообразия *ex situ*.

Выводы

Установлено, что особенности клонального микроразмножения, выбор оптимальной модели культивирования *in vitro* тесно связаны с биологическими особенностями вида и его размножением в природе. При сравнительном изучении разных видов и сортов сирени прослеживается корреляция между темпами роста и развития регенерантов в культуре *in vitro* и динамикой их роста в природных условиях.

На основе высокоэффективной технологии клонального микроразмножения создан генетический банк рода *Syringa in vitro*, включающий представителей более 20 видов и 85 сортов сирени.

При изучении роли генотипа и условий культивирования в реализации морфогенетического потенциала показано, что на коэффициент размножения влияют как генотип экспланта и гормональный состав питательной среды, так и взаимодействие этих факторов.

Показана возможность применения RAPD-анализа для контроля аутентичности и генетической стабильности в процессе культивирования *in vitro*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Окунева И.Б., Михайлов Н.Л., Демидов А.С. Сирень. Коллекция ГБС РАН. М.: Наука, 2008. 172 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. М.: ФБК-ПРЕСС, 1999. 160 с.
3. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture // *Physiol. plant.* 1962. № 15. P. 473-497.
4. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from plant tissue // *Focus.* 1990. Vol. 12. P. 13– 15.
5. Westemeier R. *Electrophoresis in practice* (Third Edition). WILEY-VCH Verlag: Weinheim, 2001. 349 p.
6. Орлов П.А. Клеточные и генно-инженерные технологии модификации растений. Минск, 2006. 248 с.
7. Молканова О.И., Чурикова О.А., Коновалова Л.Н., Окунева И.Б. Клональное микроразмножение интродуцированных сортов *Syringa vulgaris* L. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. Биол.* 2002. № 4. С. 8-14.
8. Долгих Ю.И. Соматическая изменчивость растений и возможности ее практического использования (на примере кукурузы): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2005. 45 с.
9. Высоцкий В.А. Биотехнологические методы в системе производства оздоровленного материала плодовых и ягодных растений: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1998. 44 с.
10. Малаева Е.В., Коновалова Л.Н., Молканова О.И. Использование биотехнологических и молекулярных методов для комплексного изучения рода *Actinidia* Lindl. // *Бюл. Глав. бот. сада.* 2008. Вып. 195. С. 177-187.
11. Деменко В.И., Шестибратов К.А., Лебедев В.Г. Укоренение – ключевой этап размножения растений *in vitro* // *Изв. ТСХА.* 2010. Вып. № 1. С. 73-84.

Поступила в редакцию 14.04.11

O.I. Molkanova, E.V. Spiridovich, L.N. Konovalova, N.G. Brel, U.M. Zinina, V.N. Reshetnikov
Complex observation of introduction species and varieties of *Syringa* L. in Main Botanical Garden of the RAS and in the Central Botanical Garden of the NAS of Belarus

The conditions of cultivation and preservation *in vitro* for the representatives of the genus of *Syringa* L. are optimized on basis of representative collections of botanical gardens of Russia and Belarus. The authors have shown the possibility of RAPD-analysis application to control the authenticity and genetic stability of samples *in vitro*.

Keywords: biological diversity, morphogenetic potential, verification *in vitro*, genus of *Syringa*.

Молканова Ольга Ивановна, кандидат биологических наук
Учреждение Российской академии наук «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН»
127276, Россия, Москва, ул. Ботаническая, 4
E-mail: molkanova@mail.ru

Спиридович Елена Владимировна, кандидат биологических наук
ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»
220012, Беларусь, Минск, ул. Сурганова, 2 в
E-mail: E.Spiridovich@cbg.org.by

Коновалова Людмила Николаевна, младший научный сотрудник
Учреждение Российской академии наук «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН»
127276, Россия, Москва, ул. Ботаническая, 4
E-mail: new_tech_@mail.ru

Брель Наталья Григорьевна, научный сотрудник
ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»
220012, Беларусь, Минск, ул. Сурганова, 2 в
E-mail: taraxacumm@mail.ru

Зинина Юлия Михайловна, аспирант
Учреждение Российской академии наук «Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина РАН»
127276, Россия, Москва, ул. Ботаническая, 4
E-mail: new_tech_@mail.ru

Решетников Владимир Николаевич, доктор биологических наук, академик НАН Беларуси
ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси»
220012, Беларусь, Минск, ул. Сурганова, 2 в
E-mail: V.Reshetnikov@cbg.org.by

Molkanova O.I., candidate of biology
Main Botanical Garden named N.V.Tsitsin RAS
127276, Russia, Moscow, Botanicheskaya str., 4
E-mail: molkanova@mail.ru

Spirydovich E.V., candidate of biology
Central Botanical Garden of the NAS of Belarus
220012, Belarus, Minsk, Surganova st., 2 v
E-mail: E.Spiridovich@cbg.org.by

Konovalova L.N.,
Main Botanical Garden named N.V.Tsitsin RAS
127276, Russia, Moscow, Botanicheskaya str., 4
E-mail: new_tech_@mail.ru

Brel N.G., scientific researcher
Central Botanical Garden of the NAS of Belarus
220012, Belarus, Minsk, Surganova st., 2 v
E-mail: taraxacumm@mail.ru

Zinina U.M., postgraduate student
Main Botanical Garden named N.V.Tsitsin RAS
127276, Russia, Moscow, Botanicheskaya str., 4
E-mail: new_tech_@mail.ru

Reshetnikov V.N., doctor of biology, academician
Central Botanical Garden of the NAS of Belarus
220012, Belarus, Minsk, Surganova st., 2 v
E-mail: V.Reshetnikov@cbg.org.by