

## Постгеномные технологии (*in vitro*, культура клеток и тканей) при создании межродовых гибридов фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой

Ирина Кондрацкая, Валентина Столепченко, Татьяна Мазур, Ольга Чижик, Петр Васько, Владимир Решетников

Центральный ботанический сад НАН Беларуси

Фестулолиум (*Festulolium*) – это новый вид многолетней злаковой травы, полученный путем межродового скрещивания *Festuca pratensis* или *Festuca arundinacea* с *Lolium perenne* или *Lolium multiflorum*. Фестулолиум приобрел от *Festuca arundinacea* такие качества, как холодостойкость, засухоустойчивость и выносливость к болезням, а от *Lolium multiflorum* – способность к быстрому отрастанию, повышенному содержанию белка, сахаров и переваримостью органических веществ. Взяв за основу хозяйственно-ценные признаки этих культур, используя клеточные биотехнологии, нами планируется создать качественно новый исходный материал. Фертильные межродовые гибриды *Festulolium* морфотипа овсяницы тростниковой будут являться генетическими источниками хозяйственно-ценных признаков и свойств необходимые для селекции адаптивных сортов и гибридов многолетних злаковых трав с высоким уровнем продуктивности.

*Фестулолиум, in vitro, про- и постгамная несовместимость, микрклональное размножение*

### Введение

Современная биотехнология растений связана с применением методов молекулярной и клеточной биологии растений, что определяет новую стадию развития технологии селекции растений. Вклад биотехнологии в сельскохозяйственное производство заключается в облегчении традиционных методов селекции растений, разработке новых технологий, позволяющих повысить эффективность сельского хозяйства. Одним из распространенных направлений метода культуры тканей является микрклональное размножение, при котором получают генетически идентичные формы, что способствует сохранению генетически однородного посадочного материала (Бутенко, 1999). Микрклональное размножения имеет определенные преимущества по сравнению с традиционными методами размножения. Выращивание растений в искусственных контролируемых условиях из меристематических тканей позволяет получить здоровый посадочный материал, свободный от вирусов и других патогенных микроорганизмов. Метод культуры ткани дает возможность поддерживать рост растений на протяжении многих лет, мультиплицировать формы, которые не размножаются вегетативно или не дают жизнеспособных семян; а также выбирать генотипы, устойчивые к неблагоприятным условиям выращивания: экстремальным температурам, засухе, засолению и закислению субстрата. Важнейшим требованием технологии микрклонального размножения является гарантирование полной стерильности и оптимальных условий для клеточного деления и дифференциации исходной ткани. Чтобы эффективность микрклонального размножения была высокой, нужно на всех этапах поддерживать оптимальные условия выращивания. Для этого для каждой культуры необходима разработка конкретной методики микрклонального размножения.

В отдаленной гибридизации находят применение такие методы культуры изолированных тканей, как оплодотворение *in vitro* (преодоление прогамной несовместимости), выращивание изолированных

зародышей на искусственных питательных средах (преодоление постгамной несовместимости), микрклональное размножение ценных гибридов, а также получение гаплоидов *in vitro* и криосохранение. Культивирование зародышей *in vitro*, предварительно изолированных из созревшего (нормально сформированного) семени, либо из незрелого семени (на ранних стадиях развития) предусматривает их выращивание на специально подобранных средах в асептических условиях. В первом случае зародыши полностью дифференцированы, во втором – они находятся в разных фазах развития (Мельничук, 2003).

Для создания межродовых гибридов *Festulolium* морфотипа овсяницы тростниковой нами было проведено скрещивание между ♀ овсяницей тростниковой Зарница и ♂ райграсом многоцветковым Матадор. Комбинации скрещивания межродовых гибридов фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой:

- в условиях фитотронно-тепличного комплекса - F1-11; F1-9; F1-8; F1-30; F1-13; F1-18; F1-35.

- при гибридизации в полевых условиях (раннеспелые формы) – F1a-18a; F1a-18б; F1a-1; F1a-34; F1a-17.

- при гибридизации в полевых условиях (познеспелые формы) - F1a-26; F1a-28; F1a-14; F1a-32.

### Методика исследования

Во время культивирования изолированных зародышей из незрелой зерновки использовали простую минерально-сахарозную среду с витаминами и регуляторами роста, поскольку биологически активные вещества часто вызывают появление ненормальных форм с искаженными отдельными органами и каллусообразованием. Зародыши выделяли из незрелой зерновки после обработки 70% этанолом, а затем в стерильных условиях выделяли зародыши. Дорастивание зародышей провели в стерильных условиях в термостатах INCUCCELL при температуре 24<sup>0</sup>С до появления проростков, после чего пробирки помещали в световую культуральную комнату с режимом 16-ти часового фотопериода с освещенностью 8000 люкс и температурой 20-22<sup>0</sup>С.

Очищенные от чешуек семена фестулолиума стерилизовали по схеме: набухание – промывка 70% спиртом – промывка дистиллированной водой - 0,1 % р-р Ag NO<sub>3</sub>(10 мин) – трехкратная отмывка стерильной водой – проращивание семян в среде МС. Стерильные семена проращивали в чашках Петри на среде Мурасиге-Скуга, не содержащей гормонов, при температуре 25±1°C в термостате. Проросшие в культуре *in vitro* семена помещали на среду МС, содержащую гормоны в различных концентрациях. Культивирование проростков осуществляли в люминастате при температуре 25-27°C, освещенности 3-4 тыс. лк и 16-часовым фотопериодом.

## Результаты и обсуждение

Для преодоления про- и постгамной несовместимости нами было культивировано на питательную среду более 300 зародышей межродового гибрида фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой.

Гибридизацию проводили в условиях фитотропического комплекса (ФТК), в полевых условиях на растениях, приступивших к цветению в ранние и поздние сроки. В ФТК перед опылением в метелках были удалены тычинки, на 17 день после опыления из метелок материнского растения извлечены незрелые зерновки. В полевых условиях на растениях, приступающих к цветению в разные сроки, в фазу выметывания до наступления цветения изолировали главные побеги материнского растения в количестве 6–7 штук. Опыление проводилось при полном цветении метелок без кастрации пыльников. Гибридизация позднеспелых биотипов была проведена через неделю после раннеспелых. В таблице 1 представлена результативность создания межродовых гибридов фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой

**Таб.1.** Результативность создания межродовых гибридов фестулолиума при гибридизации

**Table 1.** Effectiveness of festulolium intergeneric hybrids creation during hybridization

Комбинации скрещивания	Извлечено незрелых зерновок, шт	Высажено зерновок, шт	Получено растений, шт
<i>Результаты гибридизации в ФТК</i>			
F1-11; F1-9; F1-8; F1-13; F1-30; F1-35	<b>208</b>	<b>155</b>	<b>49</b>
<i>Результаты гибридизации в полевых условиях раннеспелые формы</i>			
F1-18a; F1-18б; F1-1; F1-17; F1-34	<b>466</b>	<b>299</b>	<b>174</b>
<i>Результаты гибридизации в полевых условиях раннеспелые формы</i>			
F1-28; F1-28; F1-14; F1-32;	<b>205</b>	<b>167</b>	<b>153</b>

Как видно из таблицы, при высадке зародышей на регенеративную питательную среду, погибло 41,8% - фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой

раннеспелых форм и 8,3% - фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой позднеспелых форм.

При межродовой гибридизации в результате перекомбинации генов происходит интенсивный формообразовательный процесс. Это позволяет ускорить отбор перспективных форм, объединяющих геномы в гибридах фестулолиума морфотипа овсяницы тростниковой. Жизнеспособные растения фестулолиума, полученные в результате проведенных биотехнологических работ высажены в почвенные условия ФТК. Растения фестулолиума отличаются широкой листовой пластинкой, интенсивностью кущения на ранних этапах развития. Наблюдения на ранних этапах позволяют определить интенсивность отрастания гибридов в результате проведения учетов путем срезания надземной массы растений через равные промежутки времени. Для прохождения яровизации в условиях ФТК используются камеры пониженных температур. В период яровизации растения выдерживают при температуре не выше 6 °C с освещенностью 2000 лк и фотопериодом 8 часов. Хорошо раскустившиеся растения проходят яровизацию для получения семенного материала из гибридных растений.

При разработке биотехнологического метода микрклонального размножения *in vitro* гибридов фестулолиума использовали стерильные семена, культивирование в условиях *in vitro* проводили на средах с различным содержанием гормонов. Эффективность действия стерилизующего реагента при введении в культуру *in vitro* и всхожесть семян гибридов фестулолиума в семи линиях составила 100% и только в одной линии наблюдали 2,86% контаминации. Нами установлено, что 0,1% раствор нитрата серебра с экспозицией 10 мин. эффективно влияет на стерильность и жизнеспособность семян гибридов фестулолиума: самый низкий процент всхожести семян – 61,7%, а максимальный – 93,3%.



**Рис.1.** Введение в культуру *in vitro* межродового гибрида фестулолиума

**Fig. 1.** *In vitro* culture of the festulolium intergeneric hybrid

Прорастание семян наблюдали на 3-и сутки, максимальная всхожесть отмечена на 8-е сутки.

У растений разных семейств, видов и сортов способность к органогенезу определяется по-разному.

В таблице 2 показана способность к органогенезу разных семейств начиная с наиболее отзывчивых.

**Таб.2.** Перечень семейств высших растений, расположенных по степени снижения способности к органогенезу  
**Table 2.** The list of higher plants families which are located by the degree of the ability to organogenesis decreasing

Максимальная способность	↓	Пасленовые Крестоцветные Зонтичные Сложноцветные Бобовые (травы) Бобовые (зерновые) Злаки (травы) Злаки (зерновые)
Минимальная способность		

Обязательными условиями для получения клеток, способных к морфогенезу являются питательная среда, физические факторы, баланс экзогенных и нативных гормонов. Активация пазушных меристем достигается добавлением в питательную среду веществ цитокининового типа, индуцирующих развитие побегов. Таким образом, для стимулирования адвентивного побегообразования гибридов фестулолиума, нами проведены исследования по изучению влияния разных концентраций 6-бензиламинопурина (6-БАП) на инициацию пазушных побегов.

Культивирование гибридов фестулолиума проводили на среде Мурасига и Скуга (МС) с добавлением 6-БАП в концентрации 0,5, 0,6, 1 и 2 мг/л. В качестве контроля использовали среду, не содержащую регуляторов роста. Спустя 6 недель культивирования учитывалось число адвентивных побегов, образовавшихся на каждом экспланте. Полученные результаты, показали, что гибриды фестулолиума неодинаково реагируют на присутствие БАП в среде культивирования. Наиболее эффективной оказались среды с добавлением БАП в концентрации 0,5 и 0,6 мг/л. Максимальное побегообразование наблюдали на среде с добавлением 0,6 мг/л БАП – 6-7 побегов на один эксплант, минимальное – 3-4 побегов на эксплант, что обусловлено генотипом растения.



**Рис.2.** Адвентивное побегообразование в культуре *in vitro* у межродового гибрида фестулолиума  
**Fig. 2.** Adventive shooting in the *festulolium* intergeneric hybrid *in vitro* culture

Увеличение концентрации 6-БАП в среде культивирования (1 мг/л БАП) вызывало снижение активности побегообразования. При концентрации в среде культивирования 2 мг/л 6-БАП наблюдали ингибирование роста и дальнейшую гибель проростков. Физиологические и анатомические характеристики растений, полученных в культуре *in vitro*, определяют необходимость постепенной акклиматизации к условиям *ex vitro*. Процесс адаптации растений к условиям почвы или заменяющего ее субстрата является важным этапом в технологиях культивирования *in vitro* и эта стадия продолжает оставаться узким местом при работе с растениями многих видов (Nazarika, 2003). Хотя некоторые особенности адаптации различны и нуждаются в конкретной разработке применительно к каждому виду, в то же время могут быть выделены основные аспекты, которые необходимо учитывать при выведении растений из условий *in vitro*. Показано, что для успешной адаптации *ex vitro* культивирование растений *in vitro* следует проводить на средах, содержащих сахарозу. Для роста, размножения и адаптации *ex vitro* на ряде культур показано, что содержание в среде 2–4% сахарозы является оптимальным (Koroch, 1997). Отмечено также, что инициация корней уменьшалась пропорционально уменьшению уровня сахарозы, и побеги, перенесенные со среды без сахарозы, не выживали после перемещения в теплицу (Zimmerman, 1983). В наших исследованиях при культивировании гибридов фестулолиума в культуре *in vitro* применяли среды культивирования, содержащие 3% сахарозы. Для адаптации культуральных гибридов фестулолиума к измененным условиям влажности *ex vitro*, регенеранты, с хорошо развитой корневой системой переносили в почву, состоящую из смеси дерново-подзолистой и торфяной.

Регулирование водного режима посредством создания постепенно снижающегося уровня влажности и достаточным воздухообменом очень важно на первом этапе культивирования. Для лучшей адаптации, роста и развития в почвенную смесь добавляли минеральные удобрения.



**Рис.3.** Растения межродового гибрида фестулолиума в условиях культивирования *ex vitro*, 18 дней культивирования в ФТК  
**Fig. 3.** Plants of *festulolium* intergeneric hybrid *ex vitro* culture, 18 days of cultivation in the greenhouse

При несоблюдении этих условий существенно снижается приживаемость растений. На рисунке 3 представлены растения после 18 дней культивирования.

Как видно, растения фестулолиума хорошо проходят условия культивирования *ex vitro*, быстро наращивают зеленую массу.

## Выводы

Основные направления селекции многолетних злаковых трав направлены на создание генотипов с хорошей отращаемостью и стабильностью урожая; высокой устойчивостью к основным болезням, способностью в многокомпонентных травостоях; а также стабильной семенной продуктивностью. Разработанные авторами постгеномные технологии (*in vitro*, культура клеток и тканей) позволили сократить сроки создания межродовых гибридов фестулолиума

морфотипа овсяницы тростниковой с заданными хозяйственно-ценными признаками. Данная работа проводится в рамках выполнения задания Государственной программы «Научно-технологические и технические» подпрограмма «Инновационные биотехнологии -2020».

## Литература

1. БУТЕНКО, РГ. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. Москва, 1999, 159с.
3. HAZARIKA, BN. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current science*, 2003, Vol 8, №12, p.1704-1712 с.
4. KOROSH, AR. Micropropagation and acclimatization of *Hedeoma multiflorum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 1997, Vol 48, p.213-217.
6. МЕЛЬНИЧУК, МД., НОВАК, ТВ., КУНАХ, ВА.. Биотехнологія рослин. Киев, 2003, 520 с.
9. ZIMMERMAN, RH. Factors affecting *in vitro* propagation of apple cuttings. *Acta Hort.*, 1983, Vol 131, p.171-178.

Irina Kondratskaya, Valentina Stolepchenko, Tania Mazur, Olga Chizhik., Petr Vasko, Vladimir Reshetnikov

## Pos-genomic technologies (in vitro, cell and tissue culture) when creating intergeneris hybrids *Festulolium* of a morphotype *Festuca arundinacea*

### Summary

*Festulolium* – is a new species perennial grass crops, obtained by intergenerational crossing *Festuca pratensis* or *Festuca arundinacea* with a *Lolium perenne* or *Lolium multiflorum*. *Festulolium* has received from *Festuca arundinacea* such dualities as cold hardiness, xerophytism and robustness, and from *Lolium multiflorum*- ability to fast growth, the increased protein content, blood sugar and digestibility of organic matter. Having taken agronomic character of these cultures as a basis, using cell biotechnologies, it is planned to create qualitatively new initial material by us. Fertile intergeneric hybrids of a *Festulolium* of a *Festuca arundinacea* morphotype will be genetic sources of agronomic character and necessary properties for selection of adaptive with high level of productivity variety and hybrids perennial grass crops/

*Festulolium, in vitro, pro-postgamous compatibility, micropropagation*

Получено в марте 2018 г., подписано в печать в апреле 2018 г.

**Ирина КОНДРАЦКАЯ.** Научный сотрудник, Центральный ботанический сад НАН Беларуси

Адрес: ул. Сурганова 2в, Республика Беларусь - 220012, г. Минск. Тел. (+375)29-321-50-98, адрес эл. почты: ikondratskaya@mail.ru

**Irina KONDRATSKAYA.** Scientific worker, Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus Address; 2V, Surganov Str., Republic of Belarus - 220012, Minsk. Tel. (+375)29-321-50-98, e-mail: ikondratskaya@mail.ru

**Ольга ЧИЖИК.** Кандидат биологических наук, Центральный ботанический сад НАН Беларуси. Адрес: ул. Сурганова 2в, Республика Беларусь - 220012, г. Минск, адрес эл. почты: chizhikolga17@gmail.com.

**Olga CHIZHIK.** PhD (biology), Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus. Address; 2V, Surganov Str., Republic of Belarus - 220012, Minsk. Tel. (+375)29-684-84-73, e-mail: chizhikolga17@gmail.com.

**Владимир РЕШЕТНИКОВ.** Академик, доктор биологических наук, профессор, Центральный ботанический сад НАН Беларуси. Адрес: ул. Сурганова 2в, Республика Беларусь - 220012, г. Минск. Тел. (+375)29-684-14-61, адрес эл. почты: V.Reshetnikov@cbg.org.by.

**Vladimir RESHETNIKOV.** Academician, doctor of biological sciences, prof., Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus Address; 2V, Surganov Str., Republic of Belarus - 220012, Minsk. Tel. (+375)29-684-84-73, e-mail: V.Reshetnikov@cbg.org.by.

**Татьяна МАЗУР.** Научный сотрудник Центральный ботанический сад НАН Беларуси

Адрес: ул. Сурганова 2в, Республика Беларусь - 220012, г. Минск. Тел. (+375) 29-380-73-15

**Tatiana MAZUR.** Scientific worker, Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus Address; 2V, Surganov Str., Republic of Belarus - 220012, Minsk. Tel. (+375)29-380-73-15

**Валентина СТОЛЕПЧЕНКО.** Кандидат сельскохозяйственных наук, Республиканское научное учреждение «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». Адрес: ул. Тимирязева,1, Республика Беларусь - 222160, г. Жодино, Тел.: (+375)29-606-82-32, , e-mail: [vstolepchenko@mail.ru](mailto:vstolepchenko@mail.ru).

**Valentina STOLEPCHENKO.** PhD, Republican unitary enterprise «Research and Practical Center of National Academy of Sciences of the Republic of Belarus for Arable Farming» Address: 1, Timiryazeva Str., Republic of Belarus - 222160, Zhodino. Tel. (+375)29-606-82-32, e-mail: [vstolepchenko@mail.ru](mailto:vstolepchenko@mail.ru).

**Петр ВАСЬКО.** Кандидат биологических наук, доцент, Республиканское научное учреждение «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». Адрес: ул. Тимирязева,1, Республика Беларусь - 222160, г. Жодино, Тел.: Тел. (+375)29-663-40-94, e-mail: [vvasko@mail.ru](mailto:vvasko@mail.ru).

**Petr VASKO,** PhD (biology), professor, Republican unitary enterprise «Research and Practical Center of National Academy of Sciences of the Republic of Belarus for Arable Farming» Address: 1, Timiryazeva Str., Republic of Belarus - 222160, Zhodino. Tel. (+375)29-663-40-942, e-mail: [vvasko@mail.ru](mailto:vvasko@mail.ru).